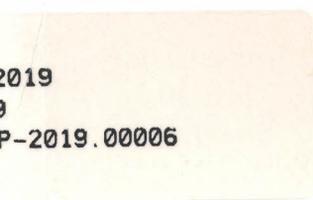
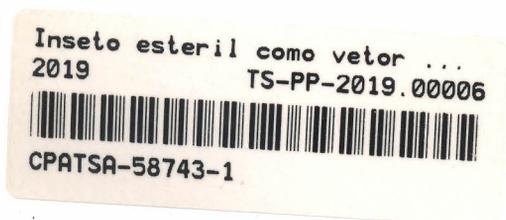


**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA (UNEB)**  
**Pró-Reitoria de Pesquisa e Ensino de Pós-Graduação (PPG)**  
**Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS)**  
**Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Horticultura Irrigada (PPGHI)**

**CLAYTON MOREIRA LEAL**

**INSETO ESTÉRIL COMO VETOR DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA  
O CONTROLE DE *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae)**



**JUAZEIRO-BA**

**2019**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA (UNEB)**  
**Pró-Reitoria de Pesquisa e Ensino de Pós-Graduação (PPG)**  
**Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS)**  
**Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Horticultura Irrigada (PPGAHI)**

CLAYTON MOREIRA LEAL

**INSETO ESTÉRIL COMO VETOR DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA  
O CONTROLE DE *Ceratitidis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae)**

JUAZEIRO-BA

2019

UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA (UNEB)  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Ensino de Pós-Graduação (PPG)  
Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS)  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Horticultura Irrigada (PPGAHI)

CLAYTON MOREIRA LEAL

**INSETO ESTÉRIL COMO VETOR DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA  
O CONTROLE DE *Ceratitís capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae)**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Horticultura Irrigada da Universidade do Estado da Bahia (PPGHI - UNEB/DTCS), como requisito para obtenção do título de mestre em Agronomia, Área de concentração: Horticultura Irrigada.

**Orientador:** José Osmã Teles Moreira

**Coorientador:** Carlos Alberto Tuão Gava



JUAZEIRO-BA

2019

## FOLHA DE APROVAÇÃO

"INSETO ESTÉRIL COMO VETOR DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE CERATITIS CAPITATA (WIEDEMANN, 1824) (DIPTERA: TEPHRITIDAE)"

CLAYTON MOREIRA LEAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Horticultura Irrigada – PPGHI, em 8 de maio de 2019, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Agronomia: Horticultura Irrigada pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:

  
Professor(a) Dr.(a) JOSÉ OSMÃ TELES MOREIRA  
Universidade do Estado da Bahia - UNEB  
Doutorado em Ciências Biológicas (Entomologia)  
Universidade Federal do Paraná

  
Pesquisador(a) Dr.(a) CARLOS ALBERTO TUÃO GAVA  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA SEMIÁRIDO  
Doutorado em Produção Vegetal  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

  
Pesquisador(a) Dr.(a) BEATRIZ AGUIAR JORDÃO PARANHOS  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA SEMIÁRIDO  
Doutorado em Ciências Biológicas (Zoologia)  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

*De que serve ao homem conquistar  
o mundo inteiro e perder a salvação?*

*Jesus Cristo*

## AGRADECIMENTOS

É certo que neste espaço dedicarei de coração os meus sinceros e mais profundos agradecimentos a todos aqueles que influenciaram e contribuíram na idealização e construção desse projeto permitindo-me chegar a este momento. É com imensa satisfação que eu agradeço...

Ao meu Deus, pela força, sabedoria e por tudo que Ele proporcionou em mim para concretização desse trabalho.

A minha família pelo apoio dispensado fator este, que foi preponderante nessa jornada. Em especial, à minha mãe Graça Leal, pelo carinho e por ter me guiado no caminho da retidão, ao meu pai, Manoel pela disciplina e instruções de vida. Aos meus irmãos, Emanuel e Flávio pelo companheirismo e apoio em todos os momentos.

A minha namorada, Sheyla Costa, pelo exemplo de companheirismo e cumplicidade. Por ter sido um pilar fundamental na concretização do mestrado e por todo carinho que proporcionou a mim. Meu muito obrigado.

Ao senhor Carmelo da Costa pelos enriquecedores diálogos e auxílio no estudo das moscas. A dona Lucélia pelo carinho e admiração.

Aos meus laboriosos amigos que vestiram o jaleco e labutaram comigo nos recônditos do laboratório, nas pessoas de Hebert pela crucial ajuda e ensino no laboratório de controle biológico, a Alícia e Jamile pela valiosa ajuda na montagem dos experimentos, a Raila e a Maria Eduarda pelo apoio na produção dos insetos. A Dr<sup>a</sup> Patrícia Oliveira pela constante presença na correção da dissertação, mesmo estando tão distante. A Aline da Moscamed por todo apoio. As meninas do laboratório de entomologia, Jéssica, Thamara, Isabela, Rosamara, Glenda, muito obrigado por terem me ajudado tanto. A Fernando pela disponibilidade e ajuda na escrita científica.

Ao meu Coorientador Dr. Gava por ter me mostrado uma nova visão da ciência, pela paciência e orientação no desenvolvimento da pesquisa, pela ajuda na elucidação problemas, pela confiança atribuída a mim e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao meu orientador, professor Dr. Osmã, pela sua orientação, por ter me apoiado com esse projeto, pelas aulas ministradas, que contribuíram deveras na minha formação profissional. Muito obrigado professor.

A Dr<sup>a</sup> Beatriz da Embrapa Semiárido que sempre, simpaticamente, me ajudou a esclarecer dúvidas, pelo incentivo no ingresso do mestrado, pela gentileza comigo desde o início e por todo apoio durante essa etapa da minha vida.

A Dr<sup>a</sup> Maylen da Biofábrica Moscamed que guiou-me para o mestrado, me instruindo ainda no estágio. Obrigado por ser “Mãelen” no início da minha carreira acadêmica.

A Universidade do Estado da Bahia (UNEB) pelo conhecimento adquirido, em particular, ao Programa de Pós-graduação em Agronomia: Horticultura Irrigada, pela oportunidade de participar do curso de mestrado. Agradeço à Carmem e a Ivana pelo carinho e por está a disposição quando precisei.

Aos meus colegas de turma do mestrado, Cinthia, Caio e Tailane pelo companheirismo e altruísmo. E aos meus eternos amigos Thomaz, William e Fernanda que sempre estiveram comigo.

A professora Lindete que muito ajudou coordenando e viabilizando sanar as necessidades de todos os alunos do programa, inclusive a minha.

A Biofábrica Moscamed por todo o material biológico fornecido e por ter me dado oportunidade de iniciar o desenvolvimento da minha vida profissional. Em especial, a Marijke que estimulou nessa perspectiva de trabalho. A toda equipe da Moscamed, meus agradecimentos.

A Embrapa pelo laboratório de controle biológico que foi o palco dos bioensaios montados e por fornecer os materiais necessários para execução da pesquisa. Aos colegas que fiz nessa empresa e que contribuíram nos experimentos, Laíla, Osmar e Danilo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por conceder a bolsa de estudo.

## SUMÁRIO

SUMÁRIO .....	7
RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	10
INTRODUÇÃO .....	12
REVISÃO DE LITERATURA .....	15
1.0 Moscas-das-frutas .....	15
1.1 Importância econômica e quarentenária das moscas-das-frutas .....	15
1.2 Comportamento e biologia de <i>Ceratitis capitata</i> .....	16
1.3 Flutuação populacional de moscas-das-frutas .....	17
1.4 Técnica do Inseto Estéril – TIE .....	17
2.0 Dieta artificial e nutrição dos insetos .....	18
3.0 Insetos vetores de doença .....	19
4.0 Fungos entomopatogênicos .....	20
4.1 Fungos entomopatogênicos: <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i> .....	20
5.0 Ciclo das relações patógeno-hospedeiro .....	21
5.1 Mecanismos de defesa dos insetos .....	21
6.0 Formulações .....	22
6.1 Funções da formulação .....	23
7.0 Estrutura e grânulo dos amidos .....	23
CAPÍTULO I .....	31
ADIÇÃO DE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS EM DIETA DE MACHOS ESTÉREIS UTILIZADOS COMO VETORES DE FUNGOS VIRULENTOS A <i>Ceratitis capitata</i> (DIPTERA: TEPHRITIDAE) .....	31
RESUMO .....	31
ABSTRACT .....	32
INTRODUÇÃO .....	33
MATERIAL E MÉTODOS .....	35
RESULTADOS .....	39
DISCUSSÃO .....	45
REFERÊNCIAS .....	48
CAPÍTULO II .....	51

FORMULAÇÃO DE CONÍDIOS PARA A APLICAÇÃO DE ESTIRPES VIRULENTAS DE <i>Metarhizium anisopliae</i> E <i>Beauveria bassiana</i> UTILIZANDO MACHOS ESTÉREIS COMO VETORES.....	51
RESUMO .....	51
ABSTRACT .....	53
1. INTRODUÇÃO .....	54
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	57
3. RESULTADOS .....	63
4. DISCUSSÃO.....	72

# INSETO ESTÉRIL COMO VETOR DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae)

## RESUMO

A moscas-das-frutas *C. capitata* é praga chave na fruticultura mundial e a Técnica do Inseto Estéril (TIE) consiste na liberação de machos estéreis (ME) para acasalar com fêmeas selvagens reduzindo a população. A TIE pode ser mais eficiente se combinada com fungos entomopatogênicos. No entanto, os ME são hospedeiros suscetíveis. Assim, é necessário estudar medidas que aumentem a sobrevivência dos MEs e que reduzam o impacto do tratamento. Para isso, testes *in vitro* avaliaram o efeito de metilparabeno (MPB), ácido cítrico e benzoato de potássio sobre o crescimento de *B. bassiana* LCB289 e *M. anisopliae* LCB255. *In vivo*, MEs foram criados em dietas com MPB em quatro grupos: T1. adulto e larva com MPB na dieta (L+A+); T2. MPB apenas na fase larval (L+A-); T3. Apenas adultos com MPB (L-A+); T4. adulto e larva sem MPB (L-A-). Avaliou-se a sobrevivência mediana (SM) de MEs com LCB289 e LCB255 e sua eficiência no controle de fêmeas. Machos foram tratados com formulações com amido de milho, batata, mandioca, arroz, (SiO<sub>2</sub>) com os dois fungos. Verificou-se que o MPB impediu o crescimento de LCB289 e LCB255 mesmo na menor dose (0,75 g L<sup>-1</sup>). Os MEs criados com MPB tiveram maior SM com (6 a 9 dias) comparado ao controle (3 a 4 dias). A maior SM causada pelo MPB aumentou também, a mortalidade das fêmeas (p < 0,05). Os conídios e a sílica causaram 100% de mortalidade dos MEs, enquanto que a aplicação com amido de milho e mandioca resultou em maior SM, alta mortalidade de fêmeas e machos na recópula. O LCB289 apresentou a maior transferência com efeito proporcional às doses e ligeira redução de conídios aderidos entre os períodos de pareamentos. As curvas de mortalidade de fêmeas foram diferentes (p < 0,05) entre as cepas, com SM de 5,5 e 4,2 dias com LCB289 e 6,0 e 7,0 dias com LCB255. Em campo, a liberação de MEs com LCB289 e amido de mandioca contendo 10<sup>9</sup> conídios g<sup>-1</sup> causou 64% de mortalidade e SM de 4,6 dias nas fêmeas. A criação de MEs com fungicidas, principalmente na fase larval, é uma estratégia para aumentar a sobrevivência dos MEs tratados com fungos. Formulações com forças de adesão mediana, como em amido de milho ou mandioca podem ser utilizadas com a TIE aumentando a eficiência.

**Palavras-chave:** *C. capitata*; Formulação; *Metarhizium*; *Beauveria*; Transferência horizontal; Técnica do inseto estéril.

## STERILE INSECT AS VECTOR OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI IN CONTROL OF *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae)

### ABSTRACT

The fruit fly *C. capitata* is a key pest in fruticulture worldwide and the Sterile Insect Technique (SIT) it consists in liberation of sterile males (SM) to mating with wild females reducing population. The SIT can be more efficient if associated with entomopathogenic fungi. However, the SM are susceptible host. Therefore, is required to study measures what increasing the survival of SMs and reduce impact of treatment. For this, *in vitro* tests avaluated the effect of methylparaben (MPB), citric acid and potassium of benzoate on growth of *B. bassiana* LCB289 and *M. anisopliae* LCB255. *In vivo*, SMs, were criated in diet with MPB in four groups: T1. Adult and larvae reared with MPB in the diet; T2. MPB only in the larval phase; T3. Only adults with MPB; T4. Adult and larvae without MPB. Was avaluated median survival (MS) of SMs with LCB289 and LCB255 and your efficiency at the females control. Males were treated with starch of corn, potato, cassava, rice, (SiO<sub>2</sub>) with two fungi. MPB entirely restricted the growth of LCB289 and LCB255 in culture medium, even when added at the lowest dose (0.75 g L<sup>-1</sup>). The SM reared on a diet containing MPB had a higher average survival (6 to 9 days) when compared to the control treatment (3 to 4 days). The higher SM caused by MPB also increased, females mortality (p <0.05). The conidia and silica caused 100% mortality from SMs, while corn and cassava starch application resulted in higher MS, high mortality of females and males in the remating. LCB289 presented highest transfer with effect proportional to the doses and slight reduction of conidia adhered between the periods of mating. Females mortality curves were different (p <0.05) among strains, with MS of 5.5 and 4.2 days with LCB289 and 6.0 and 7.0 days with LCB255. In the field, the release of SM with LCB289 and cassava starch containing 10<sup>9</sup> conidia g<sup>-1</sup> caused 64% mortality and SM of 4.6 days in females. The rearing of SM with fungicides, mainly in the larval phase, is a strategy to increase the survival of SMs treated with fungi. Formulations with medium adhesion forces such as corn starch or cassava can be used with TIE increasing you efficiency.

**Key-words:** *Beauveria*; *C. capitata*; Formulation; Horizontal transference; *Metarhizium*; Sterile Insect Technique.

## INTRODUÇÃO

A fruticultura representa uma das principais atividades de importância econômica, gerando emprego e renda (SANTOS et al., 2018). No entanto, a mosca-das-frutas *Ceratitís capitata* (Wiedmann, 1824) ou mosca do mediterrâneo é praga chave e considerada a mais destrutiva dentre os tefritídeos (PARANHOS et al., 2008). É considerado um dos mais importantes insetos do mundo, representando enorme ameaça devido aos danos diretos causados aos frutos e indiretos na comercialização, em função de implicações quarentenárias (QUESADA-MORAGA et al., 2008).

Países importadores como os Estados Unidos e o Japão, que estão entre os principais consumidores de frutas *in natura*, impõem barreiras quarentenárias, visando impedir a introdução de espécies exóticas de mosca-das-frutas em seu território, obrigando, assim, os países exportadores a aprimorar suas técnicas de produção e controle da praga (MALACRIDA et al., 2007; PAPADOPOULOS et al., 2001; PARANHOS et al., 2008).

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) é a melhor maneira de controlar a população dessa praga. Algumas estratégias têm sido adotadas, como métodos meramente físicos, baseados no envoltório ou ensacamento de frutos para evitar a oviposição; métodos culturais como saneamento de pomares; controle comportamental utilizando a técnica de aniquilação de machos, pulverização química; controle biológico com parasitoides (RENDON et al., 2006), machos estéreis (TOLEDO et al., 2006) e mais recentemente o uso de fungos entomopatogênicos (EKESI; MANIANIA; LUX, 2002, 2003; QUESADA-MORAGA et al., 2008).

A utilização de microorganismos para controlar pragas na agricultura representa um avanço ecológico para solucionar problemas ocasionados pelo emprego indiscriminado de inseticidas empregados nesse setor. Sendo que os agentes de controle mais importantes são fungos, bactérias, vírus, protozoários, nematóides, rickétsias e micoplasma. Dentre eles, os fungos causam 80% das enfermidades nos insetos (ALVES, 1998). O controle biológico com os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e (*Metschnikoff*) Sorokin representa uma forma de controle muito eficiente e pode ser integrado ao manejo de moscas-das-frutas (DE LA ROSA; LOPEZ; LIEDO, 2002).

A penetração normal desses fungos é pelo tegumento, através de atividade enzimática ou pressão mecânica exercida pelo tubo germinativo e apressório. Os ciclos desta

relação apresentam-se de modo geral pelas fases de: adesão, germinação, formação de apressório, formação de grampo de penetração, penetração, colonização e ainda, reprodução e disseminação do patógeno (ALVES, 1998).

A técnica do inseto estéril é uma abordagem para suprimir ou erradicar pragas e é amplamente utilizada nos programas integrados de controle de tefritídeos.(SHELLY et al., 2004). De acordo Hendrichs et al., (2002) a técnica envolve a produção massal de machos da espécie-alvo e a liberação de machos irradiados (esterilizados) no agroecossistema. A união entre machos estéreis e fêmeas silvestres produz ovos inférteis, o que reduz o potencial reprodutivo da população selvagem. O sucesso da TIE depende, em grande parte, da capacidade dos machos liberados e estéreis para atrair e obter acasalamentos com fêmeas selvagens (HENDRICHS J. et al., 2002). Os machos estéreis que são liberados em campo devem apresentar boa capacidade de dispersão, sobrevivência e desempenho sexual. Portanto, a eficiência e eficácia da utilização da TIE dependem do sucesso dos machos estéreis, na competição com os machos selvagens pela cópula das fêmeas (PARANHOS, 2007).

Recentemente, tem sido proposta a utilização da técnica do inseto estéril como vetores de entomopatógenos. A transmissão horizontal de conídios para a população selvagem pode ser alcançada através do acasalamento ou mesmo através de interações em leks. Como vantagem adicional, as fêmeas férteis infectadas sofrem uma diminuição gradual da sua fecundidade e fertilidade (SANCHEZ-ROBLERO et al., 2012). Experimentos em gaiolas de campo mostraram que os machos esterilizados da mosca-das-frutas mexicana (*Anastrepha ludens*) (Diptera: Tephritidae) inoculados com *B. bassiana* foram capazes de transmitir o patógeno para as fêmeas não infectadas através do acasalamento ou tentativas de acasalamento, reduzindo drasticamente a fertilidade e longevidade das fêmeas (TOLEDO et al., 2007).

No México, estudos de transferência horizontal com machos vetores tem mostrado alta eficiência de produtos microbianos no controle de fêmeas (TOLEDO et al., 2017). Esta estratégia apresenta como vantagem a redução da quantidade de produto utilizado e diminui a possibilidade de contaminação de organismos não-alvo (TOLEDO et al., 2007; TOLEDO; LIEDO; FLORES, 2006) Além disso, os machos vetores podem otimizar o uso da TIE em cenários com alta infestação das pragas. No entanto, a sobrevivência dos machos estéreis é um fator que pode determinar eficiência do uso da técnica no MIP.

No Brasil, ainda não há estudos sobre transferência horizontal de fungos entomopatogênicos em selvagens de *C. capitata* utilizando como vetor, machos estéreis *tsl* Vienna-8. A possível associação da técnica do inseto estéril com fungos entomopatogênicos poderá aumentar a eficiência de controle da TIE e potencializar o seu uso dentro do Manejo Integrado de Pragas no contexto da fruticultura nacional.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1.0 Moscas-das-frutas

#### 1.1 Importância econômica e quarentenária das moscas-das-frutas

A mosca do mediterrâneo *C. capitata* é considerada a mais cosmopolita e invasora dentre todos os tefritídeos. É a praga mais destrutiva da fruticultura mundial, devido à natureza do dano causado, ao grande número de gerações por ano e à sua grande adaptabilidade a vários tipos de hospedeiros, sendo capaz de infestar mais de 350 espécies vegetais, inclusive aquelas de importância econômica (METCALF, 1995). Segundo Gallo et al. (2002), essa espécie de praga apresenta o que é normalmente chamado de “sucessão de hospedeiros”, ou seja, ela passa de uma frutífera para outra, à medida que estas forem frutificando em diferentes épocas do ano.

As espécies de moscas-das-frutas de importância econômica pertencem aos gêneros, *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Dacus*, *Rhagoletis* e *Toxotrypana*. A maioria dos tratamentos quarentenários usados para garantir que um produto esteja livre dessas pragas são tratamentos diretos através de calor, frio e fumigantes. Das moscas que ocorrem no Brasil destacam-se as espécies dos gêneros *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Rhagoletis* e *Ceratitis* (ZUCCHI, 2000), sendo os gêneros *Ceratitis* e *Anastrepha* os de maior importância neste país. Estima-se que os prejuízos causados pelas moscas-das-frutas chegam a um bilhão de dólares anuais em controle e monitoramento (GODOY et al., 2011).

Os danos diretos ocorrem devido à oviposição realizada pelas fêmeas no fruto em amadurecimento. A fêmea introduz seu ovipositor através da epiderme do fruto (punctura) e deposita de um a dez ovos. Logo após a postura ocorre a eclosão das larvas, que se desenvolvem no interior dos frutos, causando um distúrbio hormonal e sua queda prematura (SALLES, 1995).

Em diversas espécies de frutas, como nos citros, a epiderme fica marcada no local da oviposição e, com o desenvolvimento fisiológico do fruto, forma-se uma concavidade ou deformação, depreciando o mesmo. Em outras frutíferas, a infestação das larvas não é perceptível, pois o visual externo permanece inalterado, porém, quando as larvas saem dos frutos para o solo, pode-se perceber o orifício de sua saída na epiderme e constata-se a perda de sua consistência (CARVALHO, 2005).

Além destes danos diretos causados no fruto infestado, o local de oviposição pode servir como porta de entrada para microrganismos, causando a contaminação e apodrecimento. Em frutos como a manga (*Mangifera indica* L.) aparece no local da punctura exsudatos de seiva, por onde ocorre contaminação por bactérias e fungos, o que resulta no apodrecimento do mesmo (CARVALHO, 2005).

Assim, além de causar redução na produção, uma vez que os frutos infestados caem precocemente da frutífera ou serem inviáveis para comercialização, as infestações causam aumento no custo da produção, devido ao emprego de medidas de controle; menor valor da produção, já que os frutos de baixa qualidade têm menor valor comercial; e menor tempo de prateleira, pois frutos infestados pela mosca apodrecem mais rapidamente (ROHDE, 2007).

As perdas indiretas referem-se às limitações existentes para a comercialização de frutas frescas no mundo, causada pela ocorrência de moscas-das-frutas. Isso por que os países importadores como Estados Unidos e Japão, impõem barreiras fitossanitárias para espécies exóticas na forma de regulamentos e normas técnicas, dificultando e, às vezes, impedindo as exportações (SOUZA FILHO, 2003).

Entre as espécies que apresentam barreiras quarentenárias para a exportação de frutos frescos para Europa, Estados Unidos e recentemente para o Japão, estão *C. capitata*, *A. obliqua*, *A. fraterculus* (PARANHOS, 2005).

## 1.2 Comportamento e biologia de *Ceratitis capitata*

Em diversas espécies de frutas, como nos citros, a epiderme fica marcada no local da oviposição e, com o desenvolvimento fisiológico do fruto, forma-se uma concavidade ou deformação, depreciando o mesmo. Em outras frutíferas, como a manga (*Mangifera indica* L.), observa-se, no local da oviposição, material exsudato de seiva. No entanto, em algumas espécies de frutos, a infestação das larvas não é perceptível, pois o visual externo permanece inalterado, porém, quando as larvas saem dos frutos para o solo, pode-se perceber o orifício de sua saída na epiderme e constata-se a perda de sua consistência (CARVALHO, 2005).

Além destes danos diretos causados no fruto infestado, o local de oviposição pode servir como porta de entrada para microrganismos, causando a contaminação e apodrecimento. Em frutos como a manga aparece no local da punctura exsudatos de seiva, por onde ocorre contaminação por bactérias e fungos, o que resulta no apodrecimento do mesmo (CARVALHO, 2005).

O ciclo biológico de moscas-das-frutas apresenta quatro estágios de desenvolvimento. De acordo com Salles (2000) o ciclo de vida por ser entendido como o desenvolvimento de um estágio a outro, na vida do inseto, até completar o ciclo, possibilitando a reprodução da espécie. Os ovos, em geral, apresentam formato elíptico, cor branca-creme e com diferentes tonalidades. As larvas são brancas-creme, ápodas e com cabeça retrátil. As pupas possuem diversas fases, podendo apresentar uma forma ovóide de cor branca-creme até assemelhar-se com a mosca adulta, dentro do seu pupário (SALLES, 2000; GALLO et al, 2002).

A estratégia de cópula em moscas-das-frutas consiste em: a) aglomeração dos machos na parte inferior de folhagens de plantas hospedeiras ou não hospedeiras; b) emissão do feromônio sexual; c) chamada por meio do batimento das asas; d) chegada da fêmea, que fica frente a frente ao macho; e) ambos se tocam com as antenas; f) machos pulam sobre as fêmeas e iniciam a cópula, sendo que a fêmea pode ou não aceitar o macho e g) fim da cópula (PARANHOS et al., 2008).

### 1.3 Flutuação populacional de moscas-das-frutas

O conhecimento da flutuação populacional e a época de maior ocorrência de uma determinada espécie de inseto de importância econômica é um requisito indispensável, visto que é o trabalho inicial para a determinação da sua época de ocorrência e de início e picos populacionais, auxiliando na definição das épocas de maior ou menor probabilidade de infestações e danos econômicos para o estabelecimento de um controle eficiente, pois permite traçar estratégias de manejo mais eficazes (SANTOS, 2013), e tais conhecimentos só são possíveis por meio do monitoramento da área.

As flutuações populacionais de moscas-das-frutas em pomares comerciais estão relacionadas, principalmente, a duas variáveis: disponibilidade de frutos hospedeiros e condições climáticas (SALLES, 2000).

Em pomares para exportação de manga e uva, a supressão da população de *C. capitata* deve ser realizada quando o índice MAD (mosca/armadilha/dia) estiver acima de 0,5. No entanto, para liberação de machos estéreis, o índice MAD deve estar abaixo de 0,1. Acima deste índice, a TIE torna-se ineficiente e economicamente inviável (PARANHOS et al., 2008).

### 1.4 Técnica do Inseto Estéril – TIE

A Técnica do Inseto Estéril consiste na criação, em grande escala, do inseto-praga que se deseja controlar e na liberação semanal desses insetos esterilizados no campo. Os insetos estéreis copulam com os selvagens, mas não geram descendentes (Knipling, 1955). As premissas básicas para a utilização da TIE no controle de insetos são: que a reprodução seja sexuada através da cópula, que as fêmeas copulem de preferência apenas uma vez e que haja facilidade de criação da praga em escala industrial em dieta artificial. A eficiência da TIE pode ser maior quando se liberam apenas os machos no campo, pois aumenta a probabilidade de eles copularem apenas com as fêmeas selvagens, com reduções no custo de produção e de liberação (PARANHOS et al., 2008)

No caso de moscas-das-frutas, as fêmeas estéreis continuam fazendo punctura nos frutos, o que diminui a qualidade para a exportação. Para ser possível a liberação de apenas machos no campo, na década de 1980, foi desenvolvida uma linhagem mutante, cujas fêmeas emergem de pupas brancas, desta forma podendo-se descartar as brancas, mantendo-se as pupas marrons para a liberação de machos estéreis. Dez anos após, para economizar no sistema de produção em escala industrial, foi obtido um mutante cujas fêmeas possuem sensibilidade letal à temperatura (tsl) de 34°C, ainda na fase de embrião (CÁCERES, 2002; PARANHOS et al., 2008).

O método de esterilização mais usual para insetos é através de radiação ionizante proveniente de radioisótopos Cobalto-60, Césio-137 e equipamentos especiais com raio X de elétrons acelerados. Cada espécie de inseto apresenta um estágio de desenvolvimento considerado mais apropriado para uso da radiação buscando a esterilização desses insetos. Ao final da fase de pupa é o estágio de desenvolvimento do inseto o qual, geralmente, resulta em insetos vigorosos, além da maior facilidade de manuseio (ZUCCHI, 2000).

Um dos meios de aumentar a eficiência da TIE é a liberação de uma população nove a cem vezes maiores de machos estéreis em relação à população selvagem, presente no campo, pois aumenta a probabilidade de fêmeas selvagens serem copuladas pelos machos estéreis (KNIPLING, 1955).

## **2.0 Dieta artificial e nutrição dos insetos**

Os seres vivos são um reflexo daquilo que consomem, e este fator evidencia a importância do alimento para os organismos. No caso dos insetos, muitos aspectos da sua biologia, incluindo o comportamento, a fisiologia e ecologia, estão de uma ou outra maneira, inseridos dentro de um determinado contexto alimentar. Além da quantidade, a qualidade e a

proporção desses nutrientes, presentes no alimento, a presença de compostos secundários ou não-nutricionais (aleloquímicos) causam impacto variável na biologia dos insetos, determinando a sua capacidade de contribuição reprodutiva para a geração seguinte (PANIZZI; PARRA, 2009).

O desenvolvimento de dietas artificiais para insetos, principalmente a partir da década de 1960, propiciou um refinamento das pesquisas sobre as exigências nutricionais, existindo meios artificiais para criar mais de 1.300 espécies de insetos. Esse avanço nas técnicas de criação permitiu descobrir que alguns grupos restritos de insetos exigem ácidos nucléicos e, mesmo, vitaminas lipossolúveis. Técnicas sofisticadas de produção de parasitóides *in vitro* (excluindo-se o hospedeiro) têm sido desenvolvidas com sucesso. Embora tenham ocorrido avanços nas dietas para parasitóides e predadores são para os fitófagos, das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, que se encontram 85% das dietas artificiais. (PANIZZI; PARRA, 2009).

As dietas artificiais para criação de insetos permitiu grandes avanços em áreas básicas e aplicadas, e hoje essa atividade é considerada uma das mais importantes na área da entomologia, cobrindo desde a utilização de insetos em pesquisas até na educação pública e na alimentação de animais e humanos. Os adultos dos tefritídeos alimentam-se desde, exsudados dos frutos até as fezes de pássaros, matéria orgânica em decomposição, néctares, polens e outros. (PANIZZI; PARRA, 2009).

### **3.0 Insetos vetores de doença**

De modo geral, os insetos vetores são resistentes aos microrganismos que transmitem. Todavia, ocorrem algumas exceções, representadas por vetores afetados diretamente pelos microrganismos em várias partes do seu corpo, como no epitélio intersticial e nos túbulos de Malpighi, e indiretamente, representadas por bloqueio mecânico do aparelho digestivo e redução da longevidade do vetor (ALVES, 1998).

No estudo dos fatores que determinam o desenvolvimento de uma doença em uma população de insetos, a doença pode ser entendida como um processo dinâmico no qual o hospedeiro e o patógeno, em íntima relação com o meio, se influenciam mutuamente, o que resultam em modificações morfológicas e fisiológicas (GAUMANN, 1950).

A taxa de transmissão é uma taxa que reflete a transmissão do patógeno de um indivíduo para outro dentro da população. E pode ser estabelecida em função do tipo de transmissão do patógeno e da biologia do inseto hospedeiro. A transmissão da doença pode

ser horizontal entre insetos da mesma espécie sem relação parental e vertical quando há transferência do patógeno para a progênie (ALVES, 1998).

#### 4.0 Fungos entomopatogênicos

Os fungos são organismos com tamanho e forma variáveis. Eles podem ser unicelulares, como as leveduras, ou constituídos por um conjunto filamentosos de micélio, por sua vez composto de células denominadas hifas, com parede constituída quimicamente de quitina e/ou celulose, além de outros açúcares, como as glucanas (ALVES, 1998).

De acordo com Gallo et al. (2002) o controle com entomopatógenos trata-se da utilização racional de microrganismos visando à manutenção da população das pragas em níveis não prejudiciais. Esse tipo de controle deverá fazer parte de medidas, as quais, atuam em harmonia com o ambiente, sejam capazes de reduzir a população das pragas a níveis de danos não econômicos. Sendo, portanto, o principal objetivo do controle microbiano o estabelecimento enzoótico do patógeno.

Algumas doenças enzoóticas ocorrem anualmente em uma população de insetos e contribui para o controle de insetos-praga. A doença epizoótica não é regulada pelos mesmos fatores que controlam as doenças enzoóticas. Nesse caso, a doença aparece esporadicamente provocando grandes variações na prevalência e incidência. Arrasam a população de insetos em curto espaço de tempo (ALVES, 1998).

A variabilidade genética dos fungos entomopatogênicos pode ser considerada umas das principais vantagens no controle microbiano de insetos. Com técnicas apropriadas para o bioensaio, é possível selecionar isolados altamente virulentos, específicos ou não, com características adequadas para serem utilizados como inseticidas microbianos, visando o controle de grande número de pragas das culturas econômicas (LACEY, 2017; ALVES, 1998).

#### 4.1 Fungos entomopatogênicos: *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*

Dentre os entomopatógenos adotados no controle biológico de pragas destacam-se a utilização de microrganismos patogênicos como *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin que vêm sendo utilizados com sucesso no controle de pragas, tanto no Brasil como em outros países, por serem capazes de infectar os

diferentes estágios de desenvolvimento da praga, como seus ovos, larvas, pupas e adultos, sendo esta característica desejável e peculiar desse grupo (LACEY, 2001).

Os fungos entomopatogênicos infectam seus hospedeiros através da cutícula, com isso eles possuem maior potencial como agentes de controle biológico para controle de adultos de mosca-das-frutas em relação aos vírus e bactérias que devem ser ingeridos pela praga para que possam ser eficazes. Além disso, uma nova estratégia está sendo considerada para o uso de fungos entomopatogênicos na proteção de culturas. Essa nova abordagem consiste em disseminar o patógeno na população praga, usando dispositivos que atraem os insetos para estações de iscas infestadas com o patógeno, permitindo escapar para potencialmente disseminar a doença para indivíduos não infectados (DIMBI et al., 2003).

Essas espécies de fungos, ocorrem frequentemente em insetos e amostras de solo, o qual pode persistir sobrevivendo por um longo período de tempo através da colonização saprofítica no solo ou de forma epizootica e enzoótica na população da praga ou hospedeiros (ALVES, 1998). De acordo com TOLEDO et al., (2006) esses fungos são práticos agentes de controle de mosca-das-frutas.

Os propágulos de fungos entomopatogênicos são responsáveis pela dispersão e infecção em condições naturais. Os conídios aéreos (esporos produzidos no ar ou conídios secos). A maioria dos fungos hifomicetos entomopatogênicos produz grandes quantidades de conídios hidrofóbicos pequenos ( $<10 \mu\text{m}$ ) e em massas densas (WRAIGHT; JACKSON; DE KOCK, 2001).

## **5.0 Ciclo das relações patógeno-hospedeiro**

O ciclo das relações fungo-hospedeiro depende das condições ambientais, como temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta assim como das condições nutricionais e susceptibilidade do hospedeiro. O ciclo apresenta as fases de adesão, germinação, formação de apressórios, formação de grampo de penetração, penetração, colonização, reprodução do patógeno. A morte ocorre pela produção de micotoxinas, mudanças patológicas na hemocele, ação histológica, bloqueio mecânico do aparelho digestivo devido ao crescimento vegetativo e outros danos físicos em decorrência do crescimento do micélio. A beuvaricina é uma toxina produzida por *B. bassiana* e as destruxinas são encontradas em *M. anisopliae* (ALVES, 1998)

### **5.1 Mecanismos de defesa dos insetos**

Os mecanismos de defesa dos insetos que atuam contra entomopatógenos podem ser divididos em mecânicos: celulares, imunológicos, bioquímico-fisiológicos e comportamentais. Após vencer a barreira mecânica, representada pelo tegumento ou membrana peritrófica, para iniciar a sua colonização, os fungos podem sofrer ação de hemócitos e de mecanismos bioquímico-fisiológicos que atuam contra a invasão. Os insetos também podem defender-se através de um mecanismo imunológico ou comportamental (regurgitação e hábito) (ALVES, 1998).

Há organismos que resistem naturalmente ao ataque de certos patógenos. E tal habilidade é chamada de tolerância. Após o rompimento da barreira física (tegumento), o patógeno penetra na cavidade geral, sofre ação do sistema de defesa celular desencadeada pelos hemócitos presentes na hemolinfa. Em um primeiro estágio, os granulócitos e os coagulócitos reconhecem a partícula estranha, liberando fatores de reconhecimento. No segundo, as opsoninas (fatores de reconhecimento) conduzem os plasmotócitos em direção às partículas invasoras ou às feridas (ALVES, 1998).

## 6.0 Formulações

Formulação é um termo usado em vários sentidos e seu significado fundamental é a colocação conjunta de componentes em um relacionamento apropriado ou estruturas, de acordo com uma fórmula. Os pesticidas estão disponíveis em várias formulações e uma formulação é simplesmente a forma de um produto específico que é usado. A atividade biológica de um pesticida baseia-se na sua natureza química ou biológica dependendo seu ingrediente ativo. O ingrediente ativo é geralmente formulado com outros materiais e este é o produto vendido. A formulação melhora as propriedades de um produto químico para manuseio, armazenamento, aplicação, eficácia e a segurança (BURGES, 1998).

As formulações em pó são geralmente formuladas com partículas inertes de cinzas, giz, talco, quartzo, amido, argila, caulim, sílica, carbonato de cálcio ou barro (HELLWEGE et al., 2018). Estes são projetados para serem polvilhados ou soprados nas superfícies do alvo e o pó gruda no corpo dos insetos. As poeiras nem sempre aderem bem a plantas ou animais ou estruturas; e estes são extremamente sujeitos a deriva pelo vento, portanto, representando um maior risco tóxico para o aplicador e o meio ambiente do que muitos outros tipos de formulações. Por estas razões, as poeiras são geralmente recomendadas apenas para aplicação localizada, programas de controle em casa e sistema de armazenamento. São usados

principalmente como protetores de grãos, comumente usado para o vazio da parede interior e perímetro tratamentos, bem como para o pó de colheita (SARWAR, 2015).

### 6.1 Funções da formulação

Formular um produto tem quatro funções básicas: 1- estabilizar o organismo durante a produção e seu armazenamento; 2- auxiliar sua manipulação e favorecer a aplicação do produto para que seja facilmente entregue ao alvo de maneira mais apropriada; 3- proteger o agente ativo de fatores ambientais prejudiciais aumentando sua persistência; 4- aumenta a eficiência por meio da maior atividade do organismo através do maior contato com a praga (BURGES, 1988).

### 7.0 Estrutura e grânulo dos amidos

O amido encontra-se amplamente distribuído em diversas espécies vegetais como um carboidrato de reserva, sendo abundante em grãos de cereais (40% a 90% do peso seco), leguminosas (30% a 50% do peso seco), tubérculos (65% a 85% do peso seco) e frutas imaturas ou verdes (40% a 70% do peso seco) (LAJOLO & MENEZES, 2006).

O tamanho e a forma de grânulos de amido estão entre os fatores de importância na determinação de usos potenciais de amidos. Por exemplo, grânulos pequenos (2,0  $\mu\text{m}$ ) podem ser usados como substitutos de gordura devido ao tamanho ser semelhante ao dos lipídeos. Outras aplicações, nas quais o tamanho dos grânulos é importante, é a produção de filmes plásticos biodegradáveis e de papéis para fax (LEONEL, 2007).

Sendo formado nos plastídeos das plantas superiores, o amido é sintetizado nas folhas, onde serve como carboidrato de reserva temporário, acumulando-se nos cloroplastos durante o dia e servindo como fonte principal para a síntese de sacarose citosólica durante a noite. Essa sacarose é então transportada para os órgãos de armazenamento das plantas, como sementes, frutas, tubérculos e raízes (VANDEPUTTE & DELCOUR, 2004)

O tamanho e a forma dos grânulos de amido variam com a espécie, e a distribuição de tamanho varia com o estágio de desenvolvimento da planta e entre as fontes botânicas (SATIN, 2000). Estruturalmente, o amido é composto por cadeias de amilose e amilopectina. A amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4), originando uma cadeia linear. Já a amilopectina é formada por unidades de glicose unidas em

$\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) e  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6), formando uma estrutura ramificada (ALCÁZAR-ALAY; ANGELA; MEIRELES, 2015).

Atualmente, diversas pesquisas sobre a avaliação da relação existente entre a estrutura molecular do amido e seu comportamento em algumas propriedades físico-químicas sugerem que diversas características estruturais, como teor de amilose, distribuição de comprimento das cadeias de amilopectina e grau de cristalinidade no grânulo, poderiam estar intimamente relacionadas aos eventos associados com a gelatinização e retrogradação, tais como inchamento do grânulo, lixiviação de amilose e/ ou amilopectina, perda da estrutura radial (birrefringência), supra-molecular (cristalinidade) e molecular e recristalização. Com isso, o presente artigo de revisão tem por objetivo reunir tais estudos visando um maior entendimento da estrutura e das características dos componentes do amido e sua relação com propriedades físico-químicas de grande importância nutricional e tecnológica (DENARDIN; SILVA, 2009).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÁZAR-ALAY, S. C.; ANGELA, M.; MEIRELES, A. Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 215–236, 2015.
- ALVANI, K. et al. Physico-chemical properties of potato starches. **Food Chemistry**, v. 125, n. 3, p. 958–965, 2011.
- ALVES, S. B. Fungos Entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). . **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. v. 1p. 1163.
- ALVES, S. B.; LECUONA, R. E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). . **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 97–170.
- BURGES, H. D. **Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1998.
- CÁCERES, C. Mass rearing of temperature sensitive genetic sexing strains in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*). **Genetica**, The Hauge, v. 116, p. 107-116, 2002.
- CARVALHO, R.S. **Metodologia para monitoramento populacional de moscas-das-frutas em pomares comerciais**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2005. 17 p. (Circular Técnica, 75).
- DE LA ROSA, W.; LOPEZ, F. L.; LIEDO, P. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Diptera : Tephritidae) under laboratory conditions. **Journal of Economic Entomology**, v. 95, n. 1, p. 36–43, 2002.
- DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. DA. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 945–954, 2009.

DIMBI, S.; MANIANIA, N. K.; LUX, A. S.; EKESI, S.; MUEKE, K. J. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Wiedemann), *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera: Tephritidae). **Mycopathologia**, 156, p. 375-382, 2003.

EKESI, S.; MANIANIA, N. K.; LUX, S. A. Mortality in three African tephritid fruit fly puparia and adults caused by the entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 12, n. 1, p. 7-17, 2002.

EKESI, S.; MANIANIA, N. K.; LUX, S. A. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 83, n. 2, p. 157-167, 2003.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, R. P.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba, FEALQ, 2002. 920p.

GAUMANN, E. **Principles of plant infection**. London, Crosby Lockwood & Son Ltd. 1950, 543 p.

GODOY, M. J. S.; PACHECO, W. S. P.; MALAVASI, A. Moscas-das-frutas quarentenárias para o Brasil. In: SILVA, R. A.; LEMOS, W. P.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais**. Macapá: Embrapa Amapá, 2011. p. 111-131.

HELLWEGE, E. et al. **Compositions Comprising a Biological Control Agent and an Insecticide** Germany, 2018.

HENDRICHS J. et al. Medfly Areawide Sterile Insect Technique Programmes for Prevention, Suppression or Eradication: the Importance of Mating Behavior Studies. **Florida Entomologist**, v. 85, n. 1, p. 1-13, 2002.

KNIPLING, E. F. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. **Journal of Economic Entomology** , College Park, v. 48, p. 459-462, 1955.

LACEY, L.A.; FRUTOS, R.; KAYA, H. R.; VAIL, P. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do they Have a Future? **Biological Control**. v.21, p. 230-248, 2001.

LACEY L. A. Entomopathogens Used as Microbial Control Agents. In: LACEY, L. A. (Ed.). **. Microbial control of insect and mite pests - from theory to practice**. Yakima: Elsevier Inc., 2017. p. 3-12.

LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. **Carboidratos en alimentos regionales Iberoamericanos**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006. 648p

LEONEL, M. Analysis of the shape and size of starch grains from different botanical species. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 579-588, 2007.

MALACRIDA, A. R. et al. Globalization and fruitfly invasion and expansion: The medfly paradigm. **Genetica**, p. 1-9, 2007.

METCALF, R. L, Biography of the Medfly. In: MORSE J. G.; METCALF R. L.; CAREY, J R.; DAWELL, R. V, D. Eds. **The Medfly in California: Defining Critical Research**. University of California, Center for Exotic Pest Research: Riverside, California, 1995. p. 43-48.

PANIZZI, A. R.; PARRA J. R. P. (Ed). **Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Londrina: Embrapa Soja, 2009. 1164 p.

PAPADOPOULOS, N. T. et al. Seasonal and Annual Occurrence of the Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) in Northern Greece. **Entomological Society of America**, v. 94, p. 42-50, 2001.

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

SÁNCHEZ-ROBLERO, D. et al. Effect of *Beauveria bassiana* on the ovarian development and reproductive potential of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 9, p. 37–41, 2012.

SATIN, M. **Functional properties of starches**. In: International Symposium on Tropical Root and Tuber Crops, Thiruvananthapuram (Trivandrum), 2000.

SANTOS, K. F. T. DOS et al. Fruticultura: estudo do comércio internacional do mamão. **Revista Interface Tecnológica**, v. 15, n. 2, p. 323–335, 2018.

SANTOS, D. C. C. **Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no Submédio São Francisco: Levantamento populacional e frequência**. 2013, 55p. Dissertação (Mestrado em Horticultura Irrigada) - Universidade do Estado da Bahia. Juazeiro, Ba 2013.

SARWAR, M. Commonly Available Commercial Insecticide Formulations and Their Applications in the Field. **International Journal of Materials Chemistry and Physics**, v. 1, n. 2, p. 116–123, 2015.

SHELLY, T. E. et al. Aromatherapy in the Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae): Sterile Males Exposed to Ginger Root Oil in Prerelease Storage Boxes Display Increased Mating Competitiveness in Field-Cage Trials. **J. Econ. Entomol**, v. 97, n. 3, p. 846–853, 2004.

SOUZA FILHO, M. F. de; RAGA, A.; ZUCCHI, R. A. Moscas-das-frutas no estado de São Paulo: ocorrência e danos. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 24, n. 1, p. 45-69, 2003.

TOLEDO, J.; LIEDO, P.; FLORES, S. Use of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for fruit fly control: a novel approach. **Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance**, n. September, p. 127–132, 2006.

TOLEDO, J. et al. Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) under laboratory and field cage conditions. **Journal of economic entomology**, v. 100, p. 291–297, 2007.

TOLEDO, J. et al. Pathogenicity of three formulations of *Beauveria bassiana* and efficacy of autoinoculation devices and sterile fruit fly males for dissemination of conidia for the control of *Ceratitis capitata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 2017.

VANDEPUTTE, G.E.; DELCOUR, J.A. From sucrose to starch granule to starch physical behavior: a focus on rice starch. *Carbohydrate Polymers*, v.58, p.245-266, 2004.

WRAIGHT, S. P.; JACKSON, M. A.; DE KOCK, S. L. Production, Stabilization and Formulation of Fungal Biocontrol Agents. In: BUTT, T.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Eds.). **Fungal biocontrol agents - Progress, Problems and potential**. Wallingford: CAB International, 2001. p. 253–287.

ZUCCHI, R. A. Taxonomia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 187-192.

## CAPÍTULO I

ADIÇÃO DE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS EM DIETA DE MACHOS ESTÉREIS UTILIZADOS COMO VETORES DE FUNGOS VIRULENTOS A *Ceratitis capitata* (DIPTERA: TEPHRITIDAE)

## RESUMO

Machos estéreis de *C. capitata* podem ser vetores de fungos entomopatogênicos, aumentando a eficiência da técnica do inseto estéril. No entanto, eles também são suscetíveis aos patógenos e o uso de cepas de baixa virulência, tem pouca eficiência no controle das fêmeas. Este trabalho teve o objetivo de selecionar compostos que, adicionados à dieta de larvas e adultos, aumentam a tolerância dos machos estéreis da linhagem tsl Vienna-8. Em experimentos *in vitro* e *in vivo* o metilparabeno (MPB) e benzoato de potássio foram os que reduziram significativamente o crescimento em meio de cultura e a mortalidade de *C. capitata* pelos fungos *M. anisopliae* LCB255 e *B. bassiana* LCB289. No experimento *in vivo*, MPB 0,2% em dieta de larvas e adultos reduziu significativamente a mortalidade total de machos estéreis adultos tratados com as duas cepas ( $p < 0,05$ ), que causou alta mortalidade corrigida, maior que 80%, em adultos selvagens e a linhagem Vienna-8 não tratados. Em dois experimentos, a adição de MPB a dieta de larvas e adultos ou apenas em larvas, reduziu significativamente a mortalidade de machos tsl Vienna-8 ( $p < 0,05$ ). Houve também alteração significativa da curva de mortalidade dos insetos obtida pelo método de Kaplan-Meyer. Machos estéreis criados em dieta contendo MPB apresentaram maior sobrevida média (6 a 9 dias) comparados ao tratamento controle (3 a 4 dias) pelo teste de Mantel-Cox ( $p < 0,05$ ). O maior tempo de vida dos machos tratados com os fungos causou aumento significativo na mortalidade e reduziu a sobrevida média de fêmeas de *C. capitata*. Em conclusão, a criação massal de machos estéreis em dieta contendo MPB, aumentou a eficiência de transferência horizontal de propágulos infectivos de duas cepas virulentas de fungo entomopatogênicos.

**Keywords:** composto antifúngico; transferência horizontal; macho estéril.

ADDITION OF ANTIFUNGAL COMPOUNDS IN THE DIET OF STERILE MALES USED AS VECTORS OF VIRULENT FUNGI TO *Ceratitis capitata* (DIPTERA: TEPHRITIDAE)

ABSTRACT

Sterile males of *C. capitata* can be vector of fungi entomopathogenic, increasing the efficiency of the technique of the sterile insect. However, they are also susceptible to the pathogens and the use of strains of low virulence, it has low efficiency in the control of the females. This work had as deal to select composed that, added the diet of larvae and adults, they increase the tolerance of the sterile males of the strain tsl Vienna-8. In experiments in vitro and in vivo the metilparabeno (MPB) and potassium benzoate were the ones that they reduced the growth significantly in middle of culture and the mortality of *C. capitata* for the fungi *M. anisopliae* LCB255 and *B. bassiana* LCB289. In the experiment in vivo, MPB 0,2% in diet of larvae and adults and it reduced the total mortality of males sterile treated adults significantly with the two strains ( $p < 0,05$ ), who caused high corrected mortality, larger than 80%, in wild adults and the strain Vienna-8 non agreements. In two experiments, the addition of MPB the diet of larvae and adults or just in larvae, it reduced the mortality of males significantly Vienna-8 ( $p < 0,05$ ). There was significant alteration of the curve of mortality of the insects also obtained by the method of Kaplan-Meyer. Males sterile bred in diet containing MPB presented larger median survival (6 to 9 days) compared to the control treatment (3 to 4 days) by the test of Mantel-Cox ( $p < 0,05$ ). The survival of the males increased the mortality significantly and it reduced the median survival of females of *C. capitata* paired to the treated males. In conclusion, the creation in large scale of sterile males in diet containing MPB, it increased the efficiency of horizontal transfer of invectives propagules of two virulent stumps of fungi entomopathogenic.

**Key-word:** composed antifungal; horizontal transfer; sterile male.

## INTRODUÇÃO

A mosca-das-frutas *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) é uma praga chave da fruticultura de importância econômica mundial, devido à rápida reprodução, versatilidade e ampla variedade de hospedeiros (SARWAR, 2015). *C. capitata* causa dano direto aos frutos pela oviposição e desenvolvimento larval dentro dos frutos, com perdas superiores a 40%, mas também indiretos já que sua presença na área de produção enfrenta barreiras quarentenárias dos importadores (DHAMI et al., 2016). O acesso a mercados com restrições quarentenárias requer tratamentos pós-colheita que incluem tratamento hidrotérmico e irradiação, aumentando o custo de produção (SARWAR, 2015). O manejo integrado de *C. capitata* baseia-se no controle cultural, com recolhimento de frutos infestados, colheita antecipada e coleta massal, controle biológico utilizando inimigos naturais e entomopatógenos (DIAS et al., 2018). No entanto, a prática mais utilizada é a pulverização de inseticidas de amplo espectro ou como isca tóxica (EKESI, 2016).

Embora os inseticidas sejam eficazes, seu uso indiscriminado tem causado preocupação pelos riscos que representam a saúde humana, as populações de organismos benéficos e poluição ambiental e o surgimento de populações resistentes (MAGAÑA et al., 2007; RWOMUSHANA; TANGA, 2016). Outras formas de controle de *C. capitata* incluem o controle comportamental utilizando a técnica de aniquilação de machos ou a técnica do inseto estéril (DIAS et al., 2018; LIEDO, 2016). A Técnica do Inseto Estéril (TIE) é utilizada para suprimir ou erradicar populações de moscas-das-frutas de forma eficiente e ambientalmente segura em ambientes agrícolas e naturais. No entanto, a TIE tem maior eficiência e viabilidade econômica em áreas com baixa densidade populacional, ou em ambientes naturais onde há impedimentos para aplicações de outras técnicas de controle (Hendrichs et al., 1995; Hendrichs et al., 2002). Por outro lado, os fungos entomopatogênicos têm demonstrado potencial para aplicação como isca tóxica para o controle de adultos (BEDINI et al., 2018; MANIANIA; EKESI, 2016; YOUSEF; ARANDA-VALERA; QUESADA-MORAGA, 2018). Combinando as duas estratégias, Toledo et al., (2006) propuseram o uso de machos estéreis como vetores de propágulos infectivos de fungos entomopatogênicos a moscas-das-frutas.

A transmissão horizontal de propágulos infectivos é um dos principais mecanismos de disseminação de doenças dentro das populações em condições naturais e seu uso tem sido proposto para o controle de pragas agrícolas e urbanas (AVERY et al., 2009; DIMBI; MANIANIA; EKESI, 2013; FORLANI et al., 2011). Duas abordagens têm sido exploradas

para o controle de moscas-das-frutas: liberação de insetos previamente tratados ou substituição de inseticidas por agentes de controle biológico em armadilhas tóxicas com atrativo alimentar ou sexual (BAXTER, 2008). Na abordagem adotada por Toledo et al. (2006), machos estéreis são tratados com entomopatógenos após atingir a maturidade sexual e, quando liberados em campo, fazem a dispersão do inóculo através da transmissão horizontal do inóculo em interações sociais na população selvagem (TOLEDO et al., 2017). Em seus estudos, os autores mostraram que é possível aumentar a eficiência de controle e reduzir o número de librações de machos na TIE.

No entanto, os machos estéreis são altamente suscetíveis à infecção fúngica. Assim, a redução da quantidade de conídios, distribuição uniforme sobre o corpo do inseto e o uso de estirpes fúngicas de baixa virulência, pode aumentar a sua sobrevivência e a eficiência de transferência dos conídios para as fêmeas (TOLEDO et al., 2007, 2017). No entanto, estas práticas, principalmente a baixa densidade de conídios e a aplicação de cepas de baixa virulência, podem aumentar o tempo de vida das fêmeas e a oviposição. Neste trabalho, avaliamos a hipótese de que a adição de compostos antifúngicos à dieta de criação massal dos insetos pode aumentar a eficiência da transmissão horizontal de propágulos infectivos de estirpes altamente virulentas a *C. capitata* aumentando a sobrevivência dos machos estéreis após a liberação em campo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Criação e manipulação dos insetos*

Uma colônia de *C. capitata* foi criada em dieta artificial no Laboratório de Entomologia da Embrapa Semiárido de acordo com os procedimentos descritos por Silva Neto et al. (2012). Após a emergência, as fêmeas foram separadas dos machos e inseridas em gaiolas de laboratório com dieta e água *ad libitum* até atingir a maturidade sexual. Os insetos foram mantidos em condições ambientais controladas com temperatura de  $20-25 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $65 \pm 10\%$ , e fotofase de 14 horas.

Os machos estéreis de *C. capitata* linhagem mutante *tsl* Vienna-8 foram produzidos pela Biofábrica Moscamed Brasil (Juazeiro-BA), em dieta artificial, em condições ambientais controladas ( $T=18-23 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $UR=65 \pm 10\%$ , e fotofase de 14 horas), seguindo os protocolos de criação e controle de qualidade estabelecido pela Agência Internacional de Energia Atômica (FAO/IAEA/USDA, 2014). Os machos estéreis foram criados em quatro grupos: 1. Larvas e adultos alimentados com dieta contendo metilparabeno (MPB) 0.2% (L+A+); 2. Solução de MPB 0.2% somente na fase adulta por quatro dias (L-A+); 3. Larva alimentada com dieta contendo MPB 0.2% (L+A-); 4. Adulto e larva sem MPB, tratamento controle (L-A-). Nos tratamentos L+A+ e L-A+, os insetos adultos receberam o composto por quatro dias, durante a maturação sexual.

Os insetos foram irradiados em condições de hipóxia na fase de pupa, 24 a 48 horas antes da emergência com dose de 115 Gy utilizando equipamento de raios X, modelo Radsorce RS 2400. Concluído o processo de esterilização, as pupas foram transferidas para gaiolas de laboratório (30x30x30cm) sendo mantidas em salas com temperatura, umidade e fotofase controladas ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $65 \pm 10\%$ ; 14 horas de fotofase). Após a emergência, os machos estéreis tiveram livre acesso a dieta artificial e água até atingir a maturidade sexual para iniciar aos experimentos.

### *Cepas fúngicas, produção de conídios de grau técnico e formulações*

Neste estudo foi utilizada a cepa de *Beauveria bassiana* LCB289 e *Metarhizium anisopliae* LCB255 previamente selecionadas quanto à virulência a *C. capitata* em condições de laboratório. Estes fungos foram isolados a partir de amostras de solo agrícola coletadas em

estações experimentais da Embrapa Semiárido (Petrolina-PE). Antes de iniciar os experimentos, os isolados ficaram armazenados em água destilada estéril e mantidos em refrigerador doméstico (5°C) pelo método de Castellani (Aparecido, 2007) no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semiárido. Para sua multiplicação, foram transferidos para placas de Petri contendo meio Saboureaud (HiMedia Labs, Mumbai-India) adicionado de 1,0% de extrato de levedura (SDA+Y) e incubados em BOD a 28 ( $\pm$  1,0) °C por 15 dias.

Concentrados técnicos de conídios das estirpes LCB255 e LCB289 foram obtidos utilizando o procedimento descrito em (SANTOS et al., 2012). Resumidamente, após crescimento em meio SDA+Y, um inóculo foi transferido para frascos contendo arroz parboilizado com 50% de umidade (p/p). Após o máximo crescimento e esporulação, 10g foram transferidas para sacos plásticos contendo 200g de arroz. Após atingir máxima esporulação, foi parcialmente desidratado em estufa de circulação forçada (35 °C) até atingir umidade constante (10-12%). Após a desidratação os conídios foram separados dos grãos utilizando-se extrator de conídios Mycoharvester M5 (ACIS R&D, Devon, UK).

Formulações de conídios de LCB289 e LCB255 foram preparadas no laboratório tendo amido de milho como adjuvante com concentração de  $10^9$  conídios  $g^{-1}$ . O controle de qualidade dos conídios e das formulações foi realizada avaliando-se o vigor e viabilidade total dos conídios suspendendo 0,1 g das preparações em 10 ml de Triton X-100 a 0,01%, seguido de inoculação em placa contendo SDA+Y e contagem de 300 conídios em microscópio ótico (100x) à 16 e 40 horas após a inoculação (OLIVEIRA et al., 2015). A viabilidade dos conídios de *Beauveria bassiana* LCB289 e *Metarhizium anisopliae* LCB255 foram superiores 70% e a 95% a 16 e 40 horas, respectivamente, em todas as preparações.

### ***Tolerância a compostos antimicrobianos***

Os isolados foram avaliados *in vitro* e *in vivo* quanto à tolerância aos conservantes utilizados em dietas de machos estéreis. No teste *in vitro*, discos de micélio (0,5 cm) tomados da extremidade de colônias em crescimento ativo, foram transferidos para o centro de placas contendo meio de cultivo SDA+Y acrescido de concentrações crescentes (0; 0,75; 1,5; 3,0 e 4,5  $g.L^{-1}$ ) de ácido cítrico (Vetec, São Paulo - Brasil), benzoato de potássio (Vetec, São Paulo - Brasil) e metilparabeno (Nipagin®, LabSynth, São Paulo - Brasil). O crescimento das colônias foi medido diariamente até que o tratamento controle atingisse a borda das placas.

No experimento para avaliação da influência dos conservantes *in vivo*, ovos de *C. capitata* foram introduzidos em dietas contendo ácido cítrico 4,0  $g.kg^{-1}$ , benzoato de potássio

2,0 g.kg<sup>-1</sup> e MPB 2,0 g.kg<sup>-1</sup>. Cem insetos adultos foram tratados com 100 mg de formulação em amido de milho contendo 10<sup>9</sup> conídios g<sup>-1</sup> e transferidos para gaiolas em grupos de 20 insetos por gaiola. Um tratamento controle para cada dieta recebeu apenas aplicação de amido e os dados de mortalidade foram utilizados para correção da mortalidade natural pela fórmula de Abbot (FLEMING; RETNAKARAN, 1985). A mortalidade dos insetos foi registrada entre os períodos de 2 a 7 dias após a aplicação dos tratamentos. Insetos mortos no primeiro dia do experimento (24 h) foram descartados em todos os tratamentos. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os dados coletados em ambos os experimentos foram submetidos à análise da variância (Teste de F, p< 0,05) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p< 0,05).

#### ***Testando o efeito de metilparabeno na sobrevivência do macho estéril de C. capitata***

Avaliou-se o efeito da oferta de MPB em dieta para criação de *C. capitata* tsl Viena8 em quatro combinações: T1: L+A+ - larvas e adultos receberam a adição de metilparabeno 2,0 g kg<sup>-1</sup> de dieta; T2: L+A- apenas as larvas receberam dieta com MPB; T3: L-A+ apenas os adultos receberam dieta contendo de 2,0 g L<sup>-1</sup> de MPB durante quatro dias até a maturação sexual; T4: L-A- tratamento controle. Quatro dias após a emergência, os insetos oriundos dos diferentes tratamentos foram tratados com uma formulação em pó seco contendo 10<sup>9</sup> conídios g<sup>-1</sup> de *B. bassiana* LCB289 ou *M. anisopliae* LCB255. Um tratamento contendo apenas o formulante (amido de milho) foi aplicado à cada tratamento com MPB e utilizado como controle para correção da mortalidade natural. O experimento foi repetido por duas vezes.

Para aplicação da formulação, os insetos foram submetidos a *knock down* (-10°C por 30s) em freezer doméstico. Cento e cinquenta insetos foram cuidadosamente transferidos para potes de 250 mL contendo 100 mg das formulações e delicadamente agitados em movimento circular por 10s. A seguir, os potes foram abertos e inseridos em gaiolas de laboratório (30x30x30cm), onde os insetos permaneceram em repouso sob monitoramento por 4h. Os insetos foram transferidos em grupos de 30 para cinco novas gaiolas de laboratório e mantidos a 27 °C e 60-70% de UR e fotofase de 12 horas. A mortalidade dos insetos foi avaliada diariamente, descartando-se os insetos mortos nas primeiras 24 horas e registrando-se o efeito da adição de MPB sobre a mortalidade acumulada no período de 8 dias. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com duas formulações (LCB255, LCB289), quatro combinações de dietas e cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise da variância (p<0,05) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p<0,05).

### ***Transferência horizontal de inóculo e mortalidade de fêmeas***

Machos adultos de *C. capitata* tsl Vienna-8 foram criados conforme descrito anteriormente, aplicando-se os mesmos tratamentos com adição de MPB a dietas de larvas e adultos para avaliação da eficiência de transferência horizontal para fêmeas de *C. capitata*. Após alcançar a maturidade sexual, os insetos foram tratados com formulação contendo conídios de LCB289 ou LCB255 de forma similar ao descrito anteriormente.

Após a recuperação (4 horas em repouso), os machos saudáveis foram transferidos para gaiolas esterilizadas nas quais foram inseridas fêmeas selvagens, limpas, virgens e sexualmente maduras. Os insetos foram avaliados quanto a mortalidade ao longo do tempo por 8 dias e os cadáveres, após sexagem, foram esterilizados superficialmente utilizando o protocolo de etanol 70% hipoclorito de sódio e, após 3 lavagens sucessivas em água destilada estéril, depositados em placas de petri estéreis com papel de filtro autoclavados e umedecidos para avaliação da conidiogênese.

O experimento foi repetido por duas vezes, com grupos independentes de insetos, registrando-se a mortalidade diária a partir do segundo dia. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, e dados os submetidos à análise da variância ( $p < 0,05$ ) e as médias da mortalidade acumulada comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os dados de mortalidade corrigida ao longo do tempo para as repetições de um mesmo experimento foram reunidos e analisados pelo método de Kaplan-Meyer. Inicialmente, todos os tratamentos foram comparados entre si e, quando houve efeito significativo, as curvas de mortalidade dos tratamentos foram comparadas com o controle (L-A-) pelo teste de Mantel-Cox (ANDERSEN; VAETH, 2014), estimando-se a sobrevida média (tempo até a morte de 50% dos insetos).

## RESULTADOS

### Efeito da adição de antimicrobianos sobre o crescimento dos fungos *in vitro*

A adição de metilparabeno (MPB) ao meio de cultivo impediu completamente o desenvolvimento dos isolados, mesmo na menor concentração. Ambos os fungos apresentaram alta sensibilidade a benzoato de potássio, com redução no diâmetro de colônias maior que 50% nas doses superiores à  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  (Figura 1A). Contudo, a adição de ácido cítrico ao meio de cultivo não afetou o crescimento micelial dos fungos.

No experimento *in vivo*, a adição MPB, benzoato e sua combinação à dieta larval reduziu significativamente a mortalidade corrigida quando as pupas foram tratadas com LCB255 ( $F_{3,16} = 8,62$ ;  $p < 0,05$ ) e LCB289 ( $F_{3,16} = 9,39$ ;  $p < 0,05$ ). A mortalidade corrigida de pupas confirmada pela conidiogênese foi inferior a 60%, mesmo no tratamento controle, e significativamente menor nos tratamentos nos quais as dietas receberam adição dos compostos antimicrobianos, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) (Figura 1B).

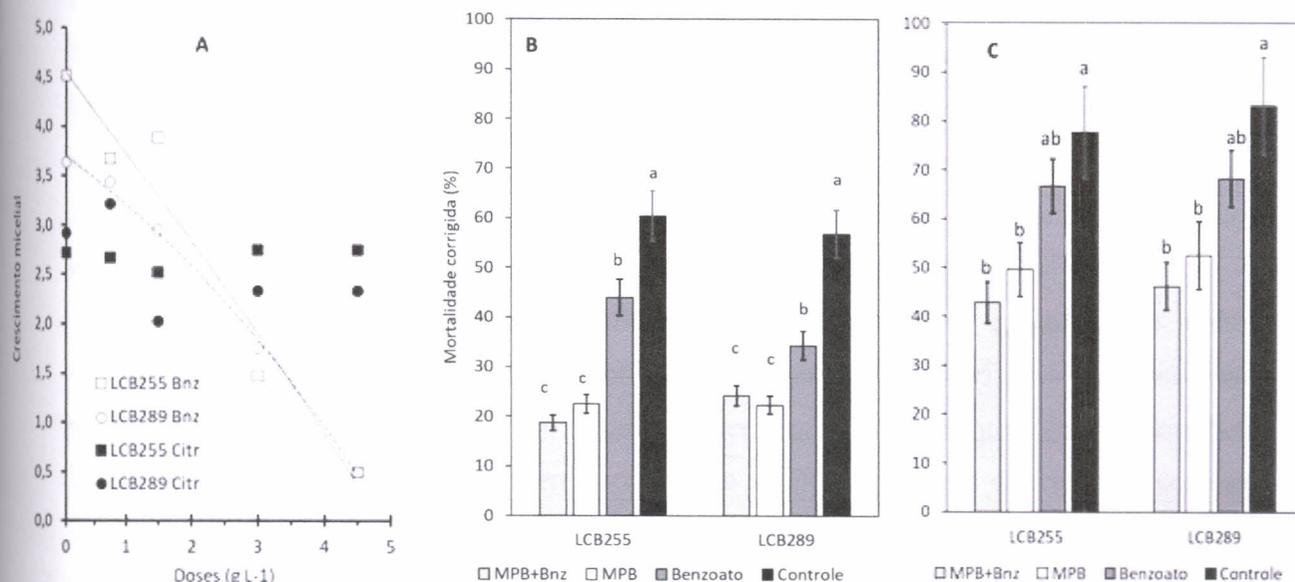


Figura 1 – Efeito da adição de ácido cítrico e benzoato de potássio sobre o crescimento micelial (A) dos fungos e da adição de  $4,0 \text{ g L}^{-1}$  de benzoato (Bnz) e metilparabeno (MPB) à dieta larval sobre a mortalidade de pupas (B) e adultos (C) de *C. capitata* com aplicação de suspensão contendo  $10^9$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  de *M. anisopliae* LCB255 *B. bassiana* LCB289. Todas as dietas receberam a adição de ácido cítrico  $4,0 \text{ g kg}^{-1}$ . Letras diferentes no topo das colunas indicam tratamentos diferentes entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para cada fungo.

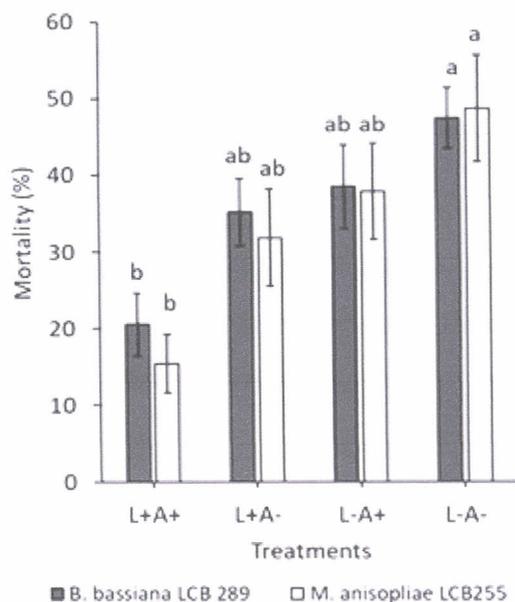
Neste trabalho, a mortalidade total nos diferentes experimentos foi corrigida pela mortalidade natural obtida no tratamento controle. Cadáveres de insetos mortos após 24 horas foram descartados e não computados pelo risco de sua morte ter sido causada pela manipulação dos insetos. A análise de variância mostrou haver efeito significativo das dietas sobre a mortalidade de insetos adultos infestados com LCB255 ( $F_{3,16} = 12,77$ ;  $p < 0,05$ ) e LCB289 ( $F_{3,16} = 11,26$ ;  $p < 0,05$ ). A mortalidade corrigida dos adultos do tratamento controle foi de 77,7 e 83,1% para LCB255 e LCB289, respectivamente. A adição de MPB puro ou sua mistura com benzoato promoveu a menor mortalidade em adultos de *C. capitata* em ambas as cepas, sendo significativamente diferentes do tratamento controle pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). O tratamento com adição apenas de benzoato não diferiu significativamente do controle para as duas cepas (Figura 1C).

#### *Efeito de MPB na dieta de C. capitata sobre a mortalidade de macho estéril e na transferência horizontal de inóculo*

A adição de MPB à dieta de pupas e/ou adultos de *C. capitata* teve efeito significativo sobre a mortalidade de adultos de machos mutantes *tsl* Vienna-8 tratados com uma formulação contendo conídios de *B. bassiana* LCB289 (Figura 4B) e *M. anisopliae* LCB255 ( $F_{3,31} = 6,86$ ;  $P = 0,042$ ) (Figura 2). No entanto, não houve diferença significativa entre os agentes de controle biológico pelo teste de F ( $p > 0,05$ ). Neste experimento, a adição de MPB às dietas na fase larval e adulta dos insetos resultou em mortalidade acumulada corrigida significativamente menor do que nos tratamentos com adição de MPB em apenas uma das fases de desenvolvimento que, por sua vez, apresentaram resultado similar ao controle (teste de Tukey  $p < 0,05$ ).

Dois experimentos avaliaram a influência de dieta de larvas e adultos ou ambas contendo MPB sobre a sobrevivência média e eficiência de transferência horizontal de inóculo em machos *tsl* Vienna-8 de *C. capitata*. No primeiro experimento, o tratamento com MPB em dieta larval e de adultos (L+A+) resultou em mortalidade significativamente diferente do controle oito dias após a aplicação de LCB289 pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), enquanto os demais tratamentos não diferiram entre si (Figura 3A). As curvas de mortalidade dos tratamentos L+A+ e L+A-, com sobrevivência média (SM) de 6,5 e 5,0 dias respectivamente, diferiram significativamente do controle que apresentou SM de 3,0 dias pelo teste de Mantel-Cox (Tabela 1). Quando os machos estéreis foram tratados com o isolado LCB255 (Figura 4C), a mortalidade corrigida de todos os tratamentos diferiu do controle pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) (Figura 3E) e também pelo teste de Kaplan-Meier (Tabela 1). O tratamento controle apresentou

SM de 3,0 dias, enquanto a adição de MPB a dieta de larvas e em ambas as fases aumentou para 6,0 e 6,5 dias.



Tratamentos - L+A+ - Adulto e larva alimentados com dieta adicionada de metilparabeno - MPB (Nipagin®) 0,2%; L+A- dieta contendo MPB 0,2% somente na fase larval; L-A+ dieta contendo MPB 0,2% somente na fase adulta; 4. L-A- -controle.

Figura 2 - Mortalidade confirmada ao final de 9 dias de avaliação de machos estéreis *tsl* Vienna 8, criados em dieta contendo fungicida em diferentes estágios de desenvolvimento e tratados com *B. bassiana* e *M. anisopliae* ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. As letras minúsculas comparam a mortalidade acumulada entre os tratamentos para cada fungo pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

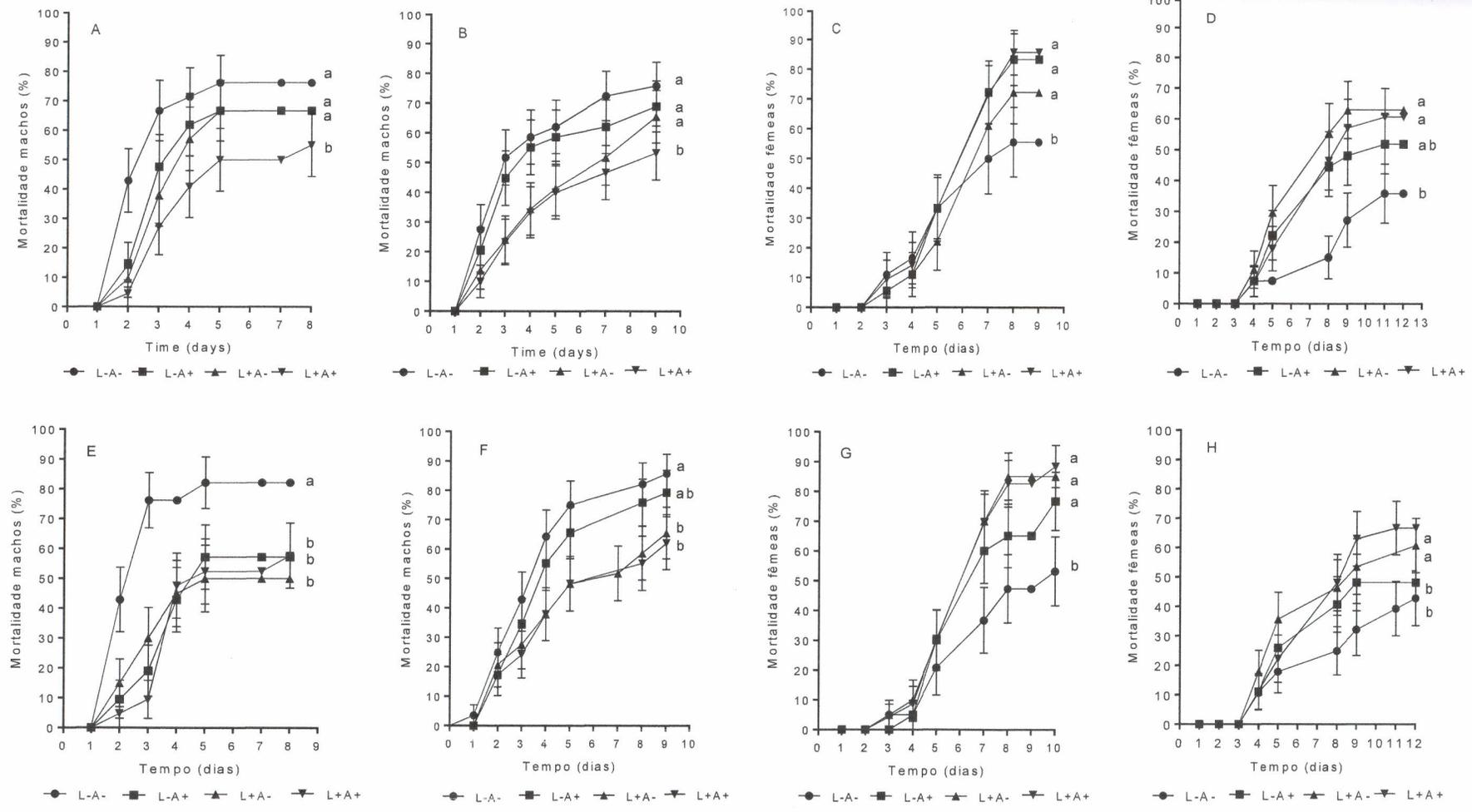
Os resultados do segundo experimento com machos estéreis foram similares ao primeiro quando tratados com LCB289 (Figura 3B) (Figura 4A). No entanto, apenas o tratamento L+A+ mostrou em curva de sobrevivência diferente do controle pelo teste de Kaplan-Meier com SM 8 dias, enquanto o controle apresentou SM de 4 dias. Os resultados obtidos para o isolado LCB255 também foram semelhantes ao primeiro experimento (Figura 3F), todos os tratamentos com MPB mostraram mortalidade acumulada estatisticamente similar entre si e menor do que o controle pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Neste experimento, o tratamento com oferta de MPB aos adultos foi estatisticamente similar ao controle. Os tratamentos L+A+ e L+A- apresentaram curva de mortalidade significativamente diferente do controle, com SM de 7 e 8 dias, respectivamente.

Em geral, os tratamentos com adição de MPB a dietas dos machos mostraram maior mortalidade acumulada de fêmeas do que o controle para ambos os fungos (figura 4D). Embora

com diferenças entre o número de total de fêmeas mortas, os resultados repetiram-se em ambos os experimentos e os tratamentos com adição de MPB à dieta larvas e adultos mostrou os resultados mais consistentes, com mortalidade e curva de sobrevivência significativamente diferentes do controle (Tabela 1).

Os resultados mostraram que a adição de um produto com atividade antifúngica à dieta de machos da linhagem tsl Vienna-8 permitiu aumentar a sua sobrevivência e, com isso, a transferência horizontal dos propágulos, resultando em mortalidade corrigida das fêmeas entre 60 e 90% entre os experimentos e cepas utilizadas (Figura 4E).

O tratamento resultou também em redução da sobrevivência média das fêmeas (Figura 4F). Em contrapartida, fêmeas reunidas ao grupo de machos que não receberam suplementação com MPB, no período larval, tiveram baixa mortalidade, mesmo nas condições experimentais de confinamento em gaiolas.



Tratamentos aplicados aos machos - L+A+ - Adulto e larva alimentados com dieta adicionada de metilparabeno - MPB (Nipagin®) 0,2%; L+A- dieta contendo MPB 0,2% somente na fase larval; L-A- -controle.

Figura 3 – Curva de mortalidade de machos de *C. capitata* tsl Viena8 criados com oferta de dietas contendo ou não metilparabeno em diferentes estágios de desenvolvimento e tratamento de formulação em pó-secos em amido solúvel e conídios de *B. bassiana* LCB289 e *M. anisopliae* LCB255. Os números após a identificação dos fungos indicam a repetição dos experimentos com diferentes grupos de machos tsl Viena8 (M) e fêmeas selvagens (F). A - LCB289 M 1; B - LCB289 M 2; C - LCB289 F 1; D - LCB289 F 2; E - LCB255 M 1; F - LCB255 M 2; G - LCB255 F 1; H - LCB255 F2.

Tabela 4 – Análise da curva de mortalidade de machos e fêmeas de *C. capitata* em experimento em gaiola no qual os machos da linhagem mutante *tsl* Vienna 8 foram criados em dietas contendo metilparabeno em diferentes fases do desenvolvimento e tratados com conídios de *B. bassiana* LCB289 ou *M. anisopliae* LCB255.

Testes	Experimento 1				Experimento 2			
	LCB289 Machos							
	Total	L-A+	L+A-	L+A+	Total	L-A+	L+A-	L+A+
Mantel-Cox	5,295	1,489	3,958	4,923	6,71	0,4167	3,222	5,213
GL	3	1	1	1	3	1	1	1
P	0,0214*	0,2224	0,0467*	0,0265*	0,0219*	0,5186	0,0727	0,0224*
Sobrevida mediana	3,0	4,0	5,0	6,5	3,0	4,0	7,0	9,0
LCB255 Machos								
Mantel-Cox	14,18	6,976	6,188	9,063	6,487	0,73	3,984	5,106
GL	3	1	1	1	3	1	1	1
P	0,0027**	0,0183*	0,0129*	0,0026**	0,0109*	0,3929	0,0459*	0,0238*
Sobrevida mediana	3,0	5,0	6,5	6,0	4,0	4,0	7,0	8,0
LCB289 Fêmeas								
Mantel-Cox	4,155	1,653	4,3155	5,247	7,073	2,049	5,472	4,913
GL	3	1	1	1	3	1	1	1
P	0,036*	0,1986	0,0547	0,0338*	0,0412*	0,1523	0,0193*	0,0425*
Sobrevida mediana	7,5	7,0	7,5	7,5	Ind.	11	8,0	9,0
LCB255 Fêmeas								
Mantel-Cox	6,16	1,959	4,733	5,601	4,742	0,2975	2,339	4,971
GL	3	1	1	1	3	1	1	1
P	0,0131*	0,1616	0,0296*	0,018*	0,0290*	0,5855	0,1262	0,0438*
Sobrevida mediana	10,0	7,0	7,0	7,0	Ind.	Ind.	9,0	9,0

\*Geral - comparação entre todas as curvas de sobrevivência pelo teste Loghank. Tratamentos aplicados aos machos - L+A+ - Adulto e larva alimentados com dieta adicionada de metilparabeno - MPB (Nipagin®) 0,2%; L+A- dieta contendo MPB 0,2% somente na fase larval; L-A+ dieta contendo MPB 0,2% somente na fase adulta; 4. L-A- -controle.

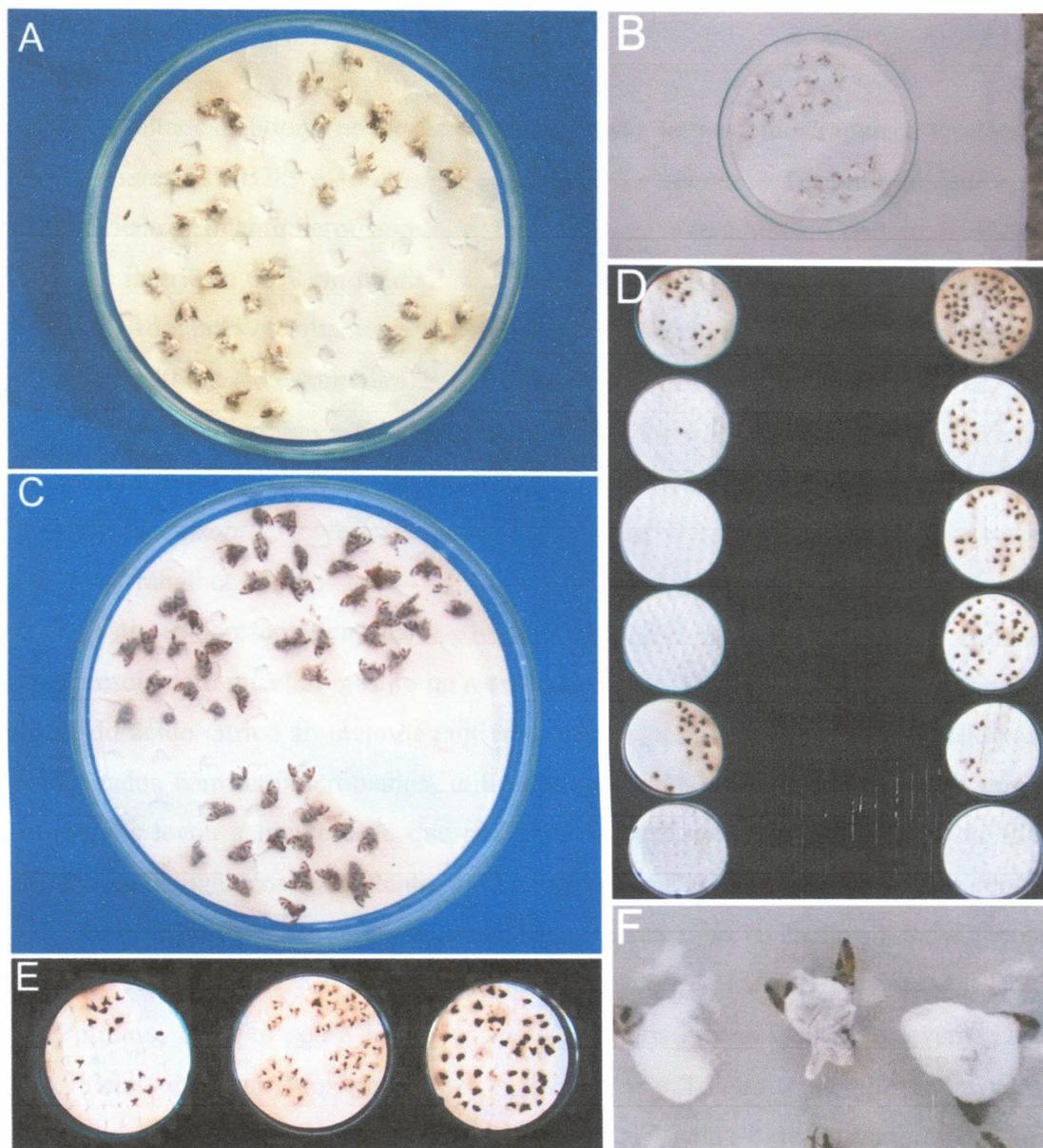


Figura 4- Mortalidade confirmada de fêmeas pela conidiogênese de *B. bassiana* LCB289 após o acasalamento com macho com MPB na fase larval e de adulto (L+A+) (4A) e *M. anisopliae* LCB255 (4C) em fêmeas de *C. capitata* acasaladas com macho estéril tsl Vienna-8 alimentado com MPB (L+A+), previamente tratado com  $1 \times 10^9$  conídios  $g^{-1}$  tendo amido de milho como adjuvante; mortalidade confirmada de machos estéreis tsl tratados com formulação de *B. bassiana* e amido de milho (4B); mortalidade acumulada de fêmeas acasaladas com macho estéril que foram alimentados com dieta contendo metilparabeno (MPB) na fase de adulto e na fase larval (L+A+) (direita) e mortalidade acumulada de fêmeas acasaladas com machos sem MPB (esquerda) (4D); mortalidade pelo tratamento controle (esquerda) (L-A-) e confirmação da mortalidade pelo fungo *B. bassiana* LCB289 (centro) (L+A+) e *M. anisopliae* LCB255(direita) (L+A+) (4E); crescimento do fungo *B. bassiana* em fêmea de *C. capitata* após copular com machos estéril tsl alimentado com MPB (L+A-)(4F).

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no primeiro experimento *in vivo* mostraram a virulência dos fungos *B. bassiana* LCB289 e *M. anisopliae* LCB255 à *C. capitata*, com mortalidade corrigida para o tratamento sem antimicrobianos maior que 80% entre os adultos. Contudo, a mortalidade de pupas foi inferior a 60% em média. Os pupários de moscas-das-frutas são esclerotizados e melanizados, tornando-os altamente resistentes à infecção por fungos entomopatogênicos (ANDERSEN, 2010). No estudo de Beris et al. (2013), por exemplo, a mortalidade de pupas de *C. capitata* com a aplicação de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Isaria fumosorosea* foi inferior a 24%. Contudo, a mortalidade de pupas de tefrítideos obtida por Ekesi et al. (2002) com a aplicação de *M. anisopliae* também variaram em torno de 50 a 60%, corroborando os resultados obtidos neste trabalho.

As estirpes apresentaram alta sensibilidade à adição de MPB ao meio de cultivo, não havendo crescimento micelial mesmo na menor dose testada. Por outro lado, não houve efeito da adição do ácido cítrico ao meio de cultivo e tolerância moderada ao benzoato de potássio. Estes resultados com antimicrobianos, utilizados em dietas para criação de *C. capitata*, em vários estudos levou a hipótese de que poderiam ser utilizados na combinação da TIE com fungos entomopatogênicos. No entanto, a infestação de machos de *C. capitata* com conídios de fungos entomopatogênicos afeta significativamente a sua sobrevivência e possivelmente, seu desempenho reprodutivo (NOVELO-RINCÓN et al., 2009; THAOCHAN; NGAMPONGSAI, 2015). Portanto, o efeito sobre linhagens industriais dos insetos pode ser severo. Desde os estudos iniciais desenvolvidos por Dimbi et al. (2003) e Toledo et al. (2006) foi verificada elevada mortalidade de machos adultos da linhagem tsl Vienna-8 de *C. capitata* tratados com diferentes estirpes de *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

A sensibilidade dos fungos aos antimicrobianos se confirmou no experimento com larvas de *C. capitata* criadas em dietas contendo benzoato, MPB e sua mistura, no qual houve redução significativa da mortalidade dos insetos. O efeito do MPB foi o mais forte, como mostrado pela ausência de efeito aditivo da dieta contendo mistura com benzoato. Este resultado reforçou a hipótese de que a adição de MPB à dieta poderia resultar em maior tolerância de machos estéreis tsl Vienna-8 à infecção fúngica, aumentando sua sobrevivência quando tratados com estirpes virulentas de fungos e tornando-os vetores de doenças e resultando em possível efeito aditivo ao efeito da TIE, como proposto por Toledo et al. (2006).

Apesar de altamente suscetível às duas estirpes fúngicas, a adição de MPB a dieta em ambas as fases de desenvolvimento do tsl reduziu a mortalidade total de machos adultos e

aumentou a sobrevida média, mas seu efeito foi mais forte quando os insetos receberam MPB na fase larval e adulta. A sobrevida mediana do tratamento sem adição de antimicrobianos nos experimentos utilizando os dois isolados variou entre 3 e 4 dias. Resultados similares foram obtidos por Dimbi et al. (2013) e Toledo et al. (2006) que mostraram que o tratamento do mutante *tsl* Vienna-8 com fungos entomopatogênicos resultou em sobrevida média de 2,6 e 4,2 dias, respectivamente. De forma geral, a adição de MPB a dieta de larvas aumentou a sobrevida mediana de machos estéreis para 6,5 e 9 dias para LCB289 e 6 e 8 dias para LCB255, similares aos valores obtidos por Quesada-Moraga et al. (2008) para machos de *C. capitata* criados em dieta contendo metilparabeno e propilparabeno e tratados com uma cepa de *M. anisopliae*.

As diferenças nas curvas de sobrevivência, sobrevida mediana e na mortalidade total observada para as fêmeas, mostram que o consumo de dieta contendo compostos antimicrobianos pelos machos, interferiu no processo infeccioso de estirpes virulentas. Mesmo quando a ingestão ocorreu apenas na fase larval houve acúmulo suficiente destes compostos, retardando a mortalidade dos machos e aumentando a transferência do inóculo no cortejo, cópula ou tentativa de cópula. É provável que, após a ingestão mais prolongada e em maior quantidade na fase larval, tenha havido acúmulo de MPB na hemolinfa e principalmente, no corpo gorduroso com posterior liberação aumentando a resistência dos insetos (KERKUT; GILBERT, 1985; YANG et al., 2014).

Poucos trabalhos estudaram os detalhes que influenciam a transmissão horizontal de patógenos durante o acasalamento de moscas-das-frutas, e seus resultados são de difícil comparação por utilizarem diferentes métodos de inoculação. No entanto, o tempo limitado de vida do inseto vetor é um fator importante na eficiência de transferência do inóculo. Desde seus estudos iniciais, Toledo et al. (2006) indicaram que fungos menos virulentos, principalmente com tempos letais mais longos, são preferíveis àquelas com tempos letais curtos. No entanto, o uso de isolados de baixa virulência pode causar também uma menor mortalidade das fêmeas ou permitir que realize a oviposição nos frutos.

A infecção dos machos pode resultar em alteração do seu padrão comportamental, interferindo no acasalamento e eficiência da TIE e na transferência horizontal do inóculo (EKESI; MOHAMED; DE MEYER, 2016). Embora, como apontado por Quesada-Moraga et al., (2008), existam poucos estudos relativos ao comportamento sexual de moscas-das-frutas infectadas ou infestadas com fungos entomopatogênicos, sabe-se que a infestação não alterou o cortejo das moscas (DIMBI et al., 2003). De fato, a transmissão de inóculo pode ocorrer no contato entre insetos durante o cortejo e tentativa de cópula, mesmo sem a sua efetivação (TOLEDO et al., 2007). Portanto, é possível que haja transferência para fêmeas virgens que

ainda realizariam cópulas com machos não tratados, ampliando a dispersão do inóculo dentro da população. Isto ainda pode se dar em interações sociais entre machos, como nos leks e montas homossexuais, e em caso de recópulas (LEFTWICH et al., 2012).

## REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, P. K.; VAETH, M. Survival analysis. **Wiley StatsRef: Statistics Reference Online**, p. 1–14, 2014.
- ANDERSEN, S. O. Insect cuticular sclerotization: A review. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 3, p. 166–178, 1 mar. 2010.
- AVERY, P. B. et al. *Diaphorina citri* (Hemiptera : Psyllidae) Infection and Dissemination of the Entomopathogenic Fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales : Cordycipitaceae) Under Laboratory Conditions. **Florida Entomologist**, v. 92, n. 4, p. 608–618, 2009.
- BAXTER, I. H. Entomopathogen based autodissemination for the control of *Plodia interpunctella* (Hübner) - an examination of the critical components. **Thesis**, p. 149, 2008.
- BEDINI, S. et al. Pathogenic potential of *Beauveria pseudobassiana* as bioinsecticide in protein baits for the control of the medfly *Ceratitis capitata*. **Bulletin of Insectology**, v. 71, n. 1, p. 31–38, 2018.
- BERIS, E. I. et al. Pathogenicity of three entomopathogenic fungi on pupae and adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Pest Science**, v. 86, n. 2, p. 275–284, 3 jun. 2013.
- DHAMI, M. K. et al. A real-time PCR toolbox for accurate identification of invasive fruit fly species. **Journal of Applied Entomology**, v. 140, n. 7, p. 536–552, ago. 2016.
- DIAS, N. P. et al. Fruit fly management research: A systematic review of monitoring and control tactics in the world. **Crop Protection**, v. 112, n. March, p. 187–200, 2018.
- DIMBI, S. et al. Host species, age and sex as factors affecting the susceptibility of the African Tephritid fruit fly species, *Ceratitis capitata*, *C. cosyra* and *C. fasciventris* to infection by *Metarhizium anisopliae*. **Anzeiger fur Schadlingskunde**, v. 76, n. 5, p. 113–117, 2003.
- DIMBI, S.; MANIANIA, N. K.; EKESI, S. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* in fruit flies and effect of fungal infection on egg laying and fertility. **Insects**, v. 4, n. 2, p. 206–216, 29 maio 2013.
- EKESI, S. Baiting and male annihilation techniques for fruit fly suppression in Africa. In: **Fruit fly research and development in africa - Towards a sustainable management strategy to improve horticulture**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 275–292.
- EKESI, S.; MANIANIA, N. K.; LUX, S. A. Mortality in three African tephritid fruit fly puparia and adults caused by the entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 12, n. 1, p. 7–17, fev. 2002.
- EKESI, S.; MOHAMED, S. A.; DE MEYER, M. Lessons Learnt and Future Perspectives. In: **Fruit fly research and development in africa - Towards a sustainable management strategy to improve horticulture**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 773–778.
- FLEMING, R.; RETNAKARAN, A. Evaluating single treatment data using abbot's formula with reference to insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 78, n. 6, p. 1179–1181, 1985.

FORLANI, L. et al. Contribution of the horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the overall performance of a fungal powder formulation against *Triatoma infestans*. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 2, p. 135–140, 2011.

HENDRICHS J. et al. Medfly areawide sterile insect technique programmes for prevention, suppression or eradication: the importance of mating behavior studies. **Florida Entomologist**, v. 85, n. 1, p. 1–13, 2002.

HENDRICHS, J.; FRANZ, G.; RENDON, P. Increased effectiveness and applicability of the sterile insect technique through male-only releases for control of Mediterranean fruit flies during fruiting seasons. **Journal of Applied Entomology**, v. 119, n. 1–5, p. 371–377, 1995.

KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology V. 10**. Oxford, UK: Pergamon Press, 1985.

LEFTWICH, P. T. et al. Variation in adult sex ratio alters the association between courtship, mating frequency and paternity in the lek-forming fruitfly *Ceratitis capitata*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 25, n. 9, p. 1732–1740, set. 2012.

LIEDO, P. Management of Fruit Flies in Mexico. In: **Fruit fly research and development in africa - Towards a sustainable management strategy to improve horticulture**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 695–704.

MAGAÑA, C. et al. Resistance to malathion in field populations of *Ceratitis capitata*. **J Econ Entomol**, v. 100, n. 6, p. 1836–1843, 2007.

MANIANIA, J. N. K.; EKESI, S. Development and application of mycoinsecticides for the management of fruit flies in Africa. In: **Fruit fly research and development in africa - Towards a sustainable management strategy to improve horticulture**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 307–324.

NOVELO-RINCÓN, L. F. et al. Mating performance of sterile Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Dipt., Tephritidae) males used as vectors of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Journal of Applied Entomology**, v. 133, n. 9–10, p. 702–710, dez. 2009.

OLIVEIRA, D. G. P. et al. A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. **Journal of Microbiological Methods**, v. 119, p. 44–52, 1 dez. 2015.

QUESADA-MORAGA, E. et al. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**, v. 47, n. 1, p. 115–124, out. 2008.

RWOMUSHANA, I.; TANGA, C. M. Fruit fly species composition, distribution and host plants with emphasis on mango-infesting species. In: **fruit fly research and development in Africa - Towards a sustainable management strategy to improve horticulture**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 71–106.

SANTOS, P. S. et al. Selection of surfactant compounds to enhance the dispersion of *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 3, p. 281–292, 2012.

SARWAR, M. Quarantine Treatments for Mortality of Eggs and Larvae of Fruit Flies (Diptera : Tephritidae ) Invading Fresh Horticulture Perishable Produces 3 . Techniques of Improved Quarantines for Fruit Flies. **International Journal of Animal Biology**, v. 1, n. 5, p. 196–201,

2015.

SILVA NETO, A. M. DA et al. Mass-rearing of Mediterranean fruit fly using low-cost yeast products produced in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 69, n. 6, p. 364–369, dez. 2012.

THAOCHAN, N.; NGAMPONGSAI, A. Effects of auto-disseminated *Metarhizium guizhouense* PSUM02 on mating propensity and mating competitiveness of *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 25, n. 6, p. 629–644, 24 set. 2015.

TOLEDO, J. et al. **Use of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for fruit fly control: a novel approach.** Fruit Flies of Economic Importance: From Basic to Applied Knowledge. **Anais...** Salvador: 2006 Disponível em: <[https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/42/109/42109317.pdf](https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/42/109/42109317.pdf)>. Acesso em: 26 jan. 2019

TOLEDO, J. et al. Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) under laboratory and field cage conditions. **Journal of economic entomology**, v. 100, p. 291–297, 2007.

TOLEDO, J. et al. Pathogenicity of three formulations of *Beauveria bassiana* and efficacy of autoinoculation devices and sterile fruit fly males for dissemination of conidia for the control of *Ceratitis capitata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 164, n. 3, p. 340–349, set. 2017.

YANG, W. J. et al. De novo cloning and annotation of genes associated with immunity, detoxification and energy metabolism from the fat body of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e94470, 7 abr. 2014.

YOUSEF, M.; ARANDA-VALERA, E.; QUESADA-MORAGA, E. Lure-and-infect and lure-and-kill devices based on *Metarhizium brunneum* for spotted wing *Drosophila* control. **Journal of Pest Science**, v. 91, n. 1, p. 227–235, 2018.

## CAPÍTULO II

FORMULAÇÃO DE CONÍDIOS PARA A APLICAÇÃO DE ESTIRPES VIRULENTAS DE *Metarhizium anisopliae* E *Beauveria bassiana* UTILIZANDO MACHOS ESTÉREIS COMO VETORES

## RESUMO

*Ceratitis capitata* (Wiedeman) causa elevados danos econômicos diretos e indiretos a produção de frutos no mundo. A Técnica do Inseto Estéril (TIE) é um método de controle autocida no controle dessas pragas e associadas aos fungos entomopatogênicos pode apresentar maior eficiência. O objetivo deste trabalho foi selecionar formulações contendo estirpes virulentas de fungos para o uso de machos estéreis como vetores dos patógenos em populações de *Ceratitis capitata*. Os machos tsl Vienna-8 foram criados em dieta contendo composto antifúngico e tratados com diferentes formulações contendo conídios de *Beauveria bassiana* LCB289 em amido de milho, batata e mandioca, farinha de arroz, dióxido de sílica. A aplicação foi realizada após o nocaute dos machos no frio ( $-10^{\circ}\text{C}/30\text{s}$ ) aos 4 dias de idade, avaliando-se a recuperação, a mortalidade acumulada e a sobrevivência média da linhagem tsl. Em seguida, os insetos tratados foram pareados com fêmeas virgens por 24 h que, por sua vez, foram transferidas para gaiolas contendo machos da linhagem de laboratório, avaliando-se a mortalidade nos diferentes grupos de insetos. Em experimento similar, os machos foram tratados com formulações de  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  conídios  $\text{g}^{-1}$  de LCB289, avaliando-se o número de conídios aderidos ao tegumento dos machos e das fêmeas até a terceira cópula. Não houve diferença significativa na recuperação dos machos tratados com LCB289. A aplicação de conídios não formulados e de formulação em sílica causou mortalidade de 100% dos machos mutante tsl, enquanto a aplicação de formulação com amido de milho e mandioca resultou em maior sobrevivência dos machos tsl e alta mortalidade de fêmeas e de machos não tratados com os quais foram pareadas a seguir. O LCB289 apresentou eficiente na transferência horizontal, com efeito proporcional às doses utilizadas e ligeira redução do número de conídios aderidos entre as cópulas. A sobrevivência mediana de machos tsl tratados com LCB289 e fêmeas foi de 5,5 e 4,2

dias, respectivamente. A liberação de machos estéreis tratados com formulação de *B. bassiana* LCB289 em amido de mandioca contendo  $10^9$  conídios  $g^{-1}$  resultou em mortalidade média de 64% de fêmeas em gaiola de campo, com 4,6 dias de sobrevivência mediana para as fêmeas, reduzindo a eficiência reprodutiva da população. Em conclusão, a formulação em amido de milho ou mandioca pode ser eficientemente utilizada para o tratamento prévio de machos estéreis *tsl* Vienna-8 para exploração da transferência horizontal de propágulos infectivos dentro da população selvagem de *C. capitata*, aumentando a eficiência da TIE.

**Palavras-chave:** técnica do inseto estéril, transferência horizontal, moscas-das-frutas.

FORMULATION OF VIRULENT STRAINS OF *Metarhizium anisopliae* AND *Beauveria bassiana* BY USING STERILE MALES OF *C. capitata* (WIEDEMAN) AS VECTORS

ABSTRACT

*Ceratitis capitata* causes direct and indirect economic damages to fruit production in the world. The Sterile Insect Technique (SIT) is a autocide method control for the control these pests and associated entomopathogenic fungi can to present greater efficiency. The goal of this work was to select formulations containing virulent strains of fungi for the application using sterile males as vectors. Sterile male (SM) tsl Vienna-8 males were raised in a diet containing antifungal compound and treated with different formulations containing conidia of *Beauveria bassiana* LCB289 and *Metarhizium anisopliae* LCB255 in corn, potato, and cassava starch, rice flour, silica dioxide. The application was performed after the knockout of the SM, evaluating the recovery, the accumulated mortality and the median survival of the insects. The treated insects were paired with virgin females for 24 h, which were then transferred to cages with males of a laboratory colony. Corrected insect mortality in the different groups was monitored. In a similar experiment, the males were treated with formulations containing  $10^7$ ,  $10^8$  and  $10^9$  conidia  $g^{-1}$  of the two fungi. It was evaluated the number of conidia adhered to the integument of males and in a different group of females for three subsequent days. There was no significant difference in the recovery of LCB289-treated males. The application of unformulated conidia and silica formulation resulted in 100% mortality of SM, while application of formulation in maize and cassava starch resulted in higher SM survival and high mortality of females and males not treated. There was a significant effect of the strains on conidia adhesion and subsequent horizontal transfer. LCB289 showed the highest horizontal transfer, with proportional effect to the doses used and a slight reduction in the number of conidia adhered between the copula. Females mortality curves were statistically different between strains, with a median survival of 5.5 and 4.2 days for LCB289 and 6.0 and 7.0 days for LCB255. The release of sterile males treated with *B. bassiana* LCB289 formulation in cassava starch containing 109  $g^{-1}$  conidia resulted in average mortality of 64% of females in a field cage, with a median survival of 4.6 days for females. In conclusion, the starch formulation of maize or cassava can be efficiently used for the pretreatment of sterile males tsl Vienna-8 for exploration of the horizontal transfer of infective propagules within the wild population of *C. capitata*, increasing the efficiency of the TIE.

**Key-words:** Biological control; Horizontal transference; Fungi formulati

## 1. INTRODUÇÃO

A mosca-das-frutas *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) é considerada a praga de maior importância econômica para a fruticultura em regiões tropicais e subtropicais, apresentando alta prolificidade e ampla gama de hospedeiros (FOLLETT et al., 2019; MALACRIDA et al., 2007). Os danos econômicos decorrem da oviposição nos frutos, causando danos diretos pelo desenvolvimento das larvas ou pela infecção por microrganismos oportunistas, tornando-os impróprios para consumo *in natura*. A ocorrência de moscas-das-frutas também tem implicações quarentenárias. Países importadores indenos impõem barreiras fitossanitárias que aumentam os custos de produção e colocam em risco a exportação de frutas frescas (MANIANIA; EKESI, 2009).

O manejo integrado (MIP) de moscas-das-frutas envolve um conjunto de práticas culturais e fitossanitárias. No MIP, o controle dos adultos de *C. capitata* tem sido baseado no uso de inseticidas organofosforados, piretróides e spinosina, aplicados na forma de iscas tóxicas misturados a um atrativo alimentar (PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019). Contudo, o uso de produtos químicos tem causado grande preocupação tanto pelo risco de contaminação dos frutos por resíduos quanto pelo risco de desenvolvimento de populações resistentes das pragas (MICHAUD, 2003). Assim, formas de controle ambientalmente amigáveis têm sido abordadas com o uso de parasitoides (DE PEDRO et al., 2019), aniquilação de machos (MANOUKIS et al., 2019), controle microbiano (BERIS et al., 2013) e a Técnica do Inseto Estéril – TIE (BADII et al., 2015).

No controle com a TIE, machos estéreis são liberados em campo para copular com fêmeas férteis selvagens interferindo na reprodução da praga. A TIE é considerada a técnica mais eficaz e ambientalmente segura para o controle de *C. capitata*, interferindo diretamente na taxa de natalidade da sua população (LANDETA-ESCAMILLA et al., 2016). Seu emprego tem sido restrito a alguns programas, mas novos estudos têm buscado aumentar eficiência da TIE na

supressão ou erradicação de moscas-das-frutas (PARANHOS et al., 2006). Uma nova abordagem foi proposta inicialmente por Toledo et al., (2006a, 2007) e preconiza o uso dos machos estéreis como vetores de propágulos infecciosos de fungos entomopatogênicos. Segundo esta abordagem, os machos tratados com conídios dos fungos seriam capazes de transmiti-los para as fêmeas selvagens durante a cópula. Depois destes estudos iniciais, outros trabalhos também mostraram a viabilidade do uso da transmissão horizontal de propágulos infectivos de fungo por machos estéreis em moscas-das-frutas. O estudo de Sánchez-Roblero et al. (2012), por exemplo, mostrou que a transmissão horizontal reduziu a fertilidade das fêmeas. Na Guatemala, a liberação de machos estéreis infestados reduziu significativamente a população de moscas-das-frutas em condições de campo, sem causar efeito deletério sobre populações de insetos não-alvo (FLORES et al., 2013). Além disso, a transmissão horizontal de patógenos dentro da espécie-alvo tem se mostrado eficiente no controle de pragas agrícolas e urbanas de várias ordens como Diptera (CÁRCAMO et al., 2015; REYES-VILLANUEVA et al., 2011; TOLEDO et al., 2017), Blattodea (QUESADA-MORAGA et al., 2004) e Lepidoptera (FURLONG; PELL, 2001).

Os fungos entomopatogênicos, principalmente *Beauveria bassiana* (Balsamo) e *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff), têm sido os agentes de controle mais utilizados nos estudos com transferência horizontal devido à capacidade de infectarem o hospedeiro pela cutícula e por possuírem estirpes altamente virulentas contra *C. capitata* (DIMBI et al., 2003b; QUESADA-MORAGA, MARTIN-CARBALLO, GARRIDO-JURADO, 2008). O processo de infecção desses fungos começa com a adesão dos conídios à cutícula do inseto, germinação e penetração no tegumento por meio de produção e secreção enzimas hidrolíticas (proteases, lipases e quitinases) (CHANDLER, 2016).

A mistura dos propágulos fúngicos com outros materiais, os adjuvantes, aumenta a sua sobrevivência e a eficiência de aplicação e controle (SARWAR, 2015). Alguns dos

adjuvantes mais comumente encontrados nas formulações em pó molhável (WP) são amidos, sílica, terra diatomácea, talco, caulim e atalpigita (BURGES, 1998; HELLWEGE et al., 2018). Neste estudo, considerou-se que uma formulação WP seja a abordagem mais viável para a exploração da transferência horizontal, no entanto não há relatos sobre formulações específicas para o tratamento de insetos a serem utilizados como vetores. A aplicação de formulações inadequadas no tratamento dos machos estéreis pode afetar o seu comportamento sexual, diminuindo a eficiência da TIE. Ou seja, pode haver componentes nas formulações que podem interagir com o tegumento do macho e interferir no cortejo da fêmea. A intensidade dessa interação, principalmente as hidrofóbicas, promove adesão excessiva das partículas nos machos e isso dificulta a transferência horizontal. Além disso, os tamanhos dessas partículas exercem influência sobre o peso dos machos tratados limitando o seu voo e diminuindo o alcance de fêmeas em campo.

Em estudo anterior, Leal (2019) demonstrou que o uso de machos tsl Vienna-8 previamente tratados com conídios de *B. bassiana* ou *M. anisopliae* foi eficiente na transferência horizontal dos propágulos resultando em elevada mortalidade das fêmeas. Além disso, o estudo mostrou que a adição de compostos antimicrobianos a dieta de larvas e adultos aumentou a sobrevivência dos machos após a aplicação dos fungos, aumentando a eficiência de controle. Considerando que a adesão dos conídios é uma fase importante tanto para o início do processo infectivo quanto para a transferência horizontal, a seleção de formulações adequadas pode interferir na eficiência de controle. Assim, o presente trabalho teve como objetivo selecionar fontes de amido para a formulação de *B. bassiana* para aplicação em machos estéreis tsl Vienna-8, de forma a obter máxima eficiência na transmissão horizontal de propágulos infecciosos para fêmeas de *Ceratitis capitata* em condições de laboratório e campo.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 *Produção de machos estéreis tsl Vienna-8 e de adultos de C. capitata*

Os machos estéreis de *C. capitata* linhagem mutante tsl Vienna-8 foram produzidos pela Biofábrica Mosamed Brasil (Juazeiro-BA), em dieta artificial com adição de metilparabeno (Nipagin®), em condições ambientais controladas ( $T=18-23 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $UR=65 \pm 10\%$ , e fotofase de 14 horas), seguindo os protocolos de criação e controle de qualidade estabelecido pela Agência Internacional de Energia Atômica (FAO/IAEA/USDA, 2014). A esterilização dos machos foi realizada utilizando-se equipamento de raios X modelo RS 2400 (Radsourc, Buford-GA, USA). Os insetos foram irradiados em condições de hipóxia na fase de pupa, 24 a 48 horas antes da emergência com dose de 115 Gy. Concluído o processo de esterilização, as pupas foram transferidas para gaiolas de laboratório (30x30x30cm) sendo mantidas em salas com temperatura, umidade e fotofase controladas ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $65 \pm 10\%$ ; 14 horas de fotofase). Após a emergência, os machos estéreis tiveram livre acesso a dieta artificial (3 açúcar: 1 Bionex®) e água até atingir a maturidade sexual (4 dias).

Machos e fêmeas da linhagem de laboratório foram obtidos da colônia de *C. capitata* criada em dieta artificial no Laboratório de Entomologia da Embrapa Semiárido de acordo com os procedimentos descritos por Silva Neto et al. (2012). Os insetos foram mantidos em condições ambientais controladas com temperatura de  $20-25 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $65 \pm 10\%$  e fotofase de 14 horas.

### 2.2 *Obtenção das formulações a partir de duas estirpes virulentas*

Os fungos *Beauveria bassiana* LCB289 e *Metarhizium anisopliae* LCB255 previamente selecionados quanto à virulência à *C. capitata* foram isolados a partir de amostras de solo agrícola coletadas nas estações experimentais da Embrapa Semiárido (Petrolina-PE). As cepas foram armazenadas em água destilada estéril, em refrigerador doméstico ( $5^\circ\text{C}$ ) (APARECIDO

et al., 2007) no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semiárido. Para sua multiplicação, foram transferidos para placas de Petri contendo meio Saboureaud agar (HiMedia Labs, Mumbai-India) adicionado de 1,0% de extrato de levedura (SDA+Y) e incubados em BOD a  $28 (\pm 1,0) ^\circ\text{C}$  durante 15 dias.

Os concentrados técnicos de conídios das estirpes LCB255 e LCB289 foram obtidos utilizando o procedimento descrito em Santos et al. (2012). Resumidamente, após crescimento em meio SDA+Y, uma suspensão de conídios ( $10^8 \text{ mL}^{-1}$ ) obtida pela raspagem de placa densamente colonizada em Triton X-100 0,01% foi transferida para frascos contendo arroz parboilizado com 50% de umidade (p/p). Após o máximo crescimento e esporulação, 10g foram transferidas para sacos plásticos contendo 200g de arroz com 50% de umidade (p/p). Após atingir máxima esporulação, a mistura de arroz e biomassa fúngica foi parcialmente desidratada em estufa de circulação forçada ( $35 ^\circ\text{C}$ ) até atingir umidade constante (10 - 12%) e os conídios foram separados dos grãos utilizando-se o extrator de conídios Mycoharvester M5 (ACIS R&D, Devon, UK).

As formulações foram preparadas utilizando como adjuvante diferentes fontes de amido de grau alimentício: farinha de arroz e amido de milho (Oetker, São Paulo, Brasil), amido de mandioca e de batata (Yoki, São Paulo, Brasil), e dióxido de sílica micronizada ( $\text{SiO}_2$ ) (Vetec Química, São Paulo, Brasil). Os adjuvantes foram submetidos ao método de peneiramento fracionado para determinação da granulometria média ponderada, utilizando-se 10 g das amostras (OLIVEIRA; BRITO; CEREDA, 2018). A partir desta análise verificou-se que a farinha de arroz apresentou granulometria média ponderada (GMP) de  $107,23 \mu\text{m}$ , amido de batata  $\text{GMP} = 32,80 \mu\text{m}$ , amido de mandioca com  $\text{GMP} = 0,14 \mu\text{m}$  e amido de milho  $\text{GMP} = 0,92 \mu\text{m}$ .

As formulações foram preparadas com a adição de uma massa de conídios para alcançar uma concentração final de  $10^9$  conídios  $\text{g}^{-1}$ . O controle de qualidade dos conídios e das

formulações foi realizado avaliando-se o vigor e viabilidade total dos conídios, suspendendo-se 0,1 g das preparações em 10 ml de Triton X-100 a 0,01%, seguido de inoculação em placa contendo SDA+Y e contagem de 300 conídios em microscópio ótico (100x) à 16 e 40 horas após a inoculação (OLIVEIRA et al., 2015).

### **2.3 Avaliação da transferência horizontal durante a cópula e recópula.**

#### **2.3.1 Tratamento dos machos e determinação da adesão de conídios**

As diferentes formulações foram aplicados nos machos tsl Vienna-8 submetidos à *knock down* (-10°C/30s) em freezer doméstico. A seguir, cento e cinquenta insetos foram cuidadosamente transferidos para potes de 250 mL contendo 100 mg de cada formulação e foram delicadamente agitados em movimento circular por 10s. Os potes foram abertos e inseridos em gaiolas de laboratório (30x30x30cm) onde os insetos permaneceram em observação, avaliando-se a retomada de vôo e alimentação por 4 horas.

Em seguida, cinco dos machos tratados e que apresentavam comportamento aparentemente normal foram selecionados ao acaso e removidos da gaiola para a avaliação da quantidade de conídios aderidos ao corpo. Para isso, os insetos foram transferidos individualmente para microtubos contendo 1 mL de Triton X-100 0,01%, seguida de agitação por 20s em agitador mecânico tipo vórtex. Uma alíquota de 100  $\mu$ L da suspensão foi inoculada em triplicata em placas de Petri com meio de cultura semi-seletivo (0,2 g de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 0,9 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g de KNO<sub>3</sub>; 0,5 de NH<sub>4</sub>Cl; 10 g de glicose; 20 g de ágar; 1 mL de cloranfenicol; 1 mL de estreptomicina). O número de colônias foi registrado após crescimento e início da esporulação dos fungos. Nesta fase do experimento avaliou-se a recuperação da atividade dos insetos e o número de conídios aderidos ao tegumento dos insetos após 4 horas. Os dados para os tratamentos contendo sílica ou conídios puros não foram utilizados para análise de variância por apresentarem 100% de insetos incapacitados.

### **2.3.2 Avaliação da transferência horizontal**

Os machos tsl Vienna-8 tratados foram transferidos para novas gaiolas de laboratório nas quais foram introduzidas fêmeas saudáveis e sexualmente maduras. Após 24 horas, as fêmeas foram transferidas para gaiolas onde estavam machos saudáveis e não tratados da linhagem de laboratório. Todos os insetos receberam dieta artificial e água *ad libitum* e a mortalidade de todos os machos e fêmeas foi registrada diariamente até o final do experimento.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com 4 adjuvantes e 2 fungos, com 5 repetições e o experimento foi repetido por duas vezes com grupos independentes de insetos. Um controle contendo apenas os adjuvantes foi utilizado para cada tratamento para a correção da mortalidade. A mortalidade de insetos no primeiro dia após a aplicação dos tratamentos não foi computada para a análise dos experimentos. Os dados coletados foram corrigidos pela mortalidade natural dos tratamentos controle pela fórmula de Schneider-Orelli (PÜNTENER, 1981).

A recuperação dos insetos, o número de conídios aderidos ao tegumento e a mortalidade acumulada foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ( $p < 0,05\%$ ). Avaliou-se a curva de mortalidade de machos e fêmeas pelo método de Kaplan-Meyer. Para esta análise, as repetições foram agrupadas e as curvas de mortalidade foram comparadas com o controle, pelo teste de Mantel-Cox ( $p < 0,05$ ).

### **2.4 Efeito da concentração da formulação na transferência horizontal de conídios**

Os machos tsl foram tratados com formulação de amido de mandioca com três concentrações de conídios:  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  conídios  $g^{-1}$  de LCB289 e de LCB255. Os tratamentos foram aplicados conforme descrito anteriormente. Após o repouso de 4 horas, 10 machos tsl de cada tratamento foram individualizados em gaiolas e pareados com 10 fêmeas, virgens e

sexualmente maduras, com livre acesso à dieta e a água. No dia seguinte, as fêmeas foram removidas e três machos e cinco fêmeas, de cada tratamento foram selecionados para contagem dos conídios.

Em seguida, cinco machos restantes, foram pareados com cinco fêmeas, virgens e sexualmente maduras. No segundo e no terceiro dia, um novo grupo de fêmeas foi novamente pareado com os mesmos machos. Em todos os tratamentos as fêmeas passaram 24 horas em contato com os machos. A quantificação dos conídios aderidos ao tegumento dos insetos foi realizada conforme descrito anteriormente, com remoção de conídios em Triton X-100 0,01%, diluição seriada e plaqueamento em meio seletivo. O experimento foi repetido por duas vezes com lotes independentes de insetos.

### ***2.5 Eficiência do macho estéril tsl Vienna-8 como vetor de conídios***

Os machos tsl foram tratados com formulação contendo amido de mandioca com  $10^9$  conídios  $g^{-1}$  de LCB289 e LCB25. Para isso, cem machos foram submetidos à letargia ( $-10^{\circ}C/30s$ ) e suavemente agitados em movimento circular por 30s em potes de 250 mL contendo 100mg da formulação. Após repouso de 4h em condições de laboratório ( $25^{\circ}C$ ) foram transferidos grupos de 20 para gaiolas com 20 fêmeas virgens e sexualmente maduras. Após 24 horas, as fêmeas foram transferidas para gaiolas contendo 20 machos da linhagem de laboratório saudáveis e não tratados, com alimento e água *ad libitum*. A mortalidade foi monitorada diariamente até o final do experimento e os cadáveres foram removidos das gaiolas e processados para confirmação da infecção.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e os dados de mortalidade corrigida de machos tsl e de machos e fêmeas da linhagem de laboratório ao longo do tempo, foram analisados pelo método de Kaplan-Meier. As curvas de mortalidade foram comparadas entre si pelo teste de Mantel-Cox ( $p < 0,05$ ).

## 2.6 Eficiência de controle de fêmeas em condições de campo

Cem machos da linhagem de laboratório foram tratados com 100mg da formulação contendo  $10^9$  conídios  $g^{-1}$  de LCB289 conforme descrito na metodologia anterior. Após o tratamento, 30 machos foram selecionados e liberados em gaiolas de campo (2m x 2m) revestidas por voil junto com 30 fêmeas virgens e sexualmente maduras. Para o tratamento controle, foram liberados machos tratados apenas com amido de mandioca. No centro de cada gaiola foi colocado no centro um vaso com uma mangueira *Mangifera indica* L. de 1,5 m de altura. As gaiolas permaneceram à sombra de Nim *Azadirachta indica*.

A liberação ocorreu pela manhã e as fêmeas foram recolhidas individualmente no final do dia, utilizando-se tubos de ensaio aos quais foram adicionados dieta artificial e água. Os insetos foram levados para o laboratório onde a mortalidade foi registrada diariamente e os cadáveres das fêmeas foram esterilizados superficialmente utilizando o protocolo de etanol 70% hipoclorito de sódio e, após três lavagens sucessivas em água destilada estéril, depositados em placas de Petri com papel de filtro autoclavado e umedecido para avaliação da conidiogênese.

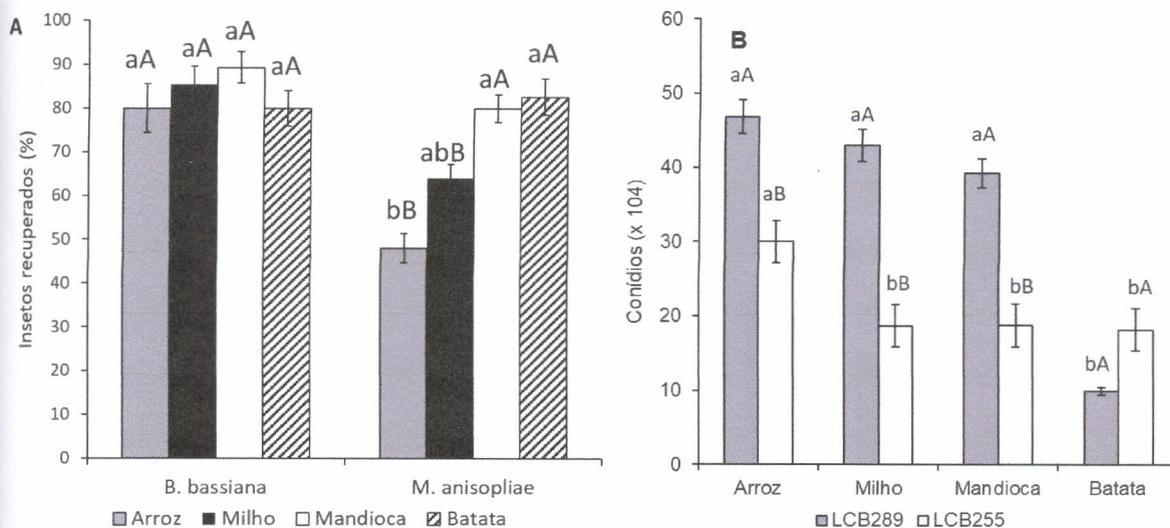
Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com duas repetições contendo 30 fêmeas e 30 machos em cada gaiola e os dados da mortalidade foram analisados pelo método de Kaplan-Meyer comparando as curvas entre si pelo teste de Mantel – Cox ( $p < 0,05$ ). O experimento foi repetido por duas vezes consecutivas.

### 3. RESULTADOS

#### 1. Efeito da formulação sobre a adesão de conídios ao tegumento de machos e transferência horizontal de inóculo infectivo.

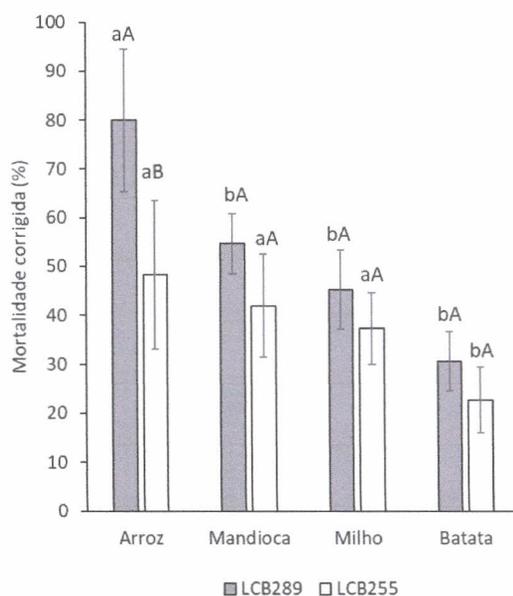
Houve interação significativa entre os adjuvantes e os isolados na retomada de voo e alimentação dos machos estéreis ( $F_{3,33} = 10,825$ ;  $p = 0,008$ ). Todos os machos tratados com conídios puros ou com formulações com dióxido de sílica ( $\text{SiO}_2$ ) ficaram inabilitados 4 horas após a aplicação dos tratamentos e seus dados foram descartados da análise estatística por não apresentarem variância. Não houve diferença significativa na taxa de recuperação dos insetos tratados com formulações contendo LCB289 (Figura 1A). Contudo, os machos tratados com amido de mandioca e batata obtiveram o maior percentual de recuperação quando os insetos foram tratados com *M. anisopliae* LCB255 pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

De forma geral, houve maior adesão dos conídios de LCB289 (Tukey;  $p < 0,05$ ) ao tegumento de machos de *C. capitata* do que de LCB255, exceto para o tratamento utilizando amido de batata como adjuvante (Figura 1B). As formulações com LCB255 em amido de arroz mostrou a maior adesão de conídios, não havendo diferença entre as demais pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Neste estudo, também houve interação significativa entre os fungos e os adjuvantes quando se avaliou a mortalidade dos machos tratados com as diferentes formulações ( $F_{3,33} = 4,28$ ;  $p = 0,012$ ). A formulação em farinha de arroz apresentou a maior mortalidade acumulada quando os machos foram tratados com LCB289 e a formulação em amido de batata apresentou a menor mortalidade para este fungo (Figura 2). As formulações com LCB255 resultaram em mortalidades estatisticamente similares entre si, exceto quando preparadas com amido de batata, e apenas na formulação em arroz houve diferença significativa entre os fungos ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.



**Figura 1** – Recuperação de machos de *Ceratitis capitata* (A) e número médio de conídios aderidos ao seu corpo (B) 4 horas após o tratamento com formulações contendo  $10^9$  conídios  $g^{-1}$  de *B. bassiana* LCB289 e *M. anisopliae* LCB255. A recuperação dos insetos foi considerada a habilidade em retomar vôo 4 horas após nocaute ( $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/30\text{ s}$ ) e aplicação das formulações e os valores obtidos foram corrigidos utilizando os tratamentos contendo apenas os adjuvantes como referência. Letras minúsculas comparam o efeito de diferentes adjuvantes para o mesmo fungo, enquanto as letras maiúsculas comparam o efeito entre diferentes fungos para um mesmo adjuvante pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados são a média de dois experimentos conduzidos com grupos independentes de insetos.

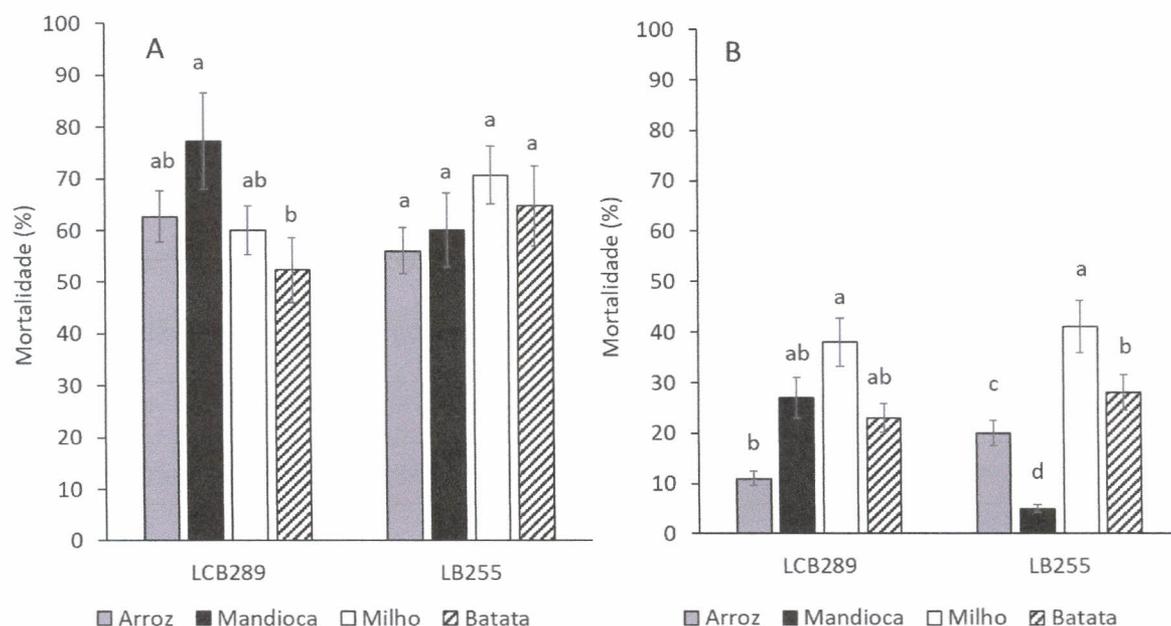
As diferenças observadas para a transferência de conídios entre as formulações afetaram a mortalidade das fêmeas pareadas com os machos tratados, resultando em efeito significativo da interação dos adjuvantes e cepas na formulação sobre a mortalidade corrigida de machos pareados com fêmeas previamente infectadas ( $F_{3,33} = 15,89$ ;  $p < 0,01$ ). Apenas as formulações contendo LCB289 mostraram mortalidade de fêmeas significativamente diferentes entre si, e a formulação em amido de batata apresentou valores significativamente menores em relação ao amido de mandioca (teste de Tukey;  $p < 0,05$ ). As demais apresentaram mortalidades intermediária e estatisticamente similares entre si (Figura 3A).



**Figura 2** - Mortalidade acumulada de machos estéreis *tsl* Vienna-8 após o tratamento com formulações contendo  $10^9$  conídios  $g^{-1}$  de *B. bassiana* LCB289 e *M. anisopliae* LCB255. O eixo horizontal corresponde aos diferentes amidos utilizados na formulação. Os insetos foram mantidos em gaiolas com de água e dieta *ad libitum* por cinco dias. Letras minúsculas comparam o efeito de diferentes adjuvantes para o mesmo fungo, enquanto as letras maiúsculas comparam o efeito entre diferentes fungos para um mesmo adjuvante pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados são a média de dois experimentos conduzidos com grupos independentes de insetos.

Resultado similar foi observado na transferência horizontal de conídios das fêmeas para machos saudáveis ao serem pareados em novas gaiolas. O uso das formulações em amido de milho, batata e mandioca resultaram em mortalidade estatisticamente similar entre si e significativamente maior que a farinha de arroz ( $p < 0,05$ ) resultante da transferência horizontal secundária, grupo de machos posteriormente expostos às fêmeas, quando estas foram previamente pareadas com LCB289. Nos tratamentos com LCB255, a formulação em amido de milho apresentou a maior mortalidade de machos ( $p < 0,05$ ), resultante da transferência horizontal secundária, enquanto amido de mandioca resultou na menor mortalidade. Para ambos os fungos estudados, a formulação em amido de milho apresentou elevada eficácia na

mortalidade das fêmeas acasaladas com machos *tsl* Vienna-8 previamente tratados e dos machos que realizaram posteriormente cópulas com as fêmeas.



**Figura 3** – Mortalidade de fêmeas (A) e machos (B) de linhagem de laboratório de *C. capitata* após o pareamento das fêmeas com machos tratados com diferentes formulações contendo  $10^9$  conídios  $g^{-1}$  de *B. bassiana* LCB289 ou *M. anisopliae* LCB255. As fêmeas permaneceram em contato com *tsl* Vienna-8 tratados por 24h, em seguida, foram levadas para o contato com machos não tratados. As letras sobre as colunas comparam a mortalidade para os formulantes em cada fungo e colunas com letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados são a média de dois experimentos conduzidos com grupos independentes de insetos.

## 2. Transferência horizontal de propágulos infectivos utilizando machos estéreis de *C. capitata* *tsl* Vienna-8 como vetor de estirpes virulentas

### 2.1. Eficiência da transferência horizontal utilizando formulações com diferentes doses do produto técnico

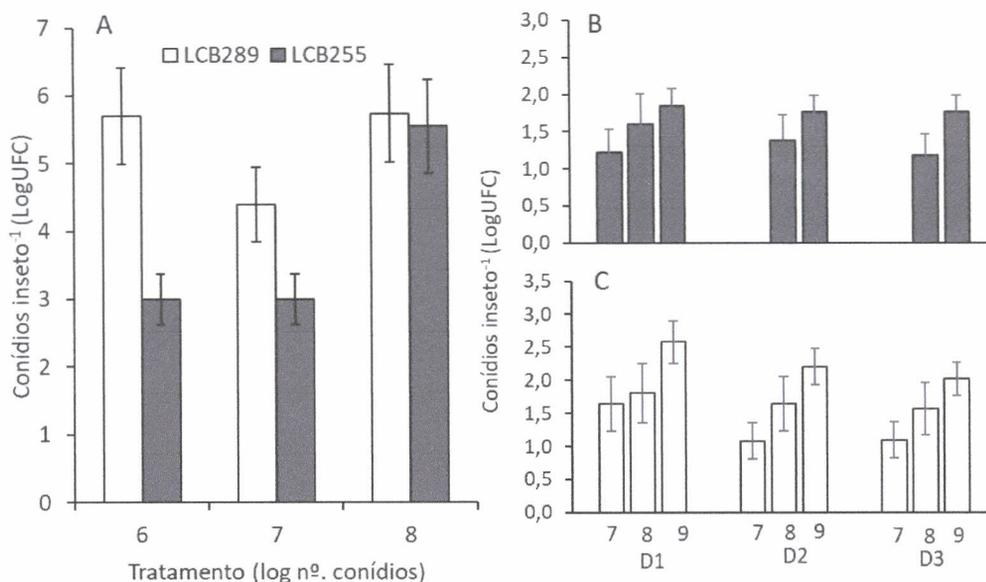
Para avaliar o efeito da concentração de conídios na formulação contendo amido de mandioca na transferência horizontal de conídios de LCB289 e LCB255 utilizando macho como vetor, os machos foram tratados com três concentrações diferentes e pareados individualmente com diferentes grupos fêmeas substituídas em intervalos de 24h por 3 dias.

Como esperado, a concentração de conídios na formulação aumentou linearmente a carga de esporos aderida ao tegumento dos machos, mas principalmente a quantidade transferida para as fêmeas ao longo do tempo. O efeito foi mais forte na menor dose aplicada, principalmente em machos tratados com a formulação com LCB255 (Figura 4A).

Em geral obteve-se maior transferência de esporos para as fêmeas quando foram pareadas com machos tratados com LCB 289 (Figura 4C). Para ambas as formulações testadas, as fêmeas na primeira cópula obtiveram o maior número de conídios aderidos ao tegumento e houve transferência horizontal nos três períodos de cópula avaliados. Após a segunda rodada de pareamentos (24 horas), não se detectou a presença de conídios de LCB255 no corpo das fêmeas no tratamento com aplicação da menor concentração de conídios utilizada ( $10^7$  conídios  $g^{-1}$ ).

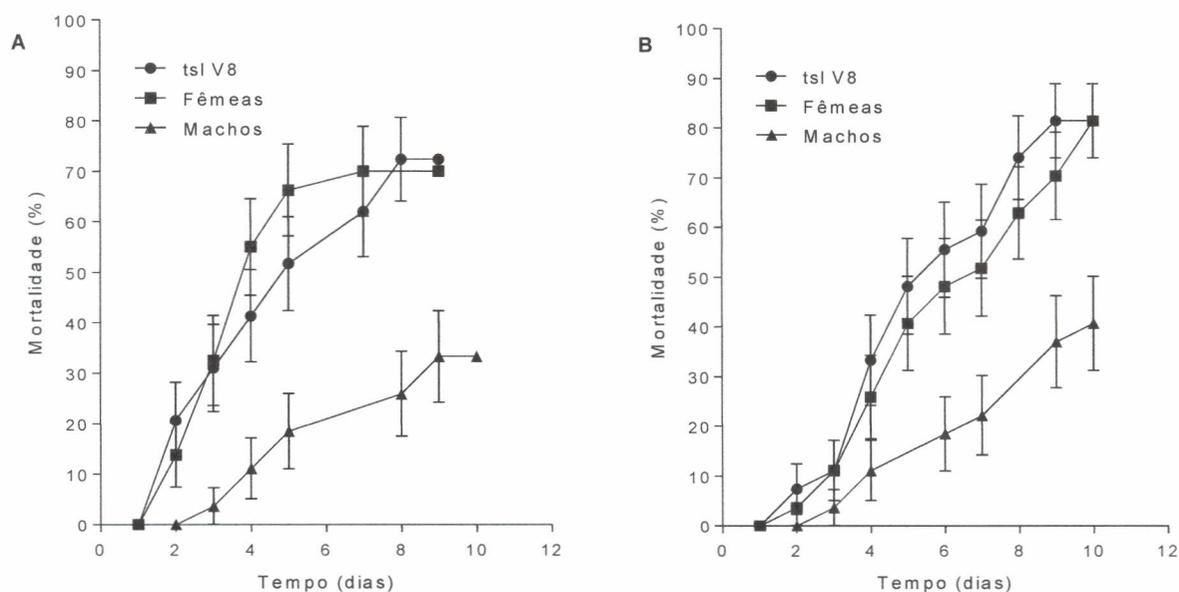
### **2.1. Efeito da transferência horizontal de conídios na sobrevivência de *C. capitata***

Nesta parte do trabalho, os machos tsl Vienna-8 foram tratados com formulação contendo  $10^9$  conídios  $g^{-1}$  e inseridos em gaiolas contendo fêmeas de linhagem de laboratório de *C. capitata*, seguido de transferência das fêmeas após 24 horas para gaiolas contendo machos da mesma linhagem sexualmente maduros. O experimento foi realizado por duas vezes com grupos independentes de insetos, e teve por objetivo avaliar a possibilidade de que as fêmeas possam transferir inóculo infectivos a outros machos em caso de recópula ou tentativa de recópula e outras interações sociais.



**Figura 4** – Número de conídios de *B. bassiana* LCB289 e *M. anisopliae* LCB255 aderidos ao tegumento de machos estéreis tsl Vienna-8 (A) após a aplicação de formulação em amido de mandioca contendo três níveis de concentrações de conídios e a transferência horizontal para fêmeas pareadas com os machos tratados em gaiolas individuais a 1, 2 e 3 dias após o tratamento dos machos. B – Fêmeas pareadas com machos tratados com LCB255; C - Fêmeas pareadas com machos tratados com LCB289. Nos gráficos B e C, as indicações 6, 7 e 8 são a concentração de conídios nas formulações dos machos; D1, D2 e D3 referem ao pareamento das fêmeas com os machos a 1, 2 e 3 dias após a aplicação da formulação, respectivamente. Os resultados são a média de dois experimentos conduzidos com grupos independentes de insetos.

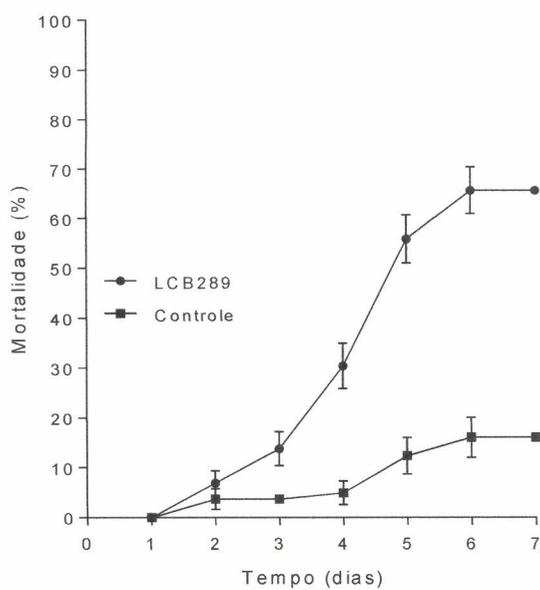
A mortalidade confirmada pela conidiogênese e acumulada ao final do experimento foi de 72,4% ( $\pm 8,3$ ) e 70,1 ( $\pm 9,12$ ) para machos tratados com LCB289 e fêmeas, respectivamente, enquanto que os machos não tratados diretamente, mas expostos à interação com fêmeas previamente acasaladas apresentaram mortalidade de 35,3%. Quando os machos tsl foram tratados com LCB255, a mortalidade confirmada de machos foi de 81,5% (7,4) e de 81,0% ( $\pm 8,8$ ) para fêmeas, e de 40,7% ( $\pm 9,4$ ) para os machos. Embora tenham apresentado menor mortalidade confirmada ao final do experimento, os machos tsl e fêmeas tratados com LCB289 apresentaram a menor sobrevida mediana, com 5,5 e 4,2 dias respectivamente (Figura 5A), e 6,0 dias para o tsl e 7,0 dias de sobrevida mediana para LCB255 (Figura 5B). Os insetos tratados com LCB289 também apresentaram a máxima mortalidade em 7 dias, período mais curto do que aqueles tratados com LCB255 que foi aos 10 dias.



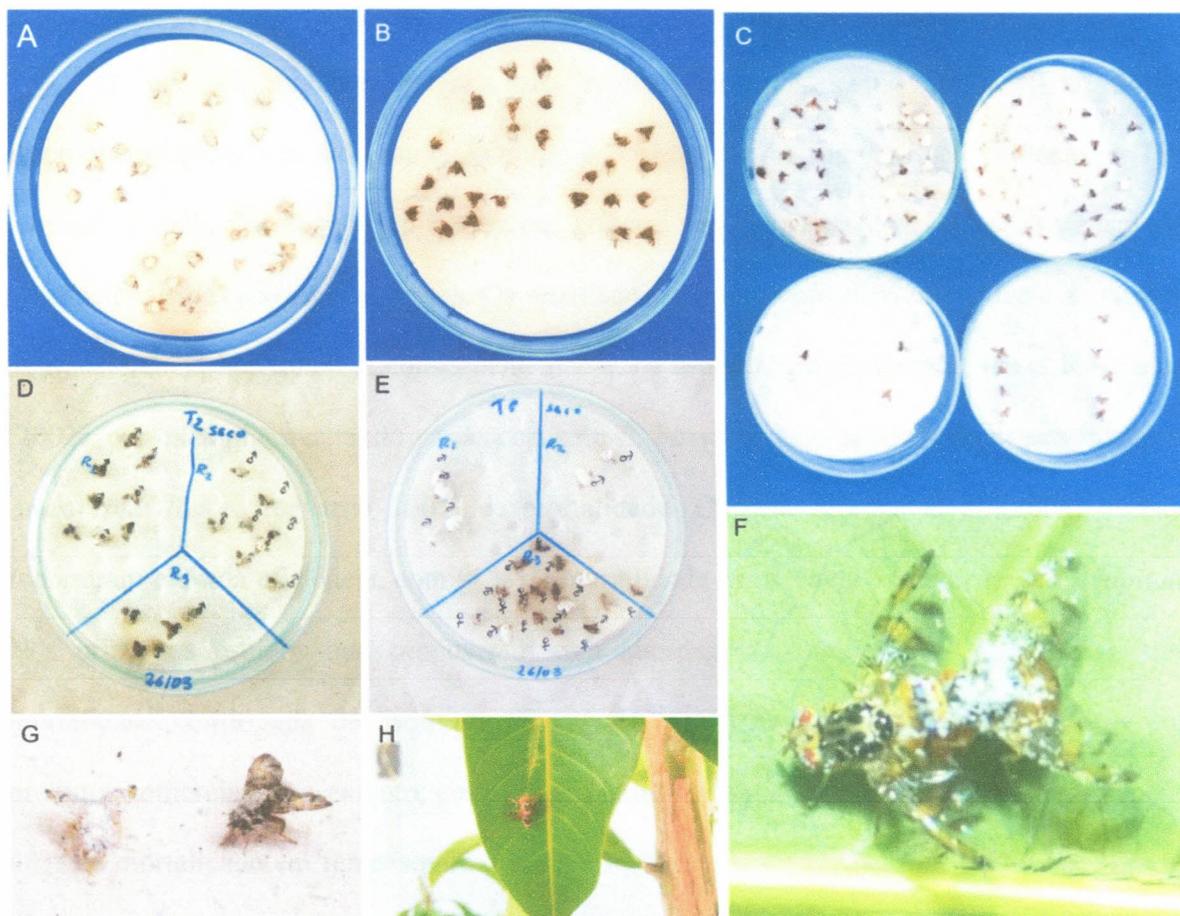
**Figura 5** – Curva de mortalidade de machos estéreis tsl Viena 8, fêmeas e machos de linhagem de laboratório de *C. capitata* após tratamento dos machos estéreis com formulação em amido de mandioca contendo  $10^9$  conídios  $g^{-1}$  de *B. bassiana* LCB289 (A) ou *M. anisopliae* LCB255 (B). As fêmeas permaneceram em contato com machos tsl Vienna-8 tratados por 24h, em seguida, foram inseridas em gaiolas com machos de linhagem de laboratório.

### 3. Mortalidade de fêmeas pareadas com machos tsl Vienna-8 previamente tratados em gaiolas de campo

O tratamento de machos estéreis com a formulação contendo amido de mandioca com  $10^9$  conídios  $g^{-1}$  de *B. bassiana* LCB289, resultou em alta mortalidade de fêmeas de *C. capitata* em condições de gaiola de campo. Houve diferença estatística altamente significativa entre as curvas de mortalidade com o tratamento controle pela análise de Kaplan-Meyer ( $\chi^2 = 44,83$ ; GL=1;  $p < 0,001$ ). A mortalidade acumulada de fêmeas ao final do experimento foi de 64% em as gaiolas de campo após a liberação de machos tratados, com sobrevida mediana de 4,6 dias enquanto que no tratamento controle a mortalidade acumulada foi de 14% (Figura 6).



**Figura 6** - Curva de mortalidade de fêmeas de linhagem de laboratório de *C. capitata* após liberação em gaiola de campo com machos tratados com formulação em amido contendo  $10^9$  conídios  $g^{-1}$  de *B. bassiana* LCB289. As fêmeas permaneceram em contato com machos tsl Vienna-8 por 8h, em seguida foram coletadas em tubos de ensaio e a sobrevivência foi acompanhada diariamente, além da coleta dos cadáveres para confirmação da causa da mortalidade.



**Figura 7:** Conidiogênese em fêmeas infectadas por machos tratados com *B. bassiana* LCB289 e amido de mandioca (7A); conidiogênese em fêmeas infectadas por machos tratados com *M. anisopliae* LCB255 e amido de milho (7B); mortalidade confirmada de fêmeas liberadas junto com machos tratados com formulação contendo  $1 \times 10^9$  conídios  $g^{-1}$  de *B. bassiana* LCB289 em gaiola de campo (placas superiores fêmeas copuladas com macho tratado com LCB289 e inferiores tratamento controle) (7C); mortalidade confirmada de machos da linhagem de laboratório pareados com fêmeas que estiveram em contato por 24 h com machos estéreis tratados com formulação de LCB255 e amido de milho (7D) e LCB289 (7E); macho tratado com formulação contendo  $1 \times 10^9$  conídios  $g^{-1}$  *B. bassiana* com fêmea não tratada em condições de gaiola de campo (7F); Recuperação dos machos 4h após o tratamento com formulações virulentas de *B. bassiana* LCB289 (esquerda) e *M. anisopliae* LCB255 (direita) (7G); acasalamento sob folha de magueira (*Mangifera indica*) entre macho tratado e fêmea não tratada em gaiola de campo (7H).

#### 4. DISCUSSÃO

O uso de machos estéreis de moscas-das-frutas como vetores de fungos entomopatogênicos tem sido estudado como estratégia para o aumento da eficiência da TIE, tornando-a mais viável para aplicação em grandes territórios ou com elevadas densidades populacionais das moscas-das-frutas. Os resultados têm mostrado diferentes níveis de sucesso na transferência horizontal e, conseqüentemente, na mortalidade de fêmeas. De la Rosa et al. (2002), por exemplo, avaliando várias cepas de *B. bassiana* para controle da mosca mexicana *Anastrepha ludens* registrou 100% de mortalidade. Quesada-Moraga et al (2008) também reportaram elevada eficiência, com 90% de mortalidade confirmada em fêmeas de *C. capitata*. Nos primeiros estudos que propuseram esta abordagem, Toledo et al. (2007) relataram mortalidade confirmada de 80% em fêmeas da mosca mexicana *Anastrepha ludens* com produtos comerciais. No entanto, em estudos similares Beris et al. (2013) encontraram apenas 48% de mortalidade em fêmeas para cepas de *B. bassiana* e 17% para *M. anisopliae*. Em um trabalho anterior, Leal et al (2019) mostraram que a adição de aditivos antifúngicos às dietas de *C. capitata* aumentou a viabilidade de machos de uma linhagem local e em tsl Vienna 8, ampliando o período viável para a realização de cópulas ou outras interações sociais que permitiram a transferência de propágulo infectivos de *B. bassiana* LCB289 e *M. anisopliae* LCB255. Os resultados deste trabalho corroboram estas informações, mostrando que diferentes formulações com *B. bassiana* LCB289 e *M. anisopliae* LCB255 causaram elevada mortalidade de fêmeas de *C. capitata* em todos os experimentos em que foram pareadas com machos tsl Vienna-8 previamente tratados.

Na abordagem de uso de TIE como vetor de patógenos, a adesão de quantidade suficiente de propágulos ao corpo do inseto é importante para permitir a transmissão efetiva de inóculo (MANIANIA; EKESI, 2013). No entanto, a adesão excessiva dos adjuvantes ao tegumento tem efeito deletério sobre a sobrevivência, dispersão e acasalamento de machos tratados e liberados no campo. No trabalho conduzido por Dimbi et al. (2009), o uso de

formulações convencionais aumentou o tempo de limpeza corporal, retardando o início da interação sexual em machos de moscas-das-frutas e, conseqüentemente, diminuindo a eficiência da transmissão e do controle das fêmeas.

A aplicação de conídios puros ou formulados em sílica micronizada resultou em taxa de recuperação dos machos, logo após o tratamento próximo a zero e foram descartadas. A forte interação hidrofóbica dos conídios não formulados com o tegumento dos insetos (HAJEK; ST. LEGER, 2003) causou adesão de quantidade excessiva de conídios, impedindo o deslocamento e vôo e resultando na morte dos insetos. Por outro lado, a elevada higroscopicidade da sílica ( $\text{SiO}_2$ ) também causou excessiva adesão, provavelmente causando danos ao tegumento dos insetos por abrasão (LORD, 2001).

A dimensão das partículas das formulações é um dos mais importantes fatores que podem interferir na adesão dos conídios e na eficiência de transferência horizontal. A análise granulométrica dos adjuvantes mostrou que farinha de arroz e de batata apresentaram granulometria média elevada (107,23 e 32,8  $\mu\text{m}$ , respectivamente), enquanto o amido de mandioca e de milho apresentaram granulometria inferior a 1,0  $\mu\text{m}$ . Geralmente, formulações em pó com menor tamanho de partícula têm maior aderência ao tegumento (BURGES, 1998), podendo causar efeitos deletérios ao inseto, como a sílica e o conídio não formulado.

Além da granulometria, as características físico-químicas intrínsecas do adjuvante podem definir a taxa de adesão/adsorção aos conídios e destes com o tegumento dos insetos. De acordo com Alcázar-Alay et al (2015), a concentração das ligações glicosídicas  $\alpha$  1-4 (amilose) e  $\alpha$  1-6 (amilopectina) dos amidos variam com a fonte botânica e afetam suas características físico-químicas. Por exemplo, o amido de arroz quando comparado com batata e milho apresenta o maior teor de amilose, enquanto que o amido de mandioca apresenta a menor concentração entre as fontes estudadas (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010). Provavelmente, as relações nos teores de amilose/amilopectina dos diferentes amidos utilizados

como adjuvante reduziram a taxa e a força de adesão. Uma menor força de adesão teria reduzido a massa de formulação aderida ao corpo dos insetos, melhorando o desempenho dos machos tratados e a eficiência de transferência dos conídios. Como resultado, a mortalidade de fêmeas foi proporcionalmente inversa ao tamanho das partículas, com aumento da transferência de inóculo para as fêmeas e, até mesmo, destas para outros machos.

Neste trabalho, a formulação em amido de milho e mandioca permitiu adequada recuperação dos insetos e adesão de elevado número de conídios ao tegumento dos machos tsl. O menor tempo de recuperação e a menor incidência de possíveis danos ao tegumento dos machos podem ter aumentado a eficiência da corte e o tempo de contato com as fêmeas, causando as maiores mortalidade de fêmeas entre os adjuvantes estudados. Assim, é provável que a menor atração do amido pelo tegumento dos insetos, combinado a uma menor força adesiva, tenha tornado a transferência de propágulos entre insetos durante as interações sociais mais eficiente.

Quando se avaliou a influência da dose inicial de conídios na formulação sobre a eficiência de transmissão horizontal, verificou-se que mesmo na menor dose houve uma recuperação de número superior a  $10^3$  conídios por macho tratado. Contudo, o número de conídios recuperados em machos tratados com *M. anisopliae* LCB255 foi menor que em *B. bassiana* LCB289, nas dosagens mais baixas utilizadas no experimento. Os resultados mostraram que houve transmissão de propágulos nas interações entre os machos e fêmeas até o terceiro dia após tratamento, com recuperação de conídios viáveis da ordem de  $3,2 \times 10^1$  a  $1,8 \times 10^2$  conídios por fêmea avaliada. Contudo, é necessário considerar que as interações hidrofóbicas que ocorrem entre os conídios e o tegumento são fortes e reduziram a eficiência da metodologia de remoção dos conídios (para contagem) utilizando uma solução de surfactante.

Os resultados obtidos nos dois experimentos mostraram ter havido transferência horizontal a partir de fêmeas pareadas com machos tsl Vienna-8 previamente tratados para

machos não tratados, causando uma mortalidade adicional de 28 a 40%. A recópula em moscas-das-frutas é um comportamento conhecido em grande número de espécies e que há uma maior probabilidade de ocorrência quando se utiliza a TIE devido a baixa competitividade do macho estéril uma vez que eles liberam menos feromônio do que os machos selvagens (ALUJA; LIEDO, 2013). Os estudos realizados no Vale do São Francisco por Morelli et al. (2013), por exemplo, mostraram que houve 31% de recópula quando fêmeas selvagens de *C. capitata* foram pareadas com machos estéreis. Além disso, em várias ocasiões as montas realizadas pelo mutante *tsl* não resultam em cópula e as fêmeas continuam ativamente em busca de novo acasalamento (MORELLI et al., 2013). No entanto, têm duração suficiente para a ocorrência de transferência de inóculo infectivo. Assim, a introdução de machos *tsl* tratados na população pode ser uma forma de controle em áreas infestadas, tanto pela cópula direta como por tentativas, e por outras interações como em leks entre machos *tsl* tratados e os machos selvagens (FLORES et al., 2013; TOLEDO et al., 2007).

Os resultados obtidos em laboratório foram confirmados quando os machos tratados foram liberados em gaiolas de campo, havendo elevada mortalidade confirmada de fêmeas. A curva de mortalidade das fêmeas foi significativamente diferente do tratamento controle e as moscas apresentaram crescimento típico de *B. bassiana* após a morte e desinfecção superficial. Os altos níveis de mortalidade de fêmeas deste estudo corroboram os resultados de Toledo et al. (2017), mostrando a viabilidade do uso do *tsl* Vienna-8 previamente tratados para o manejo de *C. capitata*, uma vez que os fungos podem compensar o baixo desempenho sexual do macho estéril, aumentando a eficiência da tecnologia. Se o sucesso de cópula dos machos estéreis de *C. capitata* *tsl* Vienna-8 com machos selvagens alcançam uma média de 24% (PARANHOS et al., 2010) o uso destes machos como vetores de fungos entomopatogênicos, causando a morte mesmo em fêmeas que não obtiveram sucesso na cópula, apenas pelo contato de monta, pode aumentar a eficiência da TIE com sinergismo entre ambos métodos de controle. Os

experimentos foram conduzidos com elevado rigor técnico e estatístico, descartando-se a mortalidade em período inferior a 24 horas e realizando-se a correção da mortalidade natural em todos os experimentos, assim os dados não mostram 100% de mortalidade em nenhum dos experimentos. Exceto em gaiola de campo, no qual, todos os indivíduos morreram ao final do experimento.

Além da elevada mortalidade das fêmeas, e de machos em caso de tentativa de recópula, a redução significativa na sobrevivência mediana das fêmeas é muito importante do ponto de vista da dinâmica de crescimento populacional. Nos experimentos em que foi realizada a análise da curva de sobrevivência pelo método de Kaplan-Meier, a sobrevivência mediana de fêmeas pareadas com machos tratados com *B. bassiana* LCB289 foi de 4,2 e 4,6 dias após o pareamento em condições de laboratório e campo, respectivamente. Além disso, há um período anterior a mortalidade no qual os insetos infectados sofrem redução da ingestão de alimentos e da mobilidade (TOLEDO-HERNÁNDEZ; TOLEDO; SÁNCHEZ, 2018). No caso das moscas-das-frutas, a infecção resultou em redução da fertilidade das fêmeas (SÁNCHEZ-ROBLERO et al., 2012). Assim, é esperado que o período de atividade normal de oviposição seja muito curto após a ocorrência de infecção, reduzindo os danos causados e o crescimento da próxima geração.

Outros estudos têm verificado a viabilidade do uso de machos estéreis como vetores de fungos entomopatogênicos e sugerido sua utilização com a TIE (SÁNCHEZ-ROBLERO et al., 2012; TOLEDO et al., 2006). Entretanto, é imprescindível garantir a sobrevivência dos machos tratados e comprovar que a aplicação da formulação não afetaria sua eficiência reprodutiva. Nos estudos de Dimbi et al. (2003b), os autores não relataram alteração no comportamento de cópula dos machos tratados em curto período, enquanto que Leal et al (2019) mostrou que a adição de composto antifúngico à dieta de *C. capitata* pode estender a sobrevivência e atividade desses machos. Neste trabalho, conclui-se que amido de milho ou mandioca, e

provavelmente também outras partículas micronizadas de média força de adesão ao tegumento dos insetos, podem ser adjuvantes eficientemente utilizados em formulações para o tratamento prévio de machos estéreis *tsl* Vienna-8 para exploração da transferência horizontal de propágulos infectivos dentro da população selvagem, ampliando o potencial de controle da TIE.

## 5. REFERÊNCIAS

- ALCÁZAR-ALAY, S. C.; ANGELA, M.; MEIRELES, A. Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 215–236, 2015.
- ALUJA, M.; LIEDO, P. Fruit flies: biology and management. 2013.
- APARECIDO, C. et al. Avaliação da viabilidade de culturas fúngicas preservadas pelos métodos de Castellani (água destilada) e liofilização. **Biológico**, v. 69, n. 1, p. 5–8, 2007.
- BADII, K. B. et al. Review of the pest status, economic impact and management of fruit-infesting flies (Diptera: Tephritidae) in Africa. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 12, p. 1488–1498, 2015.
- BERIS, E. I. et al. Pathogenicity of three entomopathogenic fungi on pupae and adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Pest Science**, 2013.
- BURGES, H. D. **Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1998.
- CÁRCAMO, M. C. et al. Horizontal Transmission of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) and *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology**, 2015.
- CHANDLER, D. Basic and applied research on entomopathogenic fungi. In: LACEY, L. A. (Ed.). **Microbial Control of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice**. London, UK: Academic Press, 2016. p. 69–89.
- DE LA ROSA, W.; LOPEZ, F. L.; LIEDO, P. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. **Journal of Economic Entomology**, v. 95, n. 1, p. 36–43, 2002.

DE PEDRO, L. et al. Combined use of the larvo-pupal parasitoids *Diachasmimorpha longicaudata* and *Aganaspis daci* for biological control of the medfly. **Annals of Applied Biology**, 2019.

DE SANTOS, P. S. et al. Selection of surfactant compounds to enhance the dispersion of *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, 2012.

DIMBI, S. et al. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera:Tephritidae) Susan. **Mycopathologia**, v. 156, p. 375–382, 2003a.

DIMBI, S. et al. Host species, age and sex as factors affecting the susceptibility of the African Tephritid fruit fly species, *Ceratitis capitata*, *C. cosyra* and *C. fasciventris* to infection by *Metarhizium anisopliae*. **Anzeiger fur Schadlingskunde**, 2003b.

DIMBI, S.; MANIANIA, N. K.; EKESI, S. Effect of *Metarhizium anisopliae* inoculation on the mating behavior of three species of African Tephritid fruit flies, *Ceratitis capitata*, *Ceratitis cosyra* and *Ceratitis fasciventris*. **Biological Control**, v. 50, n. 2, p. 111–116, 2009.

FAO/IAEA/USDA. **Product Quality Control for Sterile Mass-Reared and Released Tephritid Fruit Flies**. 6. ed. Áustria, Viena: IAEA, 2014.

FLORES, S. et al. Sterile males of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) as disseminators of *Beauveria bassiana* conidia for IPM strategies. **Biocontrol Science and Technology**, v. 23, n. 10, p. 1186–1198, 2013.

FOLLETT, P. A. et al. New associations and host status: Infestability of kiwifruit by the fruit fly species *Bactrocera dorsalis*, *Zeugodacus cucurbitae*, and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Crop Protection**, v. 115, n. July 2018, p. 113–121, 2019.

FURLONG, M. J.; PELL, J. K. Horizontal transmission of entomopathogenic fungi by the diamondback moth. **Biological Control**, v. 22, n. 3, p. 288–299, 2001.

HAJEK, A. E.; ST. LEGER, R. J. Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. **Annual Review of Entomology**, v. 39, n. 1, p. 293–322, jan. 2003.

HELLWEGE, E. et al. **Compositions Comprising a Biological Control Agent and an Inseticide** Germany, 2018.

LANDETA-ESCAMILLA, A. et al. Male irradiation affects female remating behavior in *Anastrepha serpentina* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 85, p. 17–22, 2016.

MALACRIDA, A. R. et al. Globalization and fruitfly invasion and expansion: The medfly paradigm. **Genetica**, p. 1–9, 2007.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: Produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 137–156, 2010.

MANIANIA, N. K.; EKESI, S. The use of entomopathogenic fungi in the control of tsetse flies. **Journal of Invertebrate Pathology**, p. 583–588, 2013.

MANOUKIS, N. C. et al. A field test on the effectiveness of male annihilation technique against *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) at varying application densities. **PLOS ONE**, p. 1–14, 2019.

MICHAUD, J. P. Toxicity of fruit fly baits to beneficial insects in citrus. **Journal of Insect Science**, p. 2–9, 2003.

MORELLI, R. et al. Exposure of sterile Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) males to ginger root oil reduces female remating. **Journal of Applied Entomology**, 2013.

OLIVEIRA, D. G. P. et al. A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. **Journal of Microbiological Methods**, 2015.

OLIVEIRA, O. S. DE; BRITO, V. H. DOS S.; CEREDA, M. P. Establishing a standard for handmade Brazilian cassava flour from Baixada Cuiabana (Mato Grosso, Brazil) to support its processing and sale. **Food Science and Technology**, 2018.

PARANHOS, B. J. et al. Sterile Medfly Males of the TSL Vienna 8 Genetic Sexing Strain Display Improved Mating Performance With Ginger Root Oil. **Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance**, n. September 2006, p. 313–318, 2006.

PARANHOS, B. J. et al. Optimum dose of ginger root oil to treat sterile Mediterranean fruit fly males (Diptera : Tephritidae). **Journal of Applied Entomology**, p. 1–8, 2010.

PARANHOS, B. J.; NAVA, D. E.; MALAVASI, A. Biological control of fruit flies in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, 2019.

PÜNTENER, W. **Manual for field trials in plant protection**. 2. ed. Basle, Switzerland: Ciba-Geigy Limited, 1981.

QUESADA-MORAGA, E. et al. Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, n. 1, p. 51–58, 2004.

QUESADA-MORAGA, E. et al. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera : Tephritidae). **Biological Control**, v. 47, p. 115–124, 2008.

REYES-VILLANUEVA, F. et al. Dissemination of *Metarhizium anisopliae* of low and high virulence by mating behavior in *Aedes aegypti*. **Parasites and Vectors**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 2011.

SÁNCHEZ-ROBLERO, D. et al. Effect of *Beauveria bassiana* on the ovarian development and reproductive potential of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 9, p. 37–41, 2012.

SARWAR, M. Commonly Available Commercial Insecticide Formulations and Their Applications in the Field. **International Journal of Materials Chemistry and Physics**, v. 1, n. 2, p. 116–123, 2015.

SILVA NETO, A. M. DA et al. Mass-rearing of Mediterranean fruit fly using low-cost yeast products produced in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 69, n. 6, p. 364–369, dez. 2012.

TOLEDO-HERNÁNDEZ, R. A.; TOLEDO, J.; SÁNCHEZ, D. Effect of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) on food consumption and mortality in the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 38, n. 03, p. 254–260, 2018.

TOLEDO, J. et al. Use of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for fruit fly control: a novel approach. **Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance**, n. September 2006, p. 127–132, 2006.

TOLEDO, J. et al. Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) under laboratory and field cage conditions. **Journal of economic entomology**, v. 100, p. 291–297, 2007.

TOLEDO, J. et al. Pathogenicity of three formulations of *Beauveria bassiana* and efficacy of autoinoculation devices and sterile fruit fly males for dissemination of conidia for the control of *Ceratitis capitata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 2017.