

Mortalidade de imaturos e adultos de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) causada por *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) em condições de laboratório

Mortality of immatures and adults of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) caused by *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) under laboratory conditions

Mortalidad de inmaduros y adultos de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) causada por *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) en condiciones de laboratorio

Recebido: 13/09/2022 | Revisado: 28/09/2022 | Aceitado: 01/10/2022 | Publicado: 08/10/2022

Taline de Lima Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4752-7980>
Universidade Federal do Amapá, Brasil
E-mail: silva.tl@hotmail.com

Maria do Socorro Miranda de Sousa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0227-7340>
Universidade Federal do Amapá, Brasil
E-mail: socorro-ap@hotmail.com

Jhulie Emille Veloso dos Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0878-7544>
Faculdade de Macapá, Brasil
E-mail: jhulieemille@gmail.com

Adriana Bariani

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9823-693X>
Embrapa Amapá, Brasil
E-mail: adriana.bariani@embrapa.br

Adilson Lopes Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3506-7059>
Embrapa Amapá, Brasil
E-mail: adilson.lopes@embrapa.br

Cristiane Ramos de Jesus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9984-438X>
Embrapa Amapá, Brasil
E-mail: cristiane.jesus@embrapa.br

José Francisco Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9807-2306>
Embrapa Amapá, Brasil
E-mail: jose-francisco.pereira@embrapa.br

Ricardo Adaime

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8044-3976>
Embrapa Amapá, Brasil
E-mail: ricardo.adaime@embrapa.br

Resumo

Anastrepha fraterculus (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) é uma espécie de mosca-das-frutas relevante do ponto de vista econômico e encontra-se amplamente distribuída no Brasil. O objetivo deste estudo foi avaliar a patogenicidade do isolado *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (CPAFAP-3.8) contra imaturos e adultos de *A. fraterculus* em laboratório. Foram utilizados quatro tratamentos: isolado de *M. anisopliae* em solo estéril e em solo não estéril, e testemunha em solo estéril e em solo não estéril. Após a aplicação das suspensões de cada tratamento, larvas de 3º instar de *A. fraterculus* foram dispostas sobre o solo e mantidas em câmara do tipo B.O.D. à temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, sem fotofase. Foi avaliada a emergência e a mortalidade dos adultos por 28 dias. Os resultados evidenciaram que a emergência dos adultos foi menor no tratamento com *M. anisopliae* em solo estéril (23%). Embora a emergência tenha sido alta no tratamento com *M. anisopliae* em solo não estéril (70%), a mortalidade dos adultos foi de 98,6%. A redução da sobrevivência dos adultos ocorreu mais rapidamente no tratamento com *M. anisopliae* em solo estéril,

onde em 7 dias todos os adultos estavam mortos. No tratamento com *M. anisopliae* em solo não estéril, a sobrevivência caiu para 25,7% em 7 dias e para 14,2% em 10 dias. Nesse estudo ficou demonstrado que o isolado de *M. anisopliae* (CPAFAP-3.8) provoca mortalidade de imaturos e adultos de *A. fraterculus* sob condições controladas. Porém, ainda são necessários estudos de campo para avaliar o real potencial deste micro-organismo para o controle biológico da praga.

Palavras-chave: Mosca-das-frutas; Controle biológico; Manejo integrado de pragas.

Abstract

Anastrepha fraterculus (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) is an economically relevant species of fruit fly and is widely distributed in Brazil. The objective of this study was to evaluate the pathogenicity of the isolate *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (CPAFAP-3.8) against immature and adult *A. fraterculus* in the laboratory. Four treatments were used: isolated from *M. anisopliae* in sterile soil and in non-sterile soil, and control in sterile soil and in non-sterile soil. After application of the suspensions of each treatment, 3rd instar larvae of *A. fraterculus* were placed on the soil and kept in a B.O.D. chamber at a temperature of $26 \pm 2^\circ\text{C}$, without photophase. The emergence and mortality of adults for 28 days were evaluated. The results showed that the emergence of adults was lower in the treatment with *M. anisopliae* in sterile soil (23%). Although emergence was high in the treatment with *M. anisopliae* in non-sterile soil (70%), adult mortality was 98.6%. The reduction in adult survival occurred more rapidly in the treatment with *M. anisopliae* in sterile soil, where within 7 days all adults were dead. In the treatment with *M. anisopliae* in non-sterile soil, survival dropped to 25.7% at 7 days and to 14.2% at 10 days. In this study, it was demonstrated that the isolate of *M. anisopliae* (CPAFAP-3.8) causes mortality of immatures and adults of *A. fraterculus* under controlled conditions. However, field studies are still needed to assess the real potential of this microorganism for the biological control of this pest.

Keywords: Fruit fly; Biological control; Integrated pest management.

Resumen

Anastrepha fraterculus (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) es una especie económicamente relevante de mosca de la fruta y está ampliamente distribuida en Brasil. El objetivo de este estudio fue evaluar la patogenicidad del aislado *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (CPAFAP-3.8) contra inmaduros y adultos de *A. fraterculus* en laboratorio. Se utilizaron cuatro tratamientos: aislado de *M. anisopliae* en suelo estéril y en suelo no estéril, y testigo en suelo estéril y en suelo no estéril. Después de la aplicación de las suspensiones de cada tratamiento, se colocaron en el suelo las larvas de 3er instar de *A. fraterculus* y se mantuvieron en una cámara tipo B.O.D. a una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, sin fotofase. Se evaluó la emergencia y mortalidad de adultos durante 28 días. Los resultados mostraron que la emergencia de adultos fue menor en el tratamiento con *M. anisopliae* en suelo estéril (23%). Aunque la emergencia fue alta en el tratamiento con *M. anisopliae* en suelo no estéril (70%), la mortalidad de adultos fue del 98,6%. La reducción en la supervivencia de los adultos ocurrió más rápidamente en el tratamiento con *M. anisopliae* en suelo estéril, donde en 7 días todos los adultos estaban muertos. En el tratamiento con *M. anisopliae* en suelo no estéril, la supervivencia descendió al 25,7% a los 7 días y al 14,2% a los 10 días. En este estudio se demostró que el aislado de *M. anisopliae* (CPAFAP-3.8) causa mortalidad de inmaduros y adultos de *A. fraterculus* en condiciones controladas. Sin embargo, aún se necesitan estudios de campo para evaluar el potencial real de este microorganismo para el control biológico de esta plaga.

Palabras clave: Mosca de la fruta; Control biológico; Manejo integrado de plagas.

1. Introdução

Conhecida como mosca-das-frutas-sulamericana, a espécie *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) é originária das Américas, tendo ocorrência na América do Sul, América Central, México e sul dos Estados Unidos (Malavasi et al., 2000). No Brasil, está amplamente distribuída, ocorrendo em praticamente todo o território nacional (Zucchi & Moraes, 2022). Dentre os fatores relacionados à sua alta capacidade de dispersão está a sua característica de polifagia, apresentando atualmente 159 espécies vegetais hospedeiras no Brasil, principalmente da família Myrtaceae (Zucchi & Moraes, 2022). Ademais, *A. fraterculus* apresenta característica multivoltina, com população contínua durante todas as estações do ano, com no mínimo seis gerações anuais (Salles, 1995).

A mosca-das-frutas-sulamericana é uma das espécies de maior importância econômica para o Brasil, ocorrendo em todas as épocas do ano (Salles, 1995; Zucchi & Moraes, 2022). As fêmeas depositam ovos nos frutos, causando lesões no local de inserção do ovipositor, facilitando a entrada de micro-organismos. As larvas consomem a polpa dos frutos, causando apodrecimento interno e a sua queda precoce (Salles, 1995). A espécie também possui barreiras fitossanitárias impostas por

países importadores de frutas que não possuem esta praga em seu território, gerando a perda de mercados de exportação (Nava & Botton, 2010).

Os principais inseticidas organofosforados utilizados para o manejo desta espécie, por meio da pulverização em pomares, foram retirados do mercado brasileiro devido às restrições toxicológicas (Botton et al., 2014), pois o contato com esses produtos, tanto direto (trabalhadores rurais ou manipuladores) quanto indireto (pelo consumo de alimentos oriundos de áreas com o uso desses produtos), gera elevado grau de toxicidade, podendo ocorrer o acúmulo dos compostos no organismo e causar doenças tardiamente (Anvisa, 2002; Vinhal & Soares, 2018). Desde então, os métodos de controle alternativos ao uso de inseticidas usados para reduzir o nível populacional de espécies de moscas-das-frutas, que são preconizados pelo Manejo Integrado de Pragas (MIP), passaram a ser mais difundidos, sendo a remoção de frutos maduros danificados, a conservação dos inimigos naturais nos pomares, o controle biológico com parasitoides e o uso de iscas tóxicas, os mais utilizados (Botton et al., 2017). Diante disso, há uma necessidade de busca por novos métodos de controle mais ecológicos e eficientes, voltados também aos sistemas de produção orgânicos de frutas (Brilinger et al., 2018).

Neste sentido, o controle biológico usando fungos entomopatogênicos se mostra promissor, tendo em vista que são micro-organismos que proporcionam um controle duradouro devido a sua permanência na área de produção, além do fato de não favorecerem o aparecimento de pragas secundárias (Alves, 1998a). Dentre as espécies conhecidas, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) é a mais utilizada no controle de diversas pragas agrícolas, principalmente devido à penetração via tegumento e pela infecção ocorrer em diferentes estágios de desenvolvimento do inseto (Alves, 1998b). Considerando que a fase de pupa das moscas-das-frutas ocorre no solo, a liberação de *M. anisopliae* nesse ambiente, sob a projeção da copa das plantas hospedeiras, teoricamente aumentaria a eficiência do fungo em causar mortalidade dessas espécies-praga (Ekesi et al., 2003).

Alguns estudos já foram realizados para avaliar o efeito de *M. anisopliae* no controle de *A. fraterculus*. Em estudo conduzido por Destéfano et al. (2005), *M. anisopliae* causou redução de 86% na emergência de *A. fraterculus* em condições de laboratório, tanto em solo estéril quanto em solo não estéril. Chaneiko et al. (2019), utilizando um produto comercial à base de *M. anisopliae* em diferentes concentrações, obtiveram mortalidades máximas de 6,7% em larvas, 53% em pupas e 43% em adultos de *A. fraterculus*, além da redução da longevidade média dos adultos infectados (7,8 dias).

No estado do Amapá, já foram realizados estudos voltados ao uso de *M. anisopliae* para o controle da mosca-da-carambola [*Bactrocera carambolae* (Drew & Hancock, 1994)]. O isolado amazônico de *M. anisopliae* (CPAFAP-3.8) apresentou resultados promissores, causando 54% de mortalidade de imaturos de *B. carambolae* em substrato vermiculita (Silva et al., 2016) e 70% de mortalidade de imaturos em solo estéril (Brito et al., 2019). Além das mortalidades causadas em imaturos, Brito et al. (2019), utilizando esse mesmo isolado, também obtiveram redução na sobrevivência dos adultos após a emergência, de 70% (solo não estéril) até 100% (solo estéril). Este estudo teve por objetivo testar a eficiência, em laboratório, do isolado de *M. anisopliae* (CPAFAP-3.8) contra imaturos e adultos de *A. fraterculus*.

2. Metodologia

Para a realização do estudo, foi realizada uma pesquisa quantitativa e laboratorial (Pereira et al., 2018), baseada nos trabalhos já realizados por Silva et al. (2016) e Brito et al. (2019). Foi estabelecida uma criação de *A. fraterculus* em fevereiro de 2020, no Laboratório de Proteção de Plantas da Embrapa Amapá, proveniente de pupas cedidas pelo Laboratório de Entomologia da Embrapa Clima Temperado, sediada em Pelotas, Rio Grande do Sul.

Para a avaliação da mortalidade de imaturos e adultos desta espécie, foi utilizado o mesmo isolado de *M. anisopliae* empregado por Silva et al. (2016) e Brito et al. (2019), coletado em 2014, em um pomar urbano no município de Macapá (0°01'01.51''S, 51°06'35.18''O). O isolado está mantido em meio de cultivo Sabouraud Dextrose Ágar (SDA), na Coleção de

Micro-organismos Úteis à Agricultura da Embrapa Amapá, sob o código CPAFAP-3.8, além de estar preservado na Coleção de Fungos de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, na forma liofilizada e criopreservada, sob o código CG1313 (*M. anisopliae*). Este isolado também está registrado no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado), sob o código AB0FC87.

Foram utilizados quatro tratamentos para a avaliação da mortalidade de imaturos e adultos de *A. fraterculus*: 1. isolado de *M. anisopliae* em solo estéril; 2. isolado de *M. anisopliae* em solo não estéril; 3. testemunha em solo estéril e 4. testemunha em solo não estéril. Para cada tratamento foram utilizadas 10 repetições contendo 10 larvas de *A. fraterculus*.

2.1 Preparo do solo e das unidades experimentais

O solo utilizado no experimento foi proveniente de pomar implantado no Campo Experimental do Cerrado (00°23'13,3"N, 051°03'41,3"O), pertencente à Embrapa Amapá, na área rural do município de Macapá, AP. Foi realizada a coleta de 9 kg de solo, com cavadeira articulada, sob a copa das plantas do pomar. O solo foi acondicionado em sacos de plástico e transportado ao Laboratório de Proteção de Plantas da Embrapa Amapá. Em laboratório, todo o solo foi peneirado em peneira com malha de 4 mm, sendo que parte foi autoclavada a 120°C, por 20 minutos. A parte de solo que não foi autoclavada foi usada para compor os tratamentos de solo não estéril. As unidades experimentais foram constituídas por caixas gerbox (11 x 11 x 3 cm) contendo 120 gramas de solo cada.

2.2 Obtenção de larvas de *Anastrepha fraterculus*

Larvas de 3º instar foram obtidas a partir da criação de *A. fraterculus*. Para a obtenção de ovos foram utilizadas gaiolas plásticas semitransparentes (Figura 1A), com um grande número de indivíduos adultos em fase reprodutiva, machos e fêmeas, onde as fêmeas ovipositavam em uma das laterais da gaiola, constituída de tecido do tipo *voil* vermelho siliconado (Nunes et al., 2013). A cada 24 horas, a lateral de tecido era lavada com água destilada e os ovos coletados em uma bandeja de plástico. A água destilada contendo os ovos era transferida para um Becker de vidro e, após a decantação dos ovos, eles eram coletados com uma pipeta de plástico, dispostos sobre papel filtro e acondicionados sobre dieta artificial à base de farinha de milho e levedura, metodologia adaptada de Maset (2019).

Para o preparo da dieta, utilizou-se: 10 mL de Ácido Clorídrico e 12 mL de Metilparabeno (dissolvido a 10% em álcool P.A.) diluídos em 1.000 mL de água destilada; 6 g de ágar (dissolvido em 200 mL de água destilada quente); 1,5 g de Benzoato de Sódio; 100 g de farinha de milho; 130 g de extrato de levedura (Bionis® YE MF) e 40 g de açúcar refinado, metodologia adaptada de Maset (2019).

As dietas contendo os ovos de *A. fraterculus* (Figura 1B) foram armazenadas em sala climatizada (temperatura de 26 ± 2°C e fotofase de 12 horas) até as larvas atingirem o 3º instar. Após esse período, que dura em média 11 dias, as larvas foram colocadas (em grupos de 10) em recipientes de plástico com tampa (6 x 5 cm), momentos antes de serem transferidas para as caixas gerbox com solo.

2.3 Preparo da suspensão de *Metarhizium anisopliae*

Para o crescimento do isolado de *M. anisopliae* (CPAFAP-3.8) foram usadas placas de Petri com meio de cultivo Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) por 28 dias (Figura 1C), baseado nos resultados de esporulação em diferentes meios, obtidos por Silva (2015). A suspensão foi preparada de acordo com metodologia adaptada de Ekesi et al. (2003).

Em cada placa contendo o isolado foram acrescentados 10 mL de água destilada esterilizada (ADE) contendo 0,1% de TWEEN® 80 (solução dispersante). As placas foram raspadas superficialmente, para dispersar os conídios, e as suspensões resultantes foram transferidas para um frasco de vidro estéril (com tampa de rosca). Esse processo foi repetido mais duas vezes

para formar a suspensão inicial de trabalho. Os esporos da suspensão inicial foram contados em Câmara de Neubauer e sua concentração ajustada para 1×10^8 conídios mL^{-1} . Nessa suspensão ainda foram acrescentados a solução dispersante TWEEN® 80, na concentração de 0,1%, e o espalhante adesivo GRIP®, na concentração de 2%, obtendo-se a suspensão final de trabalho (Silva et al., 2020).

Na solução testemunha foi utilizada somente ADE contendo o dispersante TWEEN® 80 e o espalhante adesivo GRIP®, nas mesmas concentrações da suspensão de trabalho. As suspensões de cada tratamento foram transferidas para borrifadores de plástico, nunca utilizados anteriormente, previamente limpos com álcool a 70%.

2.4 Aplicação das suspensões e transferência das larvas para as unidades experimentais

O solo de cada gerbox foi umedecido com aproximadamente 5 mL de ADE e pulverizado com 10 mL das soluções correspondentes a cada tratamento. Posteriormente, grupos de 10 larvas de 3º instar de *A. fraterculus*, separadas anteriormente, foram dispostas sobre o solo de cada gerbox (Figura 1D). As caixas gerbox foram mantidas em câmara de crescimento do tipo B.O.D. ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, sem fotofase), da montagem do experimento até o 15º dia após a emergência do primeiro adulto.

2.5 Avaliação da emergência e mortalidade dos adultos de *Anastrepha fraterculus*

As caixas gerbox foram vistoriadas diariamente, sendo umedecidas com 5 mL de ADE a cada dois dias. A avaliação da mortalidade dos imaturos foi realizada com base na contagem do número de adultos de *A. fraterculus* emergidos. Para a avaliação da mortalidade de adultos, as moscas emergidas de cada repetição foram transferidas para gaiolas individuais (Figura 1E) com água e dieta específica, composta por gérmen de trigo, extrato de levedura Bionis® e açúcar refinado, na proporção 1:1:3 (Nunes et al., 2013). As gaiolas contendo os adultos foram vistoriadas diariamente por um período de 28 dias, contados a partir da emergência do primeiro adulto.

Para verificar a exteriorização dos sinais de *M. anisopliae*, os adultos mortos passaram pelo processo de assepsia com álcool a 70%, Hipoclorito de Sódio a 0,1% e ADE, e foram colocados em câmara úmida (placa de Petri com papel filtro umedecido). Esta assepsia objetivou remover outros micro-organismos presentes na superfície da mosca, favorecendo o crescimento e a identificação de *M. anisopliae*. As placas foram mantidas em câmara de crescimento do tipo B.O.D. ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, sem fotofase) e avaliadas diariamente até a confirmação dos sinais de infecção por *M. anisopliae* (Figura 1F). Para saber se as moscas estavam ou não infectadas pelo fungo, os espécimes foram analisados sob microscópio estereoscópio a fim de verificar os sinais característicos da espécie *M. anisopliae* (especialmente os detalhes morfológicos dos conídios).

Figura 1. A) Gaiolas de criação de *Anastrepha fraterculus* em laboratório; B) Ovos de *A. fraterculus* dispostos sobre papel filtro, em dieta artificial (vide setas); C) Colônia de *Metarhizium anisopliae* CPAFAP-3.8; D) Larvas de *Anastrepha fraterculus* sobre o solo em caixa gerbox; E) Gaiola individual para adulto de *Anastrepha fraterculus*; F) Adulto de *A. fraterculus* com exteriorização de sinais de *Metarhizium anisopliae* CPAFAP-3.8.



Fotos: Taline de Lima Silva.

2.6 Análise dos dados

Os dados de emergência e mortalidade de adultos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, para avaliar a normalidade, e ao teste de Bartlett, para verificar a homocedasticidade. Como os dados de porcentagem de emergência e de mortalidade de adultos não seguiram esses pressupostos, eles foram transformados para arco-seno da raiz quadrada. Os dados foram submetidos à Análise de Variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no software R (R Core Team, 2018).

3. Resultados

Houve diferença significativa entre os tratamentos para o percentual de adultos emergidos (Anova: $F_{3,36} = 17,36$, $P < 0,001$). A emergência foi menor ($23,0 \pm 14,9\%$; média \pm DP) para o tratamento com *M. anisopliae* em solo estéril, em relação aos demais (Tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio padrão da porcentagem de emergência de *Anastrepha fraterculus* submetida a tratamentos com *Metarhizium anisopliae* e testemunha, em solo estéril e não estéril.

Tratamentos	Emergência (%) (média \pm desvio padrão)
<i>M. anisopliae</i> - solo estéril	$23,0 \pm 14,9$ b
<i>M. anisopliae</i> - solo não estéril	$70,0 \pm 15,6$ a
Testemunha - solo estéril	$76,0 \pm 22,7$ a
Testemunha - solo não estéril	$72,0 \pm 13,2$ a

*Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas entre as médias ao nível de 0,05, de acordo com o teste Tukey.
Fonte: Elaborado pelos autores.

Houve diferença significativa entre os tratamentos para o percentual de mortalidade total de adultos (Anova: $F_{3,36} = 55,4$, $P < 0,001$) e mortalidade causada por *M. anisopliae* (Anova: $F_{1,17} = 0,05$, $P = 0,82$) (Tabela 2).

A mortalidade total de adultos foi maior nos tratamentos com *M. anisopliae* em solo estéril (100%) e não estéril ($98,6 \pm 5,3\%$), em relação às testemunhas (Tabela 2). A mortalidade causada estritamente por *M. anisopliae* foi semelhante entre os tratamentos em solo estéril ($82,6 \pm 18,7\%$) e não estéril ($88,4 \pm 20,3\%$) (Tabela 2). Como era de se esperar, nos tratamentos testemunha não houve mortalidade causada pelo fungo.

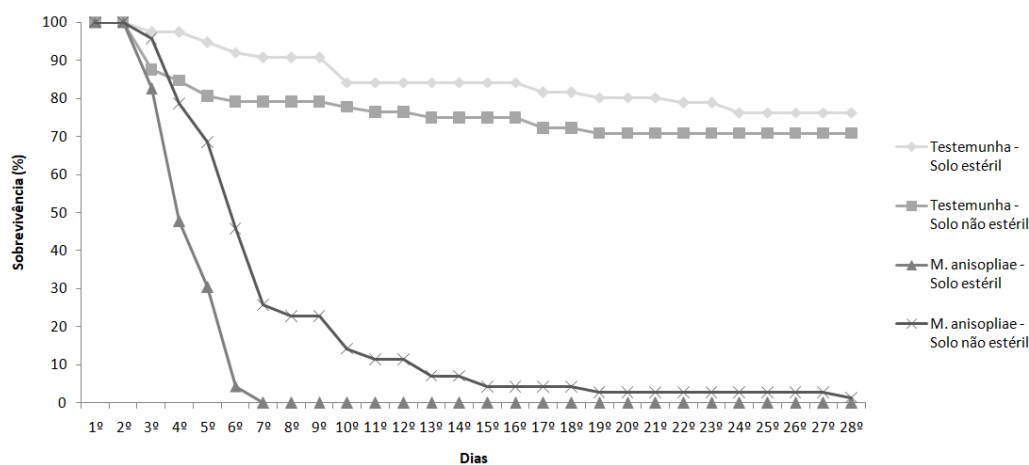
Tabela 2. Média e desvio padrão da porcentagem de mortalidade total e mortalidade causada por *Metarhizium anisopliae* em adultos de *Anastrepha fraterculus* em solo estéril e não estéril.

Tratamentos	Mortalidade total (%) (média \pm desvio padrão)	Mortalidade pelo fungo (%) (média \pm desvio padrão)
<i>M. anisopliae</i> - solo estéril	$100,0 \pm 0,0$ a	$82,6 \pm 18,7$ a
<i>M. anisopliae</i> - solo não estéril	$98,6 \pm 5,3$ a	$88,4 \pm 20,3$ a
Testemunha - solo estéril	$23,7 \pm 14,2$ b	-
Testemunha - solo não estéril	$29,2 \pm 17,0$ b	-

*Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas entre as médias ao nível de 0,05, de acordo com o teste Tukey.
Fonte: Elaborado pelos autores.

Houve redução na sobrevivência de adultos de *A. fraterculus* em solo estéril e não estéril tratado com *M. anisopliae* (Figura 2). No 4º dia após a emergência, a sobrevivência de adultos em solo estéril tratado com *M. anisopliae* foi reduzida para 47,8% e, aos 7 dias, já não havia mais insetos vivos (Figura 2). Em solo não estéril tratado com *M. anisopliae*, também houve uma intensa redução na sobrevivência dos adultos, com destaque para o 4º, 6º e 7º dias, com reduções da ordem de 25,7%, 45,7% e 78,5%, respectivamente (Figura 2). Nos tratamentos testemunha (solo estéril e não estéril) não foi observada mortalidade acentuada nos adultos emergidos (Figura 2).

Figura 2. Curva de sobrevivência de adultos de *Anastrepha fraterculus* submetidos aos tratamentos com *Metarhizium anisopliae* e testemunha em solo estéril e não estéril, em laboratório.



Fonte: Elaborado pelos autores.

4. Discussão

No presente estudo ficou evidente a ação letal do isolado de *M. anisopliae* (CPAFAP-3.8) sobre imaturos de *A. fraterculus*. A emergência de apenas 23% de adultos em solo estéril demonstra o efeito direto desse agente de controle biológico sobre a mortalidade de imaturos dessa espécie (Tabela 1). Não houve diferença significativa entre a emergência de adultos em solo não estéril tratado com *M. anisopliae* (70%) e a emergência de adultos em solo estéril (76,0%) e não estéril (72,0%) não tratados com o agente de biocontrole (Tabela 1). Possivelmente, a ocorrência de competição microbiana no solo não estéril tratado com o fungo entomopatogênico foi determinante para que a emergência de adultos de *A. fraterculus* fosse alta nesse tratamento. Como esperado, nos tratamentos com solo estéril e não estéril não tratados com o micro-organismo (testemunhas) a emergência de adultos foi alta.

Os resultados também demonstraram um efeito direto de *M. anisopliae* na mortalidade de adultos de *A. fraterculus* após a emergência, uma vez que os adultos mortos (aqueles que apresentaram sinais de infecção pelo micro-organismo) foram de 82,6% em solo estéril e de 88,4% em solo não estéril (Tabela 2). É muito importante observar que, embora a emergência de adultos tenha sido alta no tratamento de solo não estéril tratado com o agente de controle biológico (Tabela 1), a mortalidade total causada por *M. anisopliae* após a emergência (98,6%) não diferiu significativamente da mortalidade causada pelo fungo entomopatogênico em solo estéril (100%). Baixas mortalidades de adultos de *A. fraterculus* foram observadas nos tratamentos testemunha, tanto em solo estéril (23,7%) quanto não estéril (29,2%) (Tabela 2).

No presente estudo também foi avaliada a sobrevivência dos adultos de *A. fraterculus* emergidos em solo estéril e não estéril. Embora o período de avaliação da sobrevivência tenha se estendido por somente 28 dias, contados a partir da emergência do primeiro adulto, foi possível observar, já no 7º dia após a emergência, uma redução na sobrevivência de 100% e 75% em solo estéril e não estéril tratado com *M. anisopliae*, respectivamente (Figura 2). Essa redução na sobrevivência de adultos (mortalidade) até o 7º dia após a emergência é extremamente importante sob o ponto de vista prático, uma vez que o período de pré-oviposição de *A. fraterculus*, embora dependente da espécie hospedeira e das condições ambientais, se inicia entre o 7º e 12º dias após a emergência (Salles, 1993; Bisognin et al., 2013; Machota Jr. et al., 2010), fazendo com que os insetos adultos emergidos ainda não tenham atingido o período de oviposição e, conseqüentemente, não contribuam para o aumento da população da praga. Também é importante salientar que nos tratamentos testemunha do presente estudo, a sobrevivência dos adultos foi elevada, atingindo 84,2% em solo estéril e 77,7% em solo não estéril (Figura 2).

Destéfano et al. (2005) também procuraram avaliar o efeito de *M. anisopliae* sobre imaturos e adultos de *A. fraterculus*, utilizando solo autoclavado e não autoclavado. Esses autores observaram, para a concentração de $2,52 \times 10^9$ conídios/grama de solo, que houve emergências de 54% e 60% em solo estéril e não estéril, respectivamente. Já para a concentração de $2,52 \times 10^{10}$ conídios/grama de solo, a emergência de adultos foi de 14%, tanto para solo estéril quanto não estéril. Esses resultados são inferiores aos obtidos no presente estudo para emergência de adultos em solo estéril tratado com *M. anisopliae* (23%), porém são superiores em solo não estéril para a concentração de $2,52 \times 10^9$ conídios/grama de solo, e em solo estéril e não estéril para a concentração de $2,52 \times 10^{10}$ conídios/grama de solo. No entanto, ressalta-se que aqueles autores utilizaram concentrações de conídios superiores às empregadas no presente estudo, bem como uma distribuição artificializada dos propágulos no substrato, o que não é factível quando se considera uma aplicação prática da estratégia para o controle de *A. fraterculus* em campo.

Outro estudo avaliando o efeito de *M. anisopliae* para o controle de *A. fraterculus* foi realizado utilizando o produto comercial Metarril® WP E9 (Chaneiko et al., 2019). Os autores avaliaram o efeito de diferentes concentrações de conídios de *M. anisopliae* do produto comercial sobre larvas e pupas de *A. fraterculus* em laboratório, obtendo mortalidades máximas de 6,7% em larvas, 53,3% em pupas e 43% em adultos. Nesse estudo a mortalidade total obtida, considerando larvas, pupas e adultos emergidos, foi elevada (96,7%). Porém, é importante destacar que os ensaios foram realizados em condições altamente controladas, submetendo-se larvas e pupas ao contato direto com papel filtro umedecido com a solução do produto comercial, o que certamente influenciou na alta mortalidade total observada. Ressalta-se, também, que no presente estudo com *M. anisopliae* a mortalidade total em solo estéril e não estéril foi igualmente elevada, da ordem de 100% e 98,6%, respectivamente (Tabela 2).

Ainda em relação a *A. fraterculus*, é importante mencionar um elucidativo estudo realizado por Bechara et al. (2011), utilizando técnicas histológicas e moleculares. Os autores demonstraram que o ciclo infectivo de *M. anisopliae* sobre imaturos dessa espécie, desde a adesão do conídio à cutícula até a morte do hospedeiro, leva em torno de 96 horas. Os resultados obtidos por aqueles autores contribuem para o entendimento da elevada redução da sobrevivência dos adultos de *A. fraterculus* em solo estéril e não estéril logo nos primeiros dias do presente estudo. Essa informação, embora tenha sido obtida em condições experimentais ideais, é muito importante para o planejamento de estratégias de controle biológico que consideram o uso de *M. anisopliae* não somente para o controle de *A. fraterculus*, mas também para outras espécies de moscas-das-frutas de importância econômica e quarentenária, já que pode direcionar o desenvolvimento de formulações que privilegiem a sobrevivência e atividade do agente de biocontrole pelo menos durante esse período (96 horas).

Metarhizium anisopliae também já foi avaliado para o controle da mosca-das-frutas-mexicana [*Anastrepha ludens* (Loew, 1873)], por meio de pulverização direta sobre adultos dessa espécie, o que proporcionou mortalidade de 50% dos adultos em 6 dias e 100% em 13 dias, sendo 92,3% dos adultos mortos estritamente por *M. anisopliae* (Toledo-Hernández et al., 2018). Nos dados obtidos no presente estudo, o isolado de *M. anisopliae* causou a redução total da sobrevivência dos adultos de *A. fraterculus* no tratamento com solo estéril aos 7 dias, e reduziu para 45,7% a sobrevivência em solo não estéril em 6 dias. Em relação à mortalidade de adultos causada estritamente por *M. anisopliae*, o isolado amazônico causou 82,6% de mortalidade de adultos em solo estéril e 88,4% de mortalidade de adultos em solo não estéril. Portanto, os resultados de sobrevivência e de mortalidade de *A. fraterculus* estritamente causada pelo fungo se assemelham aos encontrados por Toledo-Hernández et al. (2018) para *A. ludens*, mesmo com as diferenças metodológicas entre os estudos, pois as condições utilizadas pelos referidos autores não se aproximam das condições reais de infecção, seja pelo solo ou pela pulverização da parte aérea das plantas.

Pulverizações de campo com *M. anisopliae* foram realizadas por Lezama-Gutiérrez et al. (2000) para o controle da mosca-das-frutas-mexicana (*A. ludens*). Os autores obtiveram reduções na emergência de adultos de *A. ludens* de 22% e 43%

em condições de solo franco-arenoso e solo franco, respectivamente, quando comparado com o tratamento sem o isolado de *M. anisopliae*. Os resultados descritos acima indicam um ótimo potencial de *M. anisopliae* para o controle da mosca-das-frutas-mexicana em condições de campo. Já no presente trabalho, houve uma emergência de 23% de adultos de *A. fraterculus* em solo estéril tratado com *M. anisopliae*, comparado a 76% do tratamento testemunha. Embora esse resultado se aproxime do resultado encontrado por Lezama-Gutiérrez et al. (2000) em solo franco, ainda são necessários estudos com o isolado amazônico para verificar a redução da emergência de *A. fraterculus* em campo.

O potencial de *M. anisopliae* para controle biológico de *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) também foi avaliado em condições de laboratório no México (Díaz-Ordaz et al., 2010) e na Colômbia (Osorio-Fajardo & Canal, 2011). Nestes estudos, *M. anisopliae* causou 89,8% de mortalidade de adultos após contato direto com a suspensão de conídios (Díaz-Ordaz et al., 2010) e 34% de mortalidade de adultos emergidos de vermiculita tratada com suspensão de conídios (Osorio-Fajardo & Canal, 2011). Esses resultados são inferiores aos resultados encontrados no presente estudo, que apresentou 100% e 98,6% de mortalidades de adultos de *A. fraterculus* após contato com solo estéril e não estéril tratados com suspensão de conídios. Portanto, os estudos realizados com *A. obliqua* e *A. fraterculus* comprovaram a capacidade infectiva de diferentes isolados de *M. anisopliae* sobre adultos dessas duas espécies de moscas-das-frutas em condições experimentais controladas, sugerindo que esses agentes de controle biológico também poderão vir a ser utilizados em programas de manejo integrado dessas importantes espécies.

Entretanto, mais uma vez enfatiza-se a necessidade dos estudos estarem alinhados às condições normalmente encontradas em campo. Como este ambiente apresenta grande variação de temperatura e umidade e períodos com maior e menor pluviosidade, deve-se avaliar a capacidade do solo tanto em manter a umidade superficial nas primeiras camadas do solo, quanto em relação ao escoamento da água para que o solo não fique encharcado por longos períodos. Além disso, é necessário verificar a interação do fungo com outros agentes e insetos já presentes no ambiente, o período de frutificação das espécies do pomar, que influencia diretamente a presença de larvas no solo, e o uso de outros defensivos químicos. Todos esses fatores devem ser avaliados no uso do controle biológico com *M. anisopliae* em campo, pois influenciam sua eficácia e os custos necessários para sua implantação.

5. Considerações Finais

Nesse estudo ficou demonstrado que, em condições controladas, o isolado de *M. anisopliae* apresenta virulência contra imaturos e adultos de *A. fraterculus* em solo estéril e não estéril. Tendo em vista que esse mesmo micro-organismo já se mostrou altamente eficiente para o controle da espécie quarentenária *B. carambolae*, vislumbra-se a possibilidade de utilizá-lo também para o controle de *A. fraterculus*, sendo ainda necessários estudos para validação em condições de campo. São também prementes estudos para o desenvolvimento de formulações apropriadas que permitam um maior tempo de armazenamento (tempo de prateleira) e privilegiem a viabilidade e virulência dos conídios desse agente de controle biológico em campo.

Referências

- Alves, S. B. (1998a). Patologia e Controle Microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S. B. *Controle Microbiano de insetos* (2nd ed., cap 1, p. 21-38). Piracicaba: FEALQ.
- Alves, S. B. (1998b). Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. *Controle Microbiano de insetos* (2nd ed., cap. 11, p. 289-382). Piracicaba: FEALQ.
- Anvisa. (2002). *Agrotóxicos e Toxicologia: Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos: Relatório anual*. <http://www.anvisa.gov.br>.
- Bechara, I. J., Destéfano, R. H. R., Bresil, C., & Messias, C. L. (2011). Histopathological events and detection of *Metarhizium anisopliae* using specific primers in infected immature stages of the fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae). *Brazilian Journal of Biology*, 71(1).

- Bisognin, M., Nava, D. E., Lisboa, H., Bisognin, A. Z., Garcia, M. S., Valgas, R. A., Diez-Rodríguez, G. I., Botton, M., & Antunes, L. E. C. (2013). Biologia de moscas-das-frutas sul-americana em frutos de mirtilo, amoreira-preta, araçazeiro e pitangueira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(2), 141-147.
- Botton, M., Junior, R. M., Bortoli, L. C., & Frighetto, J. M. (2017). *Captura massal da mosca-das-frutas sul-americana Anastrepha fraterculus (Diptera: Tephritidae) como estratégia para a supressão populacional em cultivo protegido de uva fina de mesa*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho (Circular técnica, 136), 15 p.
- Botton, M., Nava, D. E., Arioli, C. J., Grutzmacher, A., Rosa, J. M., Junior, R. M., & Borges, R. (2014). Supressão necessária. *Revista Cultivar*, 10-13.
- Brilinger, D., Farina, E., Rosa, J. M., Netto, A. C. M., Arioli, C. J., & Boff, M. I. C. (2018). Captura massal: uma ferramenta no manejo de moscas-das-frutas. *Revista da 15ª jornada de pós graduação e pesquisa (Congrega Urcamp)*, 15(15).
- Brito, B. D., Lima, A. L., Cruz, K. R., Bariani, A., Jesus-Barros, C. R., Pereira, J. F., & Adaime, R. (2019). Amazonian isolates of *Metarhizium* are effective for killing *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae). *Acta Biologica Colombiana*, 24(1), 118-124.
- Chaneiko, S. M., Brida, A. L., Bassa, P. G., Telles, M. H. F., Santos, L. A., Pereira, D. I. B., Pereira, R. M., & Garcia, F. R. M. (2019). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) and effects on adult longevity. *Journal of Agricultural Science*, 11(16), 132-140.
- Destéfano, R. H. R., Bechara, I. J., Messias, C. L., & Piedrabuena, A. E. (2005). Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* against immature stages of *Anastrepha fraterculus* fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Brazilian Journal of Microbiology [online]*, 36 (1), 94-99.
- Díaz-Ordaz, N. H., Pérez, N., & Toledo, J. (2010). Patogenicidad de tres cepas de hongos entomopatógenos a adultos de *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) en condiciones de laboratorio. *Acta Zoológica Mexicana*, 26(3), 481-494.
- Ekesi, S., Maniania, N. K., & Lux, S. A. (2003). Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83, 157-167.
- Lezama-Gutiérrez, R., Luz, A. T., Molina-Ochoa, J., Rebolledo-Dominguez, O., Pescador, A. R., López-Edwards, M., & Aluja, M. (2000). Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae): laboratory and field trials. *Journal of Economic Entomology*, 93(4), 1080-1084.
- Machota Jr., R., Bortoli, L. C., Tolotti, A., & Botton, M. (2010). *Técnica de criação de Anastrepha fraterculus (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae) em laboratório utilizando hospedeiro natural*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 15), 22 p.
- Malavasi, A., Zucchi, R. A., & Sugayama, R. L. (2000). Biogeografia. In: Malavasi, A.; Zucchi, R. A. (ed.). *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado* (cap. 10, p. 93-98). Ribeirão Preto: Holos.
- Maset, B. A. (2019). *Eficiência de dietas larvais para produção massal de Ceratitis capitata e Anastrepha fraterculus (Diptera: Tephritidae)*. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo.
- Nava, D. E., & Botton, M. (2010). *Bioecologia e controle de Anastrepha fraterculus e Ceratitis capitata em pessegueiro*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado (Documentos, 315). 29 p.
- Nunes, A. M., Costa, K. Z., Faggione, K. M., Costa, M. L. Z., Gonçalves, R. S., Walder, J. M. M., Garcia, M. S., & Nava, D. E. (2013). Dietas artificiais para a criação de larvas e adultos da mosca-das-frutas sul-americana. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(10), 1309-1314.
- Osorio-Fajardo, A., & Canal, N. A. (2011). Selección de cepas de hongos entomopatógenos para el manejo de *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) (Diptera: Tephritidae) em Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 64(2), 6129-6139.
- Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. [free e-book]. Santa Maria/RS. Ed. UAB/NTE/UFSM.
- R Core Team. (2018). *R: A language and environment for statistical computing*. Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>.
- Salles, L. A. B. (1995). *Bioecologia e controle da mosca-das-frutas sul-americana*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 58 p.
- Salles, L. A. B. (1993). Efeito da temperatura constante na oviposição e no ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera:Tephritidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 22(1), 57-62.
- Silva, T. L. (2015). *Controle biológico de imaturos de Bactrocera carambolae (Diptera: Tephritidae) por Metarhizium spp. no estado do Amapá*. 36 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional) – Universidade Federal do Amapá, Macapá.
- Silva, T. L., Lima, A. L., Sousa, M. S. M., Jesus Barros, C. R., Bariani, A., Pereira, J. F., & Adaime, R. (2016). Potential of Amazonian isolates of *Metarhizium* to control immatures of *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 99(4), 788-789.
- Silva, T. L., Santos, J. E. V., Sousa, M. S. M., Bariani, A., Jesus, C. R., Lima, A. L., & Adaime, R. (2020). Técnica para avaliação da efetividade de fungos entomopatógenos na redução da população de moscas-das-frutas em condições de campo. In: Silva, C. D. D. (org.). *Coletânea Nacional sobre Entomologia 3* (p. 65-78). Ponta Grossa, PR: Atena.
- Toledo-Hernández, R. A., Toledo, J., & Sánchez, D. (2018). Effect of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales:Clavicipitaceae) on food consumption and mortality in the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Diptera:Tephritidae). *Internacional Journal of Tropical Insect Science*, 38(3), 254-260.
- Vinhal, D. C., & Soares, V. H. C. (2018). Intoxicação por organofosforados: uma revisão da literatura. *Revista científica FacMais*, 14(3).
- Zucchi, R. A., & Moraes, R. C. B. (2022). *Fruit flies in Brazil - Anastrepha species their host plants and parasitoids*. <http://www.lea.esalq.usp.br/anastrepha>.