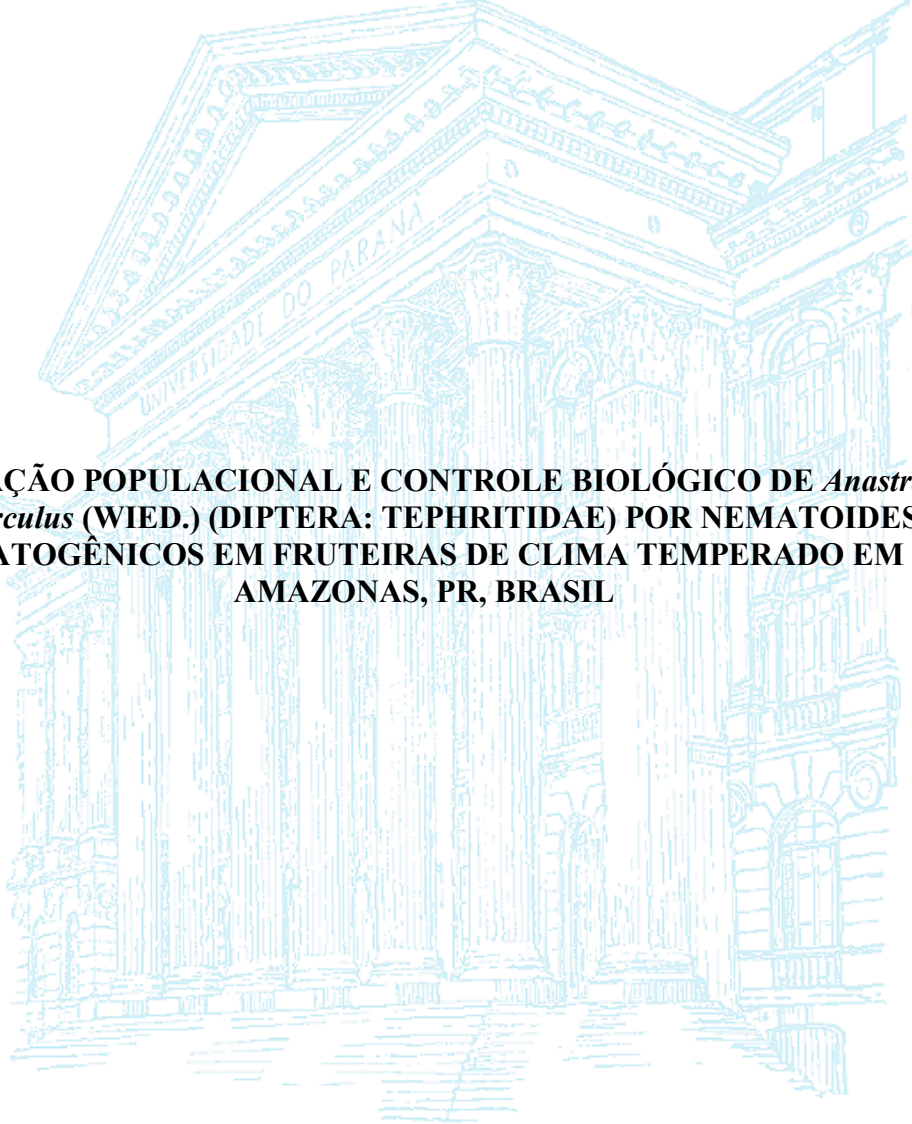


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ESTER FOELKEL



FLUTUAÇÃO POPULACIONAL E CONTROLE BIOLÓGICO DE *Anastrepha fraterculus* (WIED.) (DIPTERA: TEPHRITIDAE) POR NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM FRUTEIRAS DE CLIMA TEMPERADO EM PORTO AMAZONAS, PR, BRASIL

CURITIBA  
2015

**ESTER FOELKEL**

**FLUTUAÇÃO POPULACIONAL E CONTROLE BIOLÓGICO DE *Anastrepha fraterculus* (WIED.) (DIPTERA: TEPHRITIDAE) POR NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM FRUTEIRAS DE CLIMA TEMPERADO EM PORTO AMAZONAS, PR, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Orientador:** Prof. Dr. Lino B. Monteiro

**Co-orientador:** Dr. Marcio Voss

**CURITIBA  
2015**

F654 Foelkel, Ester

Flutuação populacional e controle biológico de *Anastrepha fraterculus* (WIED.) (DIPTERA: TEPHRITIDAE) por nematoides entomopatogênicos em fruteiras de clima temperado em Porto Amazonas, PR, Brasil. / Ester Foelkel. Curitiba: 2015.  
113 f. il.

Orientador: Lino B. Monteiro

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná.  
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal.

1. Nematoides. 2. Controle Biológico. 3. Nematoda em plantas.  
I. Monteiro, Lino B.. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal. III. Título.

CDU 632.937:632.651



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL




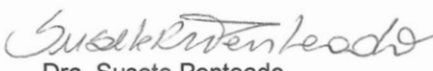
## PARECER


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO, apresentada pela candidata **ESTER FOELKEL**, sob o título "**FLUTUAÇÃO POPULACIONAL E CONTROLE BIOLÓGICO DE *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (DIPTERA: TEPHRITIDAE POR NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM FRUTEIRAS DE CLIMA TEMPERADO EM PORTO AMAZONAS, PR, BRASIL**", para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

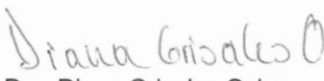
Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Tese.

Curitiba, 14 de Dezembro de 2015.

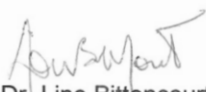
  
Professor Dr. Cícero Deschamps  
Coordenador do Programa

  
Dra. Susete Pentead  
Primeira Examinadora

  
Dr. Wilson Reis  
Segundo Examinador

  
Dra. Diana Grisales Ochoa  
Terceira Examinadora

  
Professor Dr. Marco Aurélio Tramontin da Silva  
Quarto Examinador

  
Professor Dr. Lino Bittencourt Monteiro  
Presidente da Banca e Orientador

## DEDICATÓRIA

*Durante meu doutoramento perdi minhas duas avós, ambas com mais de 90 anos, e devido aos meus deveres e comprometerimentos do projeto não pude me despedir. Dessa forma, dedico esse trabalho à Maria Marcello David (in memoriam) e à Eugênia B. Foelkel (in memoriam).*

## AGRADECIMENTOS

Foram quatro anos de muitos aprendizados não apenas científicos e acadêmicos, mas sobre tudo, também, foram tempos de reflexão, de solidão e de amadurecimento que não seriam possíveis sem a passagem de algumas pessoas nessa caminhada. Por isso, sou agradecida:

À Deus pela força mental e saúde física que me mantiveram firme e que me permitiram a finalização dessa etapa na minha vida;

Ao meu esposo Eduardo, que foi e sempre será um amigo, professor, estagiário e sobre tudo o melhor dos companheiros que uma pessoa como eu jamais poderia ter. Obrigada pelo amor, pela calma e pelo apoio que foram mais do que fundamentais para a elaboração desse trabalho;

Aos meus pais Celso e Lorena que me apoiaram e acreditaram no meu potencial. Mesmo estando longe, agradeço a compreensão e as palavras sempre produtivas e positivas que me deram força para a caminhada;

À minha irmã Ale que mesmo fisicamente ausente sempre esteve presente de espírito, me ajudando com saudosas palavras amigas e conselhos;

À toda a família Brugnara que me apoiou e incentivou durante todo este percurso. Em especial para minha sogra Noeli e meus sobrinhos (Alana, Breno, Jhoni, Lara, Nicoli e Thais) que me enchem de alegria com suas brincadeiras, carinho e energia;

À tia Hosana e minhas primas por me receberem em Piracicaba durante busca de material biológico;

Ao meu orientador Prof. Dr. Lino B. Monteiro por ter me aceitado no Lamip e oportunizado trabalhar com moscas-da-fruta;

Ao meu co-orientador Dr. Marcio Voss que me ajudou demais com seus ensinamentos sobre nematoides entomopatogênicos;

À Costantino R. F. Costantini e à Gilberto Boutin pela liberação de áreas de pomar para a elaboração deste estudo;

Ao Eng.-agr. Carlos Alberto Ceara e ao Sr. Nico Sousa pelo auxílio nas áreas de pomar;

À Maria de Lourdes Z. Costa pelo auxílio técnico sobre moscas-da-fruta e pelo fornecimento de material biológico, fundamentais para a elaboração dessa tese;

Ao Dr. Luis Garrigós Leite do Instituto Biológico e à Profa. Dra. Viviane Sandra Alves pelo fornecimento de isolados de nematoides para realização dos artigos de virulência;

Ao pesquisador Dr. Pedro Strikis pela identificação de moscas;

Ao Dr. Osmar dos Santos Ribas pela ajuda na identificação do material herborizado;

Ao Dr. Tesfamarian Mengistu pela identificação de nematoides e pelo auxílio na interpretação dos dados;

Aos professores da UFPR Dr. Luis Antonio Biasi e Dr. Átila Fransico Mógor pelo auxílio com o projeto e esclarecimento de dúvidas;

Ao Dr. Cristiano Nesi, da Epagri de Chapecó, pelo auxílio com as análises multivariadas;

À Dra. Regina de Carvalho pela ajuda durante as semanas que passei no Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti (CDME) e pelo empréstimo de bibliografias;

Aos pesquisadores da Embrapa Florestas Dra. Susete Penteado e Dr. Leonardo Barbosa pelas contribuições durante a qualificação e pelo apoio e aprendizado no estágio durante o primeiro ano de curso;

Aos professores da Pós-Graduação em Agronomia, Produção Vegetal, pelos ensinamentos;

À secretária do PGAPV, Sra. Lucimara Antunes, pelo auxílio, disposição e paciência;

Ao técnico Edson Chappuis pelo auxílio em laboratório e pela manutenção do material biológico em laboratório especialmente, durante o último ano de estudos;

Ao trio de Guilhermes: (Garcia, Nishimura e Silvestre), que auxiliaram no campo e no laboratório;

Aos colegas André L. Martins e José Antônio S. Tomba pelo auxílio com a identificação de material biológico;

Aos colegas de laboratório (Rosangela Teixeira, Luis Gustavo Witt, Hélio Mayer, Rodrigo Monteiro, Waléria Pacheco, Debora Gabardo, Marcel Klemba e Denis Alves) pelos momentos de descontração e ajuda no trabalho;

À Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias e ao curso de pós-graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de realização deste curso;

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida;

Ao Instituto Tecnológico Simepar, por fornecer dados meteorológicos;

A todos que contribuíram diretamente e/ou indiretamente para a realização desse trabalho.

## RESUMO

*Anastrepha fraterculus* é uma praga-chave para fruteiras de clima temperado. O conhecimento de sua flutuação populacional, de fatores abióticos e bióticos que a influenciam e de formas alternativas de controle como o uso de nematoides entomopatogênicos (NEPs) auxiliariam no seu combate e na redução do uso de agrotóxicos. Objetivou-se neste trabalho a caracterização da flutuação populacional de *A. fraterculus* em pomares de pessegueiro, caqui e macieiras e em suas matas adjacentes, relacionando com fatores bióticos e abióticos; também, a identificação de isolados de NEPs nativos virulentos à *A. fraterculus*, relacionando sua captura com fatores bióticos e abióticos em pomar de macieira; e, ainda, comparar a virulência de NEPs nativos com a de isolados de outras regiões, utilizando solo de pomar de macieira como substrato e avaliando a eficiência a campo dos NEPs mais virulentos em pomar de macieira. Todos os trabalhos foram conduzidos em Porto Amazonas - Paraná, Brasil e no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas, da UFPR. No experimento de flutuação populacional de *A. fraterculus*, armadilhas McPhail modificadas foram instaladas em matas adjacentes e dentro dos pomares para a captura de moscas-das-frutas e de parasitoides himenópteros. Também foi realizada uma análise florística, quantificando as espécies hospedeiras de *A. fraterculus* nas matas adjacentes, bem como a coleta de frutos de fruteiras comerciais e de hospedeiros alternativos de *A. fraterculus* para avaliar níveis de infestação. Com relação à ocorrência de NEPs nativos em pomar de macieira, amostras de solo foram coletadas mensalmente, com e sem a presença de frutos sobre ele, e expostas a larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) e de *A. fraterculus* para a captura de NEPs. Após a confirmação da patogenicidade em *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) os isolados foram mantidos a 15 °C para posterior identificação e testes de virulência em *A. fraterculus*. Em experimento de laboratório visando à comparação de NEPs nativos de Porto Amazonas (LAMIP) e outros de outras regiões, o substrato utilizado foi solo do mesmo pomar de macieira dos nematoides nativos. O solo foi acondicionado em potes contendo 12 larvas de *A. fraterculus* mais os tratamentos (doses de isolados de NEPs, mais a testemunha). Vinte e dois dias após a inoculação os adultos foram contados e as larvas e pupas mortas foram observadas para a verificação da presença de NEPs. Em experimento de campo, em pomar de macieira, *Steinernema carpocapsae* CB 02 e *Heterorhabditis amazonensis* CB 24 tiveram sua virulência testada em larvas de *A. fraterculus* nas doses de 180 juvenis infectivos (JI) por larva e a sua mistura com meia dose de cada. Cilindros de PVC foram cravados 10 cm no solo de uma linha do pomar livre de NEPs nativos. Cada cano representou uma parcela recebendo 60 larvas de *A. fraterculus* mais os tratamentos. Cartelas adesivas foram acondicionadas dentro de cada cano para o registro da emergência dos adultos. *A. fraterculus* foi a espécie dominante de moscas-das-frutas capturada em Porto Amazonas, PR. Os dois pomares de macieira foram os que apresentaram maior captura de moscas; porém, apenas em um deles se capturou mais moscas no pomar do que na mata. O aumento de *A. fraterculus* capturadas mostrou correlação positiva com o número de parasitoides, infestação dos frutos e com os frutos maduros no pomar. Com relação à ocorrência de NEPs nativos em pomar de macieira, 73 isolados de NEPs foram obtidos em 23,2% das amostras de solo. Vinte isolados tiveram sua virulência testada em larvas de *A. fraterculus* em laboratório e apenas cinco diferiram do controle. Todos foram identificados como *Oscheius* sp. A taxa de obtenção dos nematoides não variou com as estações do ano, a presença de fruto acima do solo e condições edafoclimáticas. Em experimento comparando a virulência de isolados nativos com outros endêmicos de outras regiões, observou-se que *S. carpocapsae* CB 02 foi o



que provocou maior mortalidade de *A. fraterculus*. Isolados *Heterorhabditis* e LAMIP 09 (*Oscheius* sp.) apresentaram virulência intermediária, enquanto que LAMIP 92 (*Oscheius* sp.) não diferiu da testemunha. *S. carpocapsae* CB 02 foi capaz de matar 50% e 90% da população de larvas *A. fraterculus* com 96,3 e 314,7 JI larva<sup>-1</sup>, respectivamente, utilizando-se solo não estéril obtido dos pomares em estudo. Em experimento em pomar de macieira, a mortalidade da mosca observada com CB 02 foi superior à com CB 24, sendo que o último não diferiu do controle. Como conclusão, os picos populacionais de *A. fraterculus* obedecem à maturação dos frutos nos pomares em estudo, com exceção para o de pessegueiro. Os NEPs nativos ocorrem em baixa densidade e não apresentam picos populacionais. O uso de NEPs para integrar o manejo de *A. fraterculus* requer aplicação de isolados mais eficientes, através de inoculações, uma vez que os isolados nativos apresentaram baixa ocorrência e eficiência. Dentre os isolados comparados, *S. carpocapsae* CB 02 apresenta o melhor resultado para o controle de *A. fraterculus* no solo de Porto Amazonas, PR. Estudos de campo devem ser feitos para validar seu uso em cada condição de clima e solo.

Palavras-chaves: caquizeiro, ecologia, macieira, moscas-das-frutas-sulamericana, NEP, pessegueiro.

## ABSTRACT

### POPULATION FLUCTUATION AND BIOLOGICAL CONTROL OF *Anastrepha fraterculus* (WIED.) (DIPTERA: TEPHRITIDAE) WITH ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES IN TEMPERATE FRUIT SPECIES IN PORTO AMAZONAS, PR, BRAZIL

*Anastrepha fraterculus* is a key pest in temperate fruit orchards. Biotic and abiotic factors that influence its population fluctuation and alternative control measures like the use of entomopathogenic nematode (EPNs) could help its control reducing chemical sprays. The objectives of this work were to characterize *A. fraterculus* population fluctuation in peach, persimmon and apple orchards and in their adjacent forests, in relation to biotic and abiotic factors; to identify native *A. fraterculus*-virulent EPN relating its capture to biotic and abiotic factors in apple orchard; to compare the virulence of native EPN with others from other regions using apple orchard soil as substrate and to test the most virulent ones in apple orchard. All experiments were conducted in Porto Amazonas, Paraná, Brazil or in the Laboratório de Manejo Integrado de Pragas of UFPR. For *A. fraterculus* population fluctuation study, modified McPhail traps were installed inside the orchard and in the adjacent forests in order to capture *A. fraterculus* adults and hymenopteran parasitoids. Floristic analysis was made in each forest and *A. fraterculus* hosts species were quantified. Fruits were also collected from commercial and alternative hosts in the orchards and adjacent forest to assess fly infestation. Regarding the native EPNs in an apple orchard, soil samples were monthly collected with and without fruit above the soil and taken to laboratory, where they were exposed to *A. fraterculus* and *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) last instar larvae for EPN capture. After confirmed their pathogenicity in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) the isolates were stored at 15 °C for further identification and test of virulence to *A. fraterculus*. In an experiment comparing native Porto Amazonas (LAMIP) EPN isolates and others from distinct regions, the substrate used was soil from an apple orchard from the same region of native EPNs. The soil was placed in plastic pots with 12 *A. fraterculus* larvae and the treatments (EPN isolates doses and control). Twenty two days after inoculations adult flies were counted and dead larvae and pupae were observed to verify EPNs presence. In field experiment, in an apple orchard, *Steinernema carpocapsae* CB 02 and *Heterorhabditis amazonensis* CB 24 were tested against *A. fraterculus* larvae. The doses used were 180 infective juveniles (IJ) per larva for each isolate and their mixture in half dose. PVC cylinders were inserted 10 cm underground in a native-EPN free tree row in the apple orchard and each one received 60 *A. fraterculus* late-instar larvae plus the treatment. Adhesive cards were placed inside each cylinder to register adult fly emergency. *A. fraterculus* was the dominant fruit fly species captured in Porto Amazonas, PR. The two apple orchard studied had major fly captures; however, only one of them had more flies captured in orchard than in the adjacent forest. The increase in fly captures showed positive correlations with the parasitoid number, fruit infestation and with the presence of ripe fruits. In relation to native EPN occurrence in apple orchard, 73 EPN isolates were obtained in 23.2% of soil samples. Twenty isolates had its virulence tested against *A. fraterculus* in laboratory and only five differed from the control. All virulent EPNs were identified as *Oscheius* sp. The EPN capture rate didn't vary with the seasons, with fruits above soil, with edaphic and climatic conditions. In a laboratory experiment comparing the virulence of EPNs native from Porto Amazonas (LAMIP) with others from other places, *S. carpocapsae* CB 02 was the most efficient in *A. fraterculus* control. *Heterorhabditis* isolates and LAMIP 09 (*Oscheius* sp.) had intermedium virulence, while LAMIP 92 (*Oscheius* sp.) didn't differ from the control. *S. carpocapsae* CB 02 is

capable to kill 50 and 90% of *A. fraterculus* larvae with 96.3 and 314.7 IJ larva<sup>-1</sup>, respectively, using non sterile soil from the studied orchard. In the field experiment, observed mortality was higher with CB 02 than CB 24, and the latter did not differ from the control. As conclusion, *A. fraterculus* population peaks obey fruit ripening in the orchards studied, with the exception to the peach orchard. The native EPNs occur in low densities and don't have population peaks. The EPN in *A. fraterculus* integrate pest management require other isolates with higher virulence, since the native ones have low density and efficiency. Among the tested isolates, *S. carpocapsae* CB 02 is the best for *A. fraterculus* control in soil from Porto Amazonas, PR. Field experiment should be done to allow its use in each climate and soil conditions.

Key-words: apple, ecology, EPN, peach, persimmon, South-American fruit fly.

## LISTA DE FIGURAS

### 3. CAPÍTULO I. SOUTH-AMERICAN FRUIT FLY POPULATION FLUCTUATION IN RELATION TO BIOTIC AND ABIOTIC FACTORS IN TEMPERATE FRUIT ORCHARDS IN PORTO AMAZONAS, PR, BRAZIL

- FIGURE 1. (a) Seven-days average ( $T_{ave}$ ), absolute minimum ( $T_{min}$ ) and maximum ( $T_{max}$ ) air temperature, (b) cumulated rainfall in Porto Amazonas, PR, and relative air humidity in Lapa, from September, 2012, to July, 2014..... 49
- FIGURE 2. Temporal variation on the number of the fruit fly *A. fraterculus* trapped in McPhail traps, inside the orchard or in the adjacent forest, and number of Diptera pupae recovered per apple fruit in two orchards (a = apple 1 and b = apple 2) in Porto Amazonas, PR, Brazil..... 50
- FIGURE 3. Temporal variation on the number of the fruit fly *A. fraterculus* trapped in McPhail traps inside the orchard of persimmon (a) and peach (b) or in its adjacent forest, number of Diptera pupae recovered per fruit in Porto Amazonas, PR, Brazil. .... 51
- FIGURE 4. (a) Number of *A. fraterculus* captured inside-orchard (IO) and in adjacent forest of four orchards in Porto Amazonas, PR (2012-2014); (b) Biplots for the principal components (PC) 1 versus 2 and 1 versus 3 explaining the variance of the variables number of *A. fraterculus* hosts ( $H_o$ ), parasitoids ( $P_a$ ), *A. fraterculus* ( $A_n$ ), ripe fruit (RF) insecticide sprays ( $S_p$ ), floristic richness ( $R_i$ ), pupa per fruit (PPF), pluvial precipitation (Rain), [average ( $T_{av}$ ), minimum ( $T_{mi}$ ) and maximum ( $T_{ma}$ ) air temperature], and relative humidity (R.U.).....52
- FIGURE 5. Temporal variation in the number of parasitoid insects trapped in McPhail traps in persimmon (a), peach (b) and two apple (c and d) orchards (inside the orchard and in the adjacent forest) of in Porto Amazonas, PR, Brazil. .... 53

### 4. CAPÍTULO II. ISOLATION OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES IN AN APPLE ORCHARD IN SOUTHERN BRAZIL AND ITS VIRULENCE TO *Anastrepha fraterculus* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) LARVAE, UNDER LABORATORY CONDITIONS

- FIGURE 1. Relative frequency of EPNs -positive soil samples when the bait was *T. molitor* or *A. fraterculus* larvae (A), and when samples were collected without or with an apple over the soil (B). In chart C the number of *Anastrepha* sp. pupae obtained from apples collected in the canopies or orchard ground. .... 69
- FIGURE 2. Mean air temperature measured in Lapa- PR (A) and rainfall cumulated in Porto Amazonas- PR (B), 2, 4 and 6 days before soil sampling (sampling day included) from Jul 11, 2013 to Aug 6, 2014, and percentage of samples with entomopathogenic nematode (EPN) captured (right axis) in soil from an apple orchard in in Porto Amazonas, PR.. .... 70

FIGURE 3. Mortality of *A. fraterculus* larvae corrected according to Abbott (1925) following inoculation of different nematode strains isolated from soil in Porto Amazonas, PR, and *S. carpocapsae* CB 02, in three trials performed in Petri dishes (100 IJ larva<sup>-1</sup>) (A, B and C)..... 71

**5. CAPÍTULO III. VIRULENCE OF NEMATODES AGAINST LARVAE OF THE SOUTH-AMERICAN FRUIT FLY IN LABORATORY USING SOIL FROM PORTO AMAZONAS, PARANÁ, BRAZIL, AS SUBSTRATE**

FIGURE 1. (A) Percentage of *A. fraterculus* deaths occurred at larval or pupal phase following infection by entomopathogenic nematode isolates. (B) Mortality caused by entomopathogenic nematodes isolates (100 IJ larva<sup>-1</sup>) on *A. fraterculus* corrected according to Abbott (1925)..... 83

FIGURE 2. Probit regression (dark line) for observed mortality [corrected according Abbott (1925)] of the fruit fly *A. fraterculus* following increasing doses of *S. carpocapsae* CB 02, in a loam soil of an apple orchard of Porto Amazonas (PR, Brazil) as substrate, at laboratory condition..... 84

**6. CAPÍTULO IV. EFICIÊNCIA A CAMPO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS CONTRA A MOSCA-DA-FRUTA-SULAMERICANA EM POMAR DE MACIEIRA**

FIGURA 1. (a) Média das temperaturas do ar [médias diárias (Tmed), máxima (Tmax) e mínima (Tmin) absolutas diárias] para o município da Lapa, Paraná, Brasil. (b) Medias diárias de umidade relativa do ar (UR) para o município da Lapa, PR e precipitação pluvial acumulada diária em Porto Amazonas, PR, Brasil. .... 97

FIGURA 2. (a) Disposição dos cilindros de PVC em um dos lados da linha do experimento em pomar de macieira em Porto Amazonas, PR, Brasil. (b) Cartões adesivos amarelos dispostos dentro dos cilindros para captura de adultos de *A. fraterculus*. .... 98

FIGURA 3. Mortalidade observada de *A. fraterculus* de acordo com o tratamento testado em um pomar de macieira em Porto Amazonas, PR, Brasil..... 99

## LISTA DE TABELAS

### **3. CAPÍTULO I. SOUTH-AMERICAN FRUIT FLY POPULATION FLUCTUATION IN RELATION TO BIOTIC AND ABIOTIC FACTORS IN TEMPERATE FRUIT ORCHARDS IN PORTO AMAZONAS, PR, BRAZIL**

TABLE 1. Plant species identified as fruit fly hosts (Zucchi, 2000a) in the adjacent forest from four orchards in Porto Amazonas, Paraná, Brazil (Pr = Peach, Di = Persimmon, A1 = Apple1 and A2 = Apple 2 orchards). ..... 47

TABLE 2. Plant species, not *Anastrepha* spp. hosts, identified in the adjacent forest from four orchards in Porto Amazonas, Paraná, Brazil (Pr = Peach, Di = Persimmon, A1 = Apple1 and A2 = Apple 2 orchards)..... 48

### **4. CAPÍTULO II. ISOLATION OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES IN AN APPLE ORCHARD IN SOUTHERN BRAZIL AND ITS VIRULENCE TO *Anastrepha fraterculus* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) LARVAE, UNDER LABORATORY CONDITIONS**

TABLE 1. Scores of identity (%) and e-values (e) output in the comparisons of DNA sequences of eight accessions available at NCBI nucleotide data bank (NCBI, 2015) with sequences found in five nematode isolates from Porto Amazonas, PR. .... 68

### **5. CAPÍTULO III. VIRULENCE OF NEMATODES AGAINST LARVAE OF THE SOUTH-AMERICAN FRUIT FLY IN LABORATORY USING SOIL FROM PORTO AMAZONAS, PARANÁ, BRAZIL, AS SUBSTRATE**

TABLE 1. Species, source and origin of the entomopathogenic nematode isolates used in the experiment against *A. fraterculus* larvae. .... 82

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
2.1. Importância de fruteiras de clima temperado (macieira, pessegueiro e caqui) .....	18
2.2. Importância e aspectos da biologia das moscas-da-fruta-sulamericana .....	19
2.3. Fruteiras de clima temperado e relação com a mosca-da-fruta-sulamericana .....	20
2.4. Hospedeiros não comerciais .....	22
2.5. Fatores abióticos e a relação com as moscas-da-fruta-sulamericana .....	23
2.6. Flutuação populacional da mosca-das-frutas-sulamericana e relação com fatores bióticos e abióticos .....	23
2.7. Controle .....	25
2.8. Formas alternativas de controle de <i>A. fraterculus</i> .....	26
2.9. Mosca-das-frutas, parasitoides e hospedeiros alternativos .....	27
2.10. Nematoides entomopatogênicos, fatores bióticos, abióticos e flutuação populacional .....	28
2.11. Controle biológico de moscas-das-frutas com NEPS .....	32
<b>3. CAPÍTULO I. SOUTH-AMERICAN FRUIT FLY POPULATION FLUCTUATION IN RELATION TO BIOTIC AND ABIOTIC FACTORS IN TEMPERATE FRUIT ORCHARDS IN PORTO AMAZONAS, PR, BRAZIL.....</b>	<b>34</b>
3.1. Abstract.....	34
3.2. Resumo .....	34
3.3. Introduction .....	35
3.4. Material and methods .....	37
3.5. Results and discussion .....	39
3.6. Conclusion .....	43
3.7. Acknowledgements .....	44
3.8. References .....	44
<b>4. CAPÍTULO II. ISOLATION OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES IN AN APPLE ORCHARD IN SOUTHERN BRAZIL AND ITS VIRULENCE TO <i>Anastrepha fraterculus</i> (DIPTERA: TEPHRITIDAE) LARVAE, UNDER LABORATORY CONDITIONS .....</b>	<b>54</b>
4.1. Abstract.....	54
4.2. Resumo .....	54
4.3. Introduction .....	55
4.4. Material and Methods.....	56
4.4.1. Orchard soil samples and EPN capture .....	56
4.4.2. Monitoring environmental condition and <i>Anastrepha sp.</i> population.....	57
4.4.3. Virulence to <i>A. fraterculus</i> .....	58
4.4.4. Isolates identification .....	58
4.5. Results .....	59
4.5.1. EPN capture .....	59
4.5.2. Isolates identification and virulence against <i>A. fraterculus</i> .....	60
4.6. Discussion.....	60
4.7. Acknowledgements .....	63

4.8. References .....	63
<b>5. CAPÍTULO III. VIRULENCE OF NEMATODES AGAINST LARVAE OF THE SOUTH-AMERICAN FRUIT FLY IN LABORATORY USING SOIL FROM PORTO AMAZONAS, PARANÁ, BRAZIL, AS SUBSTRATE.....</b>	<b>72</b>
5.1. Abstract.....	72
5.2. Resumo .....	72
5.3. Introduction .....	73
5.4. Material and methods .....	74
5.5. Results and discussion.....	76
5.5.1. <i>Nematodes virulence against A. fraterculus</i> .....	76
5.5.2. <i>Lethal doses of CB 02</i> .....	78
5.6. Conclusion.....	78
5.7. References.....	79
<b>6. CAPÍTULO IV. EFICIÊNCIA A CAMPO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS CONTRA A MOSCA-DA-FRUTA-SULAMERICANA EM POMAR DE MACIEIRA .....</b>	<b>85</b>
6.1. Resumo .....	85
6.2. Abstract.....	85
6.3. Introdução.....	86
6.4. Material e Métodos.....	87
6.5. Resultados e discussão.....	89
6.6. Agradecimentos .....	93
6.7. Referências Bibliográficas.....	93
<b>7. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>100</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>101</b>
<b>ATTACHMENT I .....</b>	<b>110</b>
<b>ATTACHMENT II .....</b>	<b>111</b>
<b>ATTACHMENT III.....</b>	<b>112</b>
<b>ATTACHMENT IV.....</b>	<b>113</b>



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo. As fruteiras de clima temperado são cultivadas em regiões de clima ameno, principalmente nos três Estados do Sul do país (PETRI; LEITE, 2011). Dentre as fruteiras de clima temperado, destacam-se a macieira, a videira, as fruteiras de caroço (pessegueiro, nectarineira e ameixeira) e o caquizeiro. O Estado do Paraná é o terceiro maior produtor de maçãs do país e vem expandindo a área e produção para essas fruteiras. Os municípios de Porto Amazonas e Lapa merecem destaque na produção de maçãs, em que juntos alcançaram 35,5% do total produzido no Estado em 2013 (IBGE, 2015). Apesar das crescentes melhorias, pouco do que se produz no Estado é exportado, em parte devido aos entraves burocráticos, mas também por perdas durante a pós-colheita, ataques de pragas, doenças e barreiras fitossanitárias (SOUZA FILHO, 2006).

As pragas que mais restringem as exportações do setor são as moscas-das-frutas, denominação dada às espécies cujos imaturos se desenvolvem na polpa de frutos. Além de serem pragas quarentenárias, elas são consideradas pragas primárias de frutíferas em todo o mundo (MALAVASI et al., 2000; ALVARENGA et al., 2006). Por se alimentarem da polpa da fruta, seus imaturos são os que causam maiores prejuízos quantitativos e qualitativos aos produtores. O gênero *Anastrepha* é de alta relevância dentre os tefritídeos, principalmente pela sua ampla gama de espécies descritas na América Latina (URAMOTO et al., 2004; URAMOTO, 2007). No Brasil, *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae) é considerada a de maior importância econômica (TAUFER et al., 2000; ZUCCHI, 2000; SILVA, 2005). Isso se dá pela sua ampla distribuição no território nacional, onde se alimenta de elevado número de hospedeiros (MALAVASI et al., 2000). Por ser nativa, *A. fraterculus* tem preferência por hospedeiros silvestres, porém, se adaptou bem a diversas frutíferas comerciais exóticas tais como a macieira, o pessegueiro e o caquizeiro (MALAVASI et al., 2000).

O uso de agrotóxicos vem aumentando nos pomares do Brasil (FERREIRA et al., 2012), o que pode causar sérios problemas ambientais e a saúde humana (ZAMBOLIN, 2000). O manejo integrado de pragas (MIP) sugere o uso de mais de uma forma de combate a pragas, fazendo com que o controle seja mais racional. O monitoramento das moscas-das-frutas é realizado por meio de armadilhas caça-moscas, instaladas em locais estratégicos dos

pomares (bordaduras), e visa determinar uma ação de controle, muitas vezes com iscas tóxicas, na época da entrada das moscas no pomar. Para melhorias na implantação do MIP, a caracterização da flutuação populacional de moscas-das-frutas vem sendo realizada a fim de se conhecer os fatores bióticos e abióticos que podem estar influenciando na população de um pomar. Definem-se, assim, melhores estratégias de controle, que permitam reduzir o controle químico (KOVALESKI et al., 2000).

O controle biológico aplicado de moscas-das-frutas vem apresentando resultados positivos em diversas partes do mundo. Esse controle é utilizado com sucesso em adição ao uso de agrotóxicos seletivos em pomares que possuem selos de produção integrada (MONTEIRO; HICKEL, 2004). Para a implementação de um programa de controle biológico, há a necessidade de desenvolvimento de estudos detalhados do ambiente, das práticas culturais da região aliadas à flutuação populacional da praga e dos seus inimigos naturais (AGUIAR-MENEZES; MENEZES, 1997). Isso ainda não foi realizado em profundidade no Estado do Paraná (MALAVASI et al., 2000; MONTEIRO; HICKEL, 2004). Assim, são necessárias pesquisas envolvendo o tema.

Já existem resultados promissores com liberações de parasitoides himenópteros da família Braconidae em diversas partes do mundo, incluído o Brasil. Um dos exemplos é *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead, 1905) que parece se adaptar bem a imaturos de diversos tefritídeos tais como espécies do gênero *Anastrepha* e *Ceratitis capitata* (Wied.) (CARVALHO, 2005). Porém, os baixos níveis populacionais de moscas-das-frutas exigidos em programas de MIP fazem, muitas vezes, com que a quantidade de parasitoides promotores do controle biológico da moscas-das-frutas seja baixa, o que os torna insuficientes como única forma de controle em um pomar (GUIMARÃES et al., 2000).

Outra forma de controle biológico é o uso de nematoides entomopatogênicos (NEPs) para pragas que possuam alguma de suas fases de vida no solo. Os dois gêneros mais conhecidos como NEPs são *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) e *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae), os quais possuem relação simbiótica com bactérias entomopatogênicas, carregando-as internamente em seu corpo e transferindo-as para o hospedeiro, o qual se torna o agente de morte (VOSS et al., 2009). Recentemente, nematoides facultativos do gênero *Oscheius* (Rhabditida: Rhabditidae) também vem sendo apontados como agentes de biocontrole (TORRES-BARRAGAN et al., 2011). Esses nematoides carregam bactérias na superfície do seu corpo, também sendo inoculadas no hospedeiro e levando-o à morte. Já existem estudos que comprovam a eficiência de estirpes de NEPs em alguns tipos de moscas-das-frutas, no Brasil (RODRIGUES-TRENTINI, 1996; BARBOSA-

NEGRISOLI, 2009). Porém, a relação entre moscas-das-frutas e NEPs nativos foram pouco estudadas (BARBOSA-NEGRISOLI et al., 2009), não havendo relatos de flutuação populacional do entomopatógeno nativo em áreas de pomar de fruteiras de clima temperado no Brasil. Além disso, poucos estudos de patogenicidade utilizaram o solo não estéril do próprio pomar como substrato, podendo os resultados obtidos em substratos diferentes serem menos próximos das condições de campo (KAYA, 1990).

Os objetivos desse trabalho, referentes às fruteiras de clima temperado em Porto Amazonas, Paraná, Brasil, foram (a) caracterizar a flutuação populacional de *A. fraterculus* em áreas de mata adjacente e de pomares, relacionando fatores bióticos e abióticos (capítulo I); (b) identificar isolados de NEPs virulentos à *A. fraterculus* (capítulo II); (c) caracterizar a flutuação populacional de NEPs nativos e relacionar com a população de *A. fraterculus* e outros fatores abióticos em pomar de macieira (capítulo II); (d) comparar a virulência de isolados nativos com isolados de outras regiões no controle de *A. fraterculus* utilizando solo não estéril de pomar de macieira dos NEPs nativos (capítulo III); (e) observar a eficiência de controle dos isolados mais virulentos no controle de *A. fraterculus* no campo (capítulo IV).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Importância de fruteiras de clima temperado (macieira, pessegueiro e caquizeiro)

A pomicultura iniciou-se nos Estados sul-brasileiros no começo do século passado. Em 1913 já havia um relatório do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento que indicava alguns municípios frios do Estado de Santa Catarina, tais como São Joaquim, Curitibanos, Campos Novos, e alguns do Paraná, como promissores no cultivo de fruteiras de clima temperado (BLEICHER, 2002). A partir dos anos 40, houve incentivos à pesquisa visando ao melhoramento genético dessas fruteiras para a adaptação na região.

Os resultados desses estudos passaram a fazer efeito, sendo que para a maçã (*Malus domestica* Borkh), a partir de 1988, o Brasil passou de importador para exportador da fruta (PETRI; LEITE, 2011). A maçã é uma das frutas mais consumidas no mundo e no Brasil (PETRI; LEITE, 2011). A produção de maçãs se concentra em Santa Catarina e Rio Grande do Sul (95% da produção brasileira em 2012), seguido pelo Paraná (IBGE, 2015). O grupo das cultivares e clones de Gala e Fuji é o mais plantado e consumido; contudo, a tendência é que no futuro haja maior diversidade varietal (PETRI; LEITE, 2011). A cultivar Eva, de ciclo precoce, desenvolvida pelo Instituto Agrônômico do Paraná, vem ganhando destaque nessa diversificação, por ser menos exigente em frio e se adaptar a regiões mais quentes. ‘Eva’ é colhida antes da ‘Gala’, alcançando bons preços por ser a primeira a ser disponibilizada para o consumidor (IAPAR, 2014).

Hoje, o Estado do Paraná possui o quarto polo de produção de maçãs do Brasil, situado em Palmas, e outras localidades também merecem destaque, tais como os municípios de Lapa e de Porto Amazonas. Atualmente a área plantada de maçã no Paraná é de 1.739 ha e a produção total da fruta chegou a 49.188 t (3,99% da produção brasileira). Porto Amazonas representou 14,75% da produção paranaense no ano de 2013 (IBGE, 2015).

A produção de pêssigo (*Prunus persica* Batsch) no Estado do Paraná iniciou na década de 60; porém, com importância econômica a partir dos anos 70, com implantação de uma indústria no município de Lapa (CITADIN, 2014). A produção comercial de pêssigos até a década de 80 ficou restrita à região metropolitana de Curitiba; todavia, com avanços do melhoramento genético, foi possível a extensão do cultivo para as regiões Sudeste e Norte do Estado (CITADIN, 2014). A produção de pêssigos encontra-se bastante espalhada em todos

os municípios do Paraná; contudo, com maior intensidade na região metropolitana de Curitiba. No ano de 2013, a produção da fruta chegou a 217.706 t no Estado, em uma área destinada à colheita de 18.092 ha. Porto Amazonas produz apenas 2,2% do total colhido e junto com o município vizinho Lapa essa porcentagem sobe para 11,6% (IBGE, 2015).

O caquizeiro foi introduzido no Brasil no final do século 19, ganhando força para produção comercial a partir de 1920, com o aumento da migração japonesa para Estados do Sudeste (SATO; ASSUMPÇÃO, 2002). A principal cultivar plantada hoje é a ‘Fuyu’, cujo fruto tem polpa clara e não necessita de tratamento para a retirada da adstringência (GOMES, 1980). O caquizeiro ‘Fuyu’ consegue desenvolver frutos através da partenocarpia e é bastante apreciado no exterior, havendo a exportação do fruto para a Europa (SATO; ASSUMPÇÃO, 2002). Atualmente, as regiões Sul e Sudeste são as maiores produtoras, com destaque para o Estado de São Paulo, com 48,3% do total produzido em 2013, seguido pelo Rio Grande do Sul (18,9%) e pelo Paraná (6,7%) (IBGE, 2015). A produção do Paraná em 2013 foi de 12.766 t, sendo Porto Amazonas responsável por 2,9% dessa produção (IBGE, 2015).

## 2.2 Importância e aspectos da biologia das moscas-da-fruta-sulamericana

As moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) possuem uma ampla distribuição geográfica, porém, restringem-se a regiões tropicais e subtropicais das Américas. *Anastrepha* spp. podem ser encontradas desde o sul dos Estados Unidos da América até o norte da Argentina, e ocorrem também em algumas ilhas do Caribe (SALLES, 2000). Apesar de existirem diversas espécies descritas desse gênero (mais de 184) pouco se conhece dos seus hospedeiros. Sete espécies possuem maior importância econômica em fruteiras e cinco são encontradas no Brasil: *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann), predominante na região Sul, *Anastrepha grandis* (Macquart), *Anastrepha obliqua* (Macquart), *Anastrepha serpentina* (Wiedemann) e *Anastrepha striata* Schiner. A mosca-das-frutas-sulamericana, como é conhecida *A. fraterculus*, já foi encontrada em 67 hospedeiros entre o México e a Argentina e vem se adaptando bem a frutas exóticas (café, laranja, manga, nêspera) e também às frutas de clima temperado, incluindo maçã, pêssego e caqui (ZUCCHI, 2000).

*A. fraterculus* é polífaga, multivoltina (apresentando mais do que um ciclo em um ano) e não apresenta diapausa aparente. A espécie é considerada praga de alto potencial biótico

por: reproduzir-se com rapidez, adaptar-se bem a distintos hospedeiros, ter fêmeas com alto potencial reprodutivo e longevidade, colonizadoras e capazes de deixar o maior número possível de descendentes (NAVA et al., 2014).

O ciclo de vida da mosca-das-frutas é holometabólico (metamorfose completa) e seu desenvolvimento está relacionado com o clima e com o hospedeiro (NAVA et al., 2014). As fêmeas ovipositam nos frutos, inserindo um a dois ovos por punctura em postura endofítica (SALLES, 2000). O período de pré-oviposição ainda é desconhecido na natureza, mas pode variar de sete a 30 dias em condições laboratoriais. Durante esse período há a necessidade de ingestão de alimento proteico, que na natureza pode ser adquirido através de pólen e de fezes de pássaros (SUGAYAMA et al., 1997; NAVA et al., 2014). Após o acasalamento, a quantidade de ovos postos por fêmea também pode variar. Em condições ótimas de temperatura (25 °C) e umidade (80 ± 10%) cada fêmea pode produzir em torno de 278 a 437 ovos (NAVA et al., 2014). A viabilidade desses ovos possui correlação negativa com a idade da fêmea, ou seja, aos dez dias de oviposição, a fêmea pode colocar 20 ovos por dia, 70% deles viáveis. Após 50 dias de oviposição, ela coloca apenas cinco ovos por dia e a viabilidade cai para 20% (SALLES, 1993a). A longevidade na natureza também não é perfeitamente determinada; contudo, em condições de laboratório pode variar de 161 dias a até 196 dias. O período embrionário (período de incubação dos ovos) é bastante curto, em torno de 72 h a 25 °C, e pode dobrar sob condições adversas (SALLES, 2000). A fase imatura é uma das mais influenciadas pela temperatura e pelo hospedeiro. Porém, em condições térmicas ótimas e em dieta artificial, essa fase é de 15 dias (SALLES, 1993a). As larvas possuem três instares, sendo os dois primeiros dentro do hospedeiro. Na natureza, ao final do terceiro instar, elas abandonam o fruto e migram para o solo (2-3 cm de profundidade), onde passam à fase de pré-pupa e logo em seguida à de pupa (NAVA et al., 2014). No solo, permanecem até a emergência do adulto. Em laboratório, o período pupal durou em torno de 15 dias a 25 °C (SALLES, 1993a). Após, inicia-se um novo ciclo com a emergência de uma nova geração de adultos.

### **2.3. Fruteiras de clima temperado e relação com a mosca-da-fruta-sulamericana**

*A. fraterculus* se adaptou a grande parte das fruteiras de clima temperado introduzidas nas regiões subtropicais do país. Dentre as espécies frutíferas de maior relevância econômica

que são acometidas pela praga destacam-se a macieira, o pessegueiro e o caquizeiro. O clima ameno da região Sul brasileira a faz propícia à produção dessas fruteiras, favorecendo também o desenvolvimento de moscas do gênero *Anastrepha* durante a maturação (ZUCCHI, 2000). Salles e Kovaleski (1990) estimaram em 95% a frequência de *A. fraterculus* dentre as espécies do gênero capturadas em pomares comerciais do Rio Grande do Sul. Os danos diretos das moscas-das-frutas ocorrem pelo consumo da polpa dos frutos pelas larvas, gerando a queda precoce e posterior apodrecimento. As fêmeas, pela perfuração da epiderme para a oviposição, causam manchas nos frutos depreciando seu aspecto visual, além de propiciarem a entrada de fitopatógenos oportunistas, como o fungo agente causal da podridão-parda do pessegueiro (NAVA et al., 2014).

Raga e Sousa Filho (2000) comentaram que a injúria no caqui é observada no início da maturação dos frutos com o surgimento de pontos amolecidos, os quais avançam na sua totalidade levando facilmente à podridão ou à queda.

Na maçã, a principal injúria ocorre em frutos verdes, com tamanho em torno de dois centímetros de diâmetro. As fêmeas, ao inserirem o ovipositor, causam deformação nos frutos prejudicando seu aspecto visual. Somente 1% das larvas consegue completar seu ciclo nesses frutos, considerados impróprios (SUGAYAMA et al., 1997; KOVALESKI, 2004). Já os frutos maduros de ‘Gala’, ‘Fuji’ e de ‘Golden Delicious’ são considerados próprios para o desenvolvimento dos imaturos de *A. fraterculus*. Em termos comportamentais da fêmea, não houve diferenças significativas de preferência de oviposição, quando comparados com frutos de goiabeira. Porém, dentre os frutos maduros de macieira, *A. fraterculus* parece preferir os de calibre intermediário (SUGAYAMA et al., 1998). O fruto do pessegueiro já pode ser injuriado pela oviposição das fêmeas a partir do inchamento dos frutos, época de raleio; porém, ainda não se tem dados concretos referentes à sobrevivência dos imaturos durante essa fase (NAVA; BOTTON, 2010). Salles (1999) comentou que a infestação de moscas-das-frutas em frutos de pessegueiro inicia-se apenas 25-30 dias antes do início da colheita. A punctura das fêmeas pode causar danos mecânicos no fruto, além de abrir porta de entrada para doenças. Muitas vezes, devido à textura da casca, apenas se observa o ataque da mosca pressionando o fruto entre os dedos, constatando-se a perda da consistência pela abertura das galerias (NAVA et al., 2014). Tanto em pomares orgânicos de pessegueiro quanto nos de macieira sem tratamentos fitossanitários, as perdas de produção podem ser totais (RUPP et al., 2006; BRANCO et al., 2000).

Apesar do desenvolvimento de *A. fraterculus* e de seus danos em fruteiras de clima temperado, a espécie não se estabelece nos pomares. Ela utiliza hospedeiros não comerciais

nas matas adjacentes e corredores biológicos como repositórios de multiplicação durante as entre-safras e durante o inverno (SUGAYAMA et al., 1997; BRANCO et al., 2000; KOVALESKI et al., 2000).

#### 2.4. Hospedeiros não comerciais

Apesar dos avanços no conhecimento de danos, na biologia e comportamento das moscas-das-frutas em hospedeiros comerciais, pouco se sabe sobre hospedeiros naturais de muitas espécies de tefritídeos (URAMOTO, 2007). Sabe-se que a mosca-das-frutas possui muitos hospedeiros naturais; contudo, já foram observadas relações restringindo-se a apenas um único hospedeiro. Há diversas famílias de plantas que hospedam apenas *Anastrepha* spp. (ZUCCHI, 2000): Anacardiaceae, Annonaceae, Combretaceae, Ebenaceae, Fabaceae, Hippocrateaceae, Malpighiaceae, Mimosaceae, Moraceae, Oxadilaceae, Passifloraceae, Rubiaceae, Sapindaceae, Sapotaceae, Rosaceae, Rutaceae e Myrtaceae, sendo as três últimas as que apresentam maior abundância em espécies (NAVA; BOTTON, 2010). As *Anastrepha* spp. possuem mais de 143 gêneros de hospedeiros registrados, no entanto, esse número decresce bastante com a retirada de fruteiras comerciais (URAMOTO, 2007). Uramoto et al. (2004) observaram a preferência de *Anastrepha* sp. por Rosaceae.

A feijoa [*Acca sellowiana* (O.Berg.)] e outras fruteiras da família Myrtaceae são consideradas hospedeiros primários ou multiplicadores da mosca-das-frutas-sulamericana. Kovaleski et al. (2000) relataram que *A. fraterculus* é capaz de prolongar seu ciclo (fase imatura) no interior dos frutos da feijoa durante os meses frios, em Vacaria-RS, de forma que emerjam os adultos após a estação do inverno.

A manutenção de hospedeiros alternativos nativos (plantas multiplicadoras), contrariamente ao recomendado por Alvarenga et al. (2006), poderia atrair *A. fraterculus* reduzindo seus danos nos pomares comerciais (AGUIAR-MENEZES; MENEZES, 1997). Os hospedeiros não comerciais existentes em matas adjacentes e corredores biológicos dos pomares são considerados fatores bióticos importantes e possuem impactos em aspectos biológicos de *A. fraterculus* (SALLES, 2000). A pitangueira e o araçazeiro poderiam ter ciclos semelhantes aos pessegueiros precoces e tardios em regiões de clima subtropical (NAVA et al., 2014).



## **2.5. Fatores abióticos e a relação com as moscas-da-fruta-sulamericana**

Aspectos climáticos, em especial a temperatura, possuem alta relevância em qualquer fase do ciclo de vida das moscas-da-fruta-sulamericana (SALLES, 2000). A fase de ovo é capaz de suportar as temperaturas mais frias, entre seis e nove graus Celsius. Para todas as outras fases do ciclo de vida, a faixa térmica ideal para o desenvolvimento da espécie se encontra entre 15 e 27 °C (MACHADO et al., 1995). Porém, para o desenvolvimento pupal se encontra em faixa mais restrita, entre 20 e 25 °C. O comportamento do adulto também é influenciado pela temperatura e as fêmeas somente iniciam oviposição entre as temperaturas de 20 e 30 °C. Sugayama et al (1997) observaram que em pomares de macieira do sul do Brasil, as fêmeas, no início da manhã, migram das matas adjacentes para o pomar, contudo, só iniciam a oviposição após a temperatura atingir seu ótimo térmico.

A umidade atmosférica parece ter efeito apenas no adulto, o qual possui vida livre. A umidade relativa do ar ótima para o adulto situa-se entre 70 e 80% (NAVA et al., 2014). Já a pupa, por possuir um tegumento mais rígido e firme não foi influenciada pela umidade do solo e sim, pela temperatura do mesmo (SALLES et al., 1995). Da mesma forma, *A. fraterculus* não se mostrou sensível ao fotoperíodo, tanto na fase adulta quanto nos estádios imaturos. Acreditava-se que os adultos gastavam mais energia em dias-luz maiores, fazendo com que morressem antes; porém, a longevidade mostrou-se semelhante para todos os fotoperíodos estudados (SALLES, 1993b).

## **2.6. Flutuação populacional da mosca-das-frutas-sulamericana e relação com fatores bióticos e abióticos**

A flutuação de determinada população de moscas-das-frutas ao longo do tempo é influenciada por fatores bióticos e abióticos, os quais são componentes fundamentais da dinâmica populacional (ODUN, 2004). Dentre os fatores bióticos de maior importância destacam-se tanto a disponibilidade de hospedeiros e a maturação dos frutos quanto a densidade populacional (MALAVASI et al., 2000). Os períodos de maior infestação são aqueles em que a quantidade de alimento e substrato para a oviposição se encontram em

abundância. Para a avaliação da dinâmica populacional da moscas-das-frutas-sulamericana, a sua flutuação populacional deve ser estudada (SÁ, 2006). Além disso, os principais fatores envolvidos e suas interações no ambiente devem ser observados e avaliados (ODUM, 2004). Papadopoulus et al., (2001) relataram que os principais fatores abióticos que influenciam na densidade das populações em áreas de clima subtropical são temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade. Ressalta-se que o pico populacional da mosca-das-frutas-sulamericana no sul do Brasil, ocorre entre os meses de novembro e dezembro, com variações dependentes da presença de hospedeiros que possibilitem a multiplicação da praga e das condições climáticas (SALLES, 2001; NEVES; LOPES, 2005). Fatores bióticos como a densidade de inimigos naturais (predadores, parasitoides e entomopatógenos) também podem influenciar nos níveis populacionais da família Tephritidae (SÁ, 2006).

Em pomares de citros no oeste de Santa Catarina, Chiaradia et al. (2004), observaram maiores infestações de moscas do gênero *Anastrepha* nos meses de março a agosto. Segundo Nascimento e Carvalho (2000), o pico populacional de moscas-das-frutas atinge o ápice coincidentemente com a época de maturação das frutas em pomares comerciais, quando inicia a queda populacional pela falta de hospedeiros. Em pomar de pessegueiro em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, o pico populacional de *A. fraterculus* foi na época de maturação dos frutos, logo após a colheita (JAHNKE et al., 2014).

Kovaleski et al. (1999) constataram que *A. fraterculus* não está estabelecida nos pomares de maçã e que migra das matas adjacentes todo o ano com o surgimento dos frutos maduros na área comercial. Os picos populacionais de moscas-das-frutas tanto em pomares de pessegueiro quanto de macieira no Rio Grande do Sul iniciaram-se com o amadurecimento dos frutos. Porém, no de macieira, as primeiras capturas da mosca ocorreram em sua mata adjacente (SALLES, 1997). Todavia, há outros fatores que podem interferir na flutuação populacional de *A. fraterculus* em pomares, além da presença de frutos maduros no pomar e hospedeiros alternativos nas matas adjacentes (KOVALESKI et al., 2000). Em estudo de influência de hospedeiros na mata em áreas de bordadura de pomares de macieira, Teixeira et al. (2015), observaram que houve maiores picos populacionais em áreas de pomar sem a presença dos hospedeiros considerados multiplicadores.

Condições ambientais têm efeitos variados na população da mosca, dependendo do local de estudo. Apesar de a temperatura ter efeitos marcantes na biologia de *A. fraterculus* em laboratório (SALLES et al., 1995; SALLES, 2000), muitos estudos não encontraram correlações positivas entre o aumento de temperatura e a população de moscas. No pessegueiro, Fehn (1982) apresentou resultados inconclusivos quanto à correlação entre

*Anastrepha* sp. e a temperatura do ar, devido à grande variação de um pomar para o outro. O mesmo ocorreu com o acúmulo de chuva. Chiaradia et al (2004) observaram correlações significativas apenas entre *A. fraterculus* e temperaturas máximas e mínimas em pomar cítrico. Já Garcia et al. (2003) não obtiveram correlação com fatores climáticos em pomar de pessegueiro; porém, para pomares de citros as correlações com temperatura do ar (máxima, média e mínima), apesar de variáveis para cada um dos pomares, foram significativas. Garcia e Corseul (1998) constataram que apenas a temperatura mínima teve influência significativa na população de *A. fraterculus* em pomar de pessegueiro no Rio Grande do Sul.

A aplicação de inseticidas geralmente apresenta correlações negativas com a população de moscas em pomares (FEHN, 1982), porém, isso pode variar de acordo com o ingrediente ativo aplicado, formas e épocas de aplicação (SUGAYAMA et al., 1997; KOVALESKI et al., 2000).

## 2.7. Controle

O controle químico ainda é a principal forma de controle da mosca-das-frutas. Inseticidas dos grupos dos piretróides, dos organofosforados e dos neonicotinóides foram os mais utilizados para a diminuição da densidade populacional da praga; porém, o amplo espectro, aliado a problemas de resíduos em alimentos e à poluição, faz com que cada vez mais ingredientes ativos sejam proibidos (MAPA, 2011). Atualmente, os produtores contam com poucas opções de ingredientes ativos. A constante repetição dos produtos pode aumentar a pressão de seleção para populações de insetos resistentes (MONTEIRO; HICKEL, 2004). Botton et al. (2012) relataram o uso de organofosforados até mesmo com aplicações em calendários para o controle principalmente de adultos da mosca.

Atualmente, o controle químico é empregado na maioria dos pomares com base em monitoramento da mosca. Armadilhas caça-moscas contendo atrativo alimentar são dispostas principalmente nas entradas dos pomares para a verificação do início das infestações. O monitoramento para fruteiras de caroço pode ser realizado de acordo com metodologia relatada por Monteiro e Hickel (2004).

Apesar de normalmente ocorrerem aplicações de agrotóxicos em cobertura total, as aspersões de iscas tóxicas nas bordaduras dos pomares vêm ganhando espaço. Elas passaram a ser empregadas em programas de MIP visando a minimização dos riscos e de resíduos de

organofosforados em frutas como maçã e pêsego (MONTEIRO; HICKEL, 2004; BOTTON et al., 2012).

## 2.8. Formas alternativas de controle de *A. fraterculus*

No passado, acreditava-se que a eliminação dos hospedeiros alternativos de moscas-das-frutas ao redor do pomar contribuiria para o seu controle (ALVARENGA et al., 2006). A diminuição da biodiversidade do entorno fez o problema se agravar em muitas regiões (SALLES, 1997). Dessa forma, práticas de controle alternativas ao químico vêm ganhando força, dentre elas, o uso da técnica do macho estéril, a captura massal e principalmente o controle biológico (MONTEIRO; HICKEL, 2004).

O aumento da biodiversidade das áreas gera maior presença de inimigos naturais de tefritídeos e pode, a longo prazo, reestabelecer o equilíbrio do agroecossistema (ALTIERI; NICHOLLS, 2003). Os parasitoides da família Braconidae são os mais eficientes no controle biológico natural da mosca-das-frutas (WHARTON, 1993). Vários levantamentos de parasitoides nativos já foram realizados no nosso país, observando-se que a presença desses inimigos naturais tem relação com a flutuação populacional da mosca-das-frutas, com o clima, além da maturação dos frutos. Todos esses fatores influem no índice de parasitismo ao longo do ano e, conseqüentemente, também influenciam no controle biológico (CANAL; ZUCCHI, 2000). Já foram encontrados parasitando larvas de *A. fraterculus* em São Paulo os parasitoides: *Doryctobracon aureolatus* (Szépligeti), *Doryctobracon brasiliensis* (Szépligeti), *Doryctobracon fluminensis* (Szépligeti), *Opius bellus* (Gahan) e *Utetes anastrephae* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae) (LEONEL JR. et al., 1995). O parasitoide *D. aureolatus* é um dos mais representativos em levantamentos realizados no Brasil. Essa espécie nativa é considerada de grande potencial para ser inserida em programa de controle biológico, porém, a falta de pesquisas e dificuldades de criação massal são os principais limitantes (CARVALHO; NASCIMENTO, 2002; ALVARENGA et al. 2006). Espécies de parasitoides das famílias Figitidae, Diapriidae, Pteromalidae e Eulophidae também apresentam importância como inimigos naturais de moscas-das-frutas (OVRUSKI et al., 2000). Guimarães et al. (2000) comentaram que apesar da eficiência da diminuição da densidade populacional da mosca-das-frutas por seus parasitoides, níveis baixos de dano econômico de *A. fraterculus* em pomares comerciais fazem com que o controle biológico não consiga ser a

única forma de controle para redução populacional dessa praga. Porém, os parasitoides são considerados fatores bióticos que influenciam em seus níveis populacionais.

## **2.9. Mosca-das-frutas, parasitoides e hospedeiros alternativos**

Para o aumento e permanência dos parasitoides de moscas-das-frutas em pomares comerciais, Sivinski et al. (2001) e Aguiar-Menezes e Menezes (1997) incentivaram não apenas a manutenção de árvores frutíferas nativas da vizinhança, mas inclusive a introdução de seus hospedeiros alternativos. Isso porque na maioria das plantas da família Myrtaceae ocorrem altos índices de parasitismo, incrementando o controle biológico da praga. Aguiar-Menezes e Menezes (2002) realizaram experimento de tempo de exposição de larvas em frutos de goiaba e de seriguela ao parasitismo. Os resultados apontaram que os frutos caídos ao chão não devem ser recolhidos e destruídos, visto que algumas espécies de parasitoides têm preferência em parasitar larvas de mosca nessas condições. Sarmiento et al. (2012) também encontraram índices de parasitismo superiores em frutos retirados do solo, quando comparados aos colhidos da copa.

Aguiar-Menezes e Menezes (1997) comentaram que frutíferas nativas não são apenas hospedeiros alternativos da mosca-das-frutas, mas também importantes repositórios e multiplicadores naturais dos seus principais parasitoides. Aliado a essa premissa, o estudo dessa interação (planta comercial, plantas nativas, moscas e parasitoides) foi desenvolvido por Gattelli (2006) em pomar de laranja ‘Céu’ onde grande parte dos vizinhos ao redor possuíam pequenos pomares de mirtáceas. Os resultados apontaram *D. aureolatus* como o parasitoide mais frequente para todas as espécies de mirtáceas pesquisadas além da espécie comercial. Gattelli (2006) comentou que apesar desse parasitoide ser nativo, tendo preferência por frutíferas também de origem neotropical (hospedeiros multiplicadores), ele é adaptado às frutíferas exóticas. Isso se explica por parasitar também larvas de mosca na laranja ‘Céu’. Aguiar-Menezes et al. (2001) também comentaram que entre as espécies de parasitoides nativos, *D. aureolatus* foi o mais eficiente em parasitar larvas em frutíferas exóticas, apesar dos maiores índices de parasitismos em fruteiras nativas. Dessa forma, esse seria mais um incentivo à permanência das frutíferas nativas próximas aos pomares comerciais de espécies exóticas, pois estimularia os inimigos naturais da área à co-evolução (GATTELLI, 2006).

## 2.10. Nematoides entomopatogênicos, fatores bióticos, abióticos e flutuação populacional

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) são agentes de controle biológico de pragas que apresentam alguma fase de seu ciclo de vida no solo (POINAR, 1990). Três gêneros de nematoides são comumente conhecidos como entomopatogênicos obrigatórios: *Steinernema*, *Neosternernema* e *Heterorhabditis*. Esses NEPs apresentam uma associação mutualística com bactérias que são os agentes patogênicos, carregando-as dentro de seu corpo e introduzindo-as na hemolinfa do hospedeiro após penetração pela boca, anus ou espiráculos. Lá as bactérias multiplicam-se e excretam toxinas, que causam a morte do inseto em torno de 24 a 72 h da infecção (DOWDS; PETERS, 2002). Os NEPs se alimentam tanto das bactérias quanto dos restos dos insetos. Os hospedeiros atacados apresentam coloração amarela, marrom claro e amarelo claro ou marrom avermelhada, dependendo da colônia bacteriana introduzida pelo nematoide. Geralmente, há associação entre bactérias *Photorhabdus* sp. (cor marrom escuro) e *Heterorhabditis* sp. e entre *Xenorhabdus* spp. (outras cores) e *Steinernema* sp. (POINAR, 1990; VOSS et al., 2009). Atualmente, estudos apontam o gênero de nematoides facultativos *Oscheius* (anteriormente classificados como *Rhabditis*) como eficientes no controle biológico de alguns insetos. Por serem parasitas facultativos, são entomopatogênicos apesar de também se alimentarem de outras fontes (YE et al., 2011). Diferentemente dos outros gêneros, esse nematoide possui associação menos estreita com suas bactérias, levando-as na parte de fora do seu corpo para o interior do hospedeiro; porém, também causando sua morte (TORRES-BARRAGAN et al., 2011). Da mesma forma que as outras bactérias dos *Steinernema* e dos *Heterorhabditis*, elas também geram ambiente favorável para a multiplicação dos nematoides, além de inibir o desenvolvimento de outros microrganismos (SEREPA; GRAY, 2014). Além da fase adulta e do ovo, os NEPs apresentam mais duas fases imaturas, todas no interior do hospedeiro. Há apenas uma terceira fase de juvenis (terceiro instar), chamada de juvenis infectivos (JIs), que possui vida livre. Quando o alimento se torna escasso, esses imaturos abandonam o cadáver se dispersando na solução do solo em busca de novos hospedeiros (POINAR, 1990). São os JIs que podem ser utilizados em programas de controle biológico, podendo ser armazenados em água, criopreservados e aplicados ao solo através dos mesmos equipamentos de aspersão usados no controle químico (SHAPIRO-ILAN et al., 2012).

Os NEPs estão sujeitos à interferência de fatores abióticos e bióticos no meio ambiente. Dessa forma, o conhecimento de como esses fatores interfere em sua biologia são

de extrema importância para o desenvolvimento de inseticidas biológicos (RODRIGUES-TRENTINNI, 1996). Dentre esses fatores destacam-se os ligados ao solo (textura, aeração, composição química e física, umidade, temperatura e pH), além da abundância de hospedeiros e de antagonistas desses nematoides (KAYA, 1990; LEZAMA-GUTIÉRREZ et al., 2006). O solo é um substrato complexo e com distintas particularidades em cada localidade, o que dificulta estudos da dinâmica de nematoides (KAYA, 1990).

Os solos são o habitat natural dos NEPs; contudo, sua textura (granulometria) e tipo podem influenciar na dispersão, sobrevivência e patogenicidade dos nematoides. Estudos apontam que em solos arenosos ou franco-arenosos a eficiência de nematoides é maior, e solos com altas concentrações de argila apresentaram menor sobrevivência de *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) e de *Steinernema glaseri* (Steiner, 1929) (KUNG et al., 1991). Isso foi explicado por outros fatores encontrados nesses solos que influenciam o seu desenvolvimento e comportamento. Solos mais finos apresentam poros menores que por consequência, fazem com que a água fique retida por mais tempo em seu interior. Esses solos são menos aerados e, conseqüentemente, dificultam a sobrevivência dos nematoides. Solos arenosos, com quantidades maiores de macroporos, são favoráveis à sobrevivência pela melhor aeração existente. O diâmetro maior dos poros também facilita na dispersão tanto horizontal quanto vertical dos NEPs, fazendo com que tenham mais chances de encontrarem hospedeiros. Nematoides em solos mais arenosos (maior porosidade) gastam menos energia na busca por hospedeiros, fazendo com que sobrevivam por mais tempo (KAYA, 1990; KUNG et al., 1991; LEZAMA-GUTIÉRREZ et al., 2006).

A umidade do solo também influencia na sua sobrevivência. *S. carpocapsae* foi capaz de sobreviver em solos secos entrando em estado de anidrobiose (suspensão ou redução da atividade metabólica) com umidade entre 2 a 4%. Após reidratação do solo até 16% houve a retomada das atividades e inclusive da patogenicidade (KUNG; GLAUGLER, 1990). A umidade ótima para a maioria dos nematoides é a da capacidade de campo. Com 80% de umidade, a 20 °C por 12 dias, 90% dos indivíduos de *S. carpocapsae* sobreviveram (KUNG et al., 1991).

Na superfície do solo, o calor e os raios ultravioletas são capazes de desidratar os NEPs. Dessa forma, ao se utilizarem NEPs como biocontroladores em aplicações por aspersão, recomenda-se a aplicação em ambiente úmido e no início ou final do dia (SHAPIRO-ILAN et al., 2012). A temperatura também influencia no comportamento dos NEPs (KAYA, 1990). Extremos térmicos influenciam tanto nas atividades dos nematoides quanto na de suas bactérias. Em geral, temperaturas altas podem levar a baixa sobrevivência,

pois com o metabolismo mais acelerado há o aumento da respiração e conseqüentemente as reservas do indivíduo são exauridas mais rapidamente. Da mesma forma, em temperaturas muito baixas, os NEPs gastam muita energia para manter seu metabolismo, chegando à exaustão (KAYA, 1990; MEJIA-TORRES; SÁENZ, 2013).

As temperaturas basais e os limites térmicos apresentam-se diferentes para gêneros, espécies e inclusive para isolados de NEPs. Estudos vêm demonstrando que, em temperaturas do seu local de origem, os isolados apresentam melhores resultados, tanto nos parâmetros da biologia quanto na patogenicidade (KAYA, 1990; KUNG et al., 1991). O pH do solo parece não ter influência significativa no desenvolvimento e patogenicidade de NEPs do gênero *Steinernema* (RODRIGUES-TRENTINNI, 1996). Porém, em pH 10, nenhum dos isolados mostrou-se patogênico (KUNG; GAUGLER, 1990).

Organismos antagônicos ao desenvolvimento dos nematoides também podem interferir na sua biologia e na sua sobrevivência, merecendo destaque em flutuações populacionais de NEPs. Esses organismos são considerados importantes fatores bióticos e são descritos como parasitoides, predadores e patógenos dos NEPs, chamados por Kaya (1990) de inimigos naturais. Os que são capazes de realizar controle biológico dos NEPs são particularmente fungos, bactérias e invertebrados predadores (por exemplo: ácaros, colêmbolos, protozoários e nematoides nematófilos), os quais podem produzir substâncias tóxicas. Os antagonistas são capazes de reduzir o número de NEPs no solo, bem como sua eficiência de controle de insetos (DUNCAN et al., 2003). Fungos nematófilos foram capazes de predação *Heterorhabditis amazonensis* (Carvalho, 2006) em todos os substratos testados. O NEP teve sua eficiência reduzida havendo a total mortalidade após oito dias de exposição aos fungos *Arthrobotrys oligospora*, *A. conoides* e *Duddingtonia flagrans* (ANDALÓ et al., 2008).

Os NEPs já foram capturados em todos os continentes (com exceção da Antártida) e em algumas ilhas. Há algumas espécies que inclusive são consideradas cosmopolitas tais como *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934), *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1976) e *Heterorhabditis indica* (Poinar, Karunakar e David, 1992) (BARBOSA-NEGRISOLI, 2009). Apesar do potencial dos nematoides como biocontroladores de insetos de solo, poucos estudos visando a novos isolados vêm sendo conduzidos, sendo a Europa o continente onde mais se tem estudado esse agente (HOMINICK, 2002). Os NEPs são capturados do solo através de armadilhas de capturas, tais como as armadilhas de White (SHAPIRO-ILAN et al., 2012). Após comprovada a patogenicidade em insetos sensíveis tais como a *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), são purificados, multiplicados e armazenados em temperaturas de 10-15 °C



(VOSS et al., 2009). O armazenamento é realizado para posteriores testes de virulência e para a identificação desses isolados. Data e local de origem são registrados para posteriores descrições morfológicas e identificação da espécie (CARVALHO, 2006; BARBOSA-NEGRISOLI et al., 2009). Hoje a biologia molecular vem auxiliando taxonomistas nessa identificação (LIU et al., 2012). Os principais marcadores moleculares para identificação de nematoides entomopatogênicos se encontram no DNA ribossômico, e estão disponíveis para comparações em bancos de dados públicos - GenBanks (ADAMS; NGUYEN, 2002). A análise do DNA permite identificar isolados a nível de gênero, e para as novas espécies é necessária a descrição morfológica.

Poucos estudos foram conduzidos buscando caracterizar a flutuação populacional de NEPs a campo, ainda mais envolvendo nematoides nativos (KAYA, 1990; RIO; CAMERON, 2000). A grande parte dos trabalhos foi realizada em condições de clima temperado. Além disso, o estudo de correlações entre população de NEPs com fatores bióticos e abióticos em diferentes locais gera resultados divergentes. Rio e Cameron (2000) obtiveram correlação positiva entre número de amostras capturadas de *H. bacteriophora* e o aumento de temperatura do solo. McGraw e Koppenhofer (2009) em estudo sobre as interações de *Listronotus maculicollis* Kirby (Coleoptera: Curculionidae) e nematoides endêmicos em gramados de canchas de golfe nos Estados Unidos da América, apontaram correlação entre o aumento da população da praga e a dos nematoides. Já Puza e Mracek (2005), observaram correlações negativas entre a densidade de NEPs nativos e a de comunidade de insetos mais frequentemente hospedeira dos nematoides. Isso foi explicado pela provável competição entre os nematoides e por nutrientes limitantes (hospedeiros). Todavia, Campbell et al. (1995) não encontraram relações significativas entre nenhum dos fatores na captura de NEPs nativos.

Populações de nematoides facultativos como *Oscheius* sp. podem ser mais constantes por terem uma fonte de alimento mais ampla. Poucos estudos foram desenvolvidos com nematoides facultativos a campo para evidenciar seu papel com agentes de controle biológico (YE et al., 2011). Na América do Sul, já foram descritas duas espécies de *Oscheius* associadas à mortalidade de insetos. Na Colômbia, Stock et al. (2005) encontraram *Oscheius colombiana* e no Brasil, *Rhabditis (Oscheius) pheropsophi* foi descrita por Smart e Nguyen (1994).

## 2.11. Controle biológico de moscas-das-frutas com NEPS

As moscas-das-frutas podem ter sua população reduzida devido ao controle por agentes de controle biológico, tais como predadores, parasitoides e patógenos (RODRIGUES-TRENTINI, 1996). O primeiro registro de NEPs causando doenças em dípteros foi realizado por Poinar (1975), que encontraram em pupas de *Rhagoletis pomonella* (Walsh) (Diptera: Tephritidae) nematoides do gênero *Steinernema*. Desde então, trabalhos vêm sendo realizados, principalmente em laboratório, visando estudar a eficiência, virulência e dose de controle de diferentes isolados de NEPs no combate a distintas moscas-das-frutas de importância econômica. Dentre essas, destacam-se os realizados para a mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitidis capitata*, inclusive no Brasil (RHODE et al., 2010; MINAS et al., 2011; CANESIN, 2011; ROHDE et al., 2012 a, b). Para o gênero *Anastrepha*, diversos trabalhos também já comprovaram a virulência de isolados de NEPs em laboratório e alguns experimentos também foram conduzidos a campo (BEAVERS; CALKINS, 1984; HERNÁNDEZ, 2003; LEZAMA-GUTIÉRREZ et al., 1996; TOLEDO et al., 2001; TOLEDO et al., 2005a, b; TOLEDO et al., 2006 a, b; TOLEDO et al., 2014).

Foram elaborados três estudos sobre isolados de NEPs com *A. fraterculus*, todos no Brasil. Rodrigues-Trentini (1996) avaliou a virulência de dois isolados do gênero *Steinernema* sobre larvas e pupas de *A. fraterculus* em placa de Petri e em solo estéril. Os resultados mostraram-se promissores tanto com *S. carpocapsae* quanto com *S. glaseri*. Houve maior produção de JIs e melhor desenvolvimento de NEPs nas dosagens de 40 e 120 JIs por larva de *A. fraterculus*. Após aplicação dos isolados, maior proporção das larvas inoculadas com *S. carpocapsae* chegaram até a fase de pupa do que das que receberam *S. glaseri*. Em solo franco argiloso, a aplicação de 1497 JI cm<sup>-2</sup> foi a dose que melhor controlou *A. fraterculus* (91,7%).

Barbosa-Negrisoni et al. (2009) avaliaram a virulência de isolados de NEPs endêmicos do Rio Grande do Sul em larvas e pupas de *A. fraterculus* em condições de laboratório, semi-campo e campo (pomar de pessegueiro). Isolados de *S. feltiae*, *Steinernema rarum* (Doucet, 1986), *Steinernema riobrave* (Cabanillas, Poinar e Raulston, 1994) e *H. bacteriophora* tiveram sua virulência testadas no controle da mosca-da-fruta-sulamericana. Os mais eficientes foram *H. bacteriophora* RS 88 e *S. riobrave* RS 59, não havendo diferenças significativas da mortalidade entre larvas e pupas. O primeiro foi o mais virulento, podendo buscar seu hospedeiro tanto no solo quanto dentro de frutos.

Canesin (2011) estudou a virulência em laboratório, efeitos de doses e persistência de isolados *Heterorhabditis* sp. nativos de São Paulo em pomar de citros do mesmo Estado no controle de *A. fraterculus*. Dentre os isolados, *H. amazonensis* CB 24 foi o que apresentou melhores resultados, controlando 70% da população em laboratório e 55% a 67% em campo, dependendo da dosagem.

### 3. CAPÍTULO I. SOUTH-AMERICAN FRUIT FLY POPULATION FLUCTUATION IN RELATION TO BIOTIC AND ABIOTIC FACTORS IN TEMPERATE FRUIT ORCHARDS IN PORTO AMAZONAS, PR, BRAZIL

#### 3.1. Abstract

South-American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Wied.), is a polyphagous pest. It is well adapted to temperate fruits in Brazil. *A. fraterculus* population can vary according to availability of primary and secondary hosts in the environment and to climatic factors. The objective of this work was to analyze *A. fraterculus* population fluctuation in temperate orchards and in its adjacent Atlantic forests fragments in relation to biotic and abiotic factors in Porto Amazonas, Paraná, Brazil. Modified McPhail traps were installed in two apple 'Eva' orchards, one peach 'Charme' and one persimmon 'Fuyu' and in their adjacent forests. Floristics richness and fruit fly host plants were registered. Fruit samples inside-orchard and in forest were taken to observe fruit infestations during two crops for each commercial fruit. Biological material, like genus *Anastrepha* spp. flies and hymenopteran parasitoids, were sampled every seven/fourteen days. *A. fraterculus* was the most common fruit fly in all orchards. Apple orchards had the most representative captures. However, only one of them had significantly more flies in inside orchard than in forest. There were positive correlation with *A. fraterculus* capture, the amount of parasitoids, fruit infestations and ripe fruits. As conclusion, fruit fly population peaks seems to obey the presence of ripe fruits in the orchards, with exception for peach. Other biotic and abiotic factors correlations are less important in this work.

**Key words:** *Anastrepha fraterculus*, ecology, *Malus domestica*, *Prunus persica*, *Diospyros kaki*, Atlantic Forest.

### FLUTUAÇÃO POPULACIONAL DE MOSCA-DAS-FRUTAS-SULAMERICANA EM RELAÇÃO A FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS EM POMARES DE FRUTEIRAS DE CLIMA TEMPERADO EM PORTO AMAZONAS, PR, BRASIL

#### 3.2. Resumo

A mosca-das-frutas-sulamericana, *Anastrepha fraterculus* (Wied.) é uma praga polífaga e bem adaptada às fruteiras de clima temperado no Brasil. A população de *A. fraterculus* varia de acordo com a presença de hospedeiros primários, secundários e de fatores climáticos. O objetivo do trabalho foi o de analisar a flutuação populacional de *A. fraterculus*

em pomares de fruteira de clima temperado e fragmentos de mata Atlântica adjacentes em Porto Amazonas, Paraná, Brasil, em relação com fatores bióticos e abióticos. Armadilhas McPhail modificadas foram instaladas em dois pomares de maçã ‘Eva’, um de pêssego ‘Charme’ e um de caqui ‘Fuyu’ e em suas matas adjacentes. Foi realizado levantamento florístico em busca de hospedeiros alternativos das moscas nas matas e coleta dos frutos na mata e nos pomares para a verificação de infestações da mosca durante duas safras de cada fruteira. Material biológico (*Anastrepha* spp. e parasitoides himenópteros) foi coletado a cada sete/catorze dias. *A. fraterculus* foi a espécie dominante em todos os pomares. Os pomares de maçã apresentaram maiores capturas, porém apenas em um deles capturou-se significativamente mais moscas no pomar do que na mata. Houve correlação positiva com o aumento de moscas, de parasitoides, de frutos infestados e de frutos maduros no pomar. Como conclusão, com exceção do pomar de pêssego, os picos populacionais das moscas parecem obedecer à presença de frutos maduros. Outros fatores bióticos e abióticos mostram correlações de menor importância neste trabalho.

**Palavras-chave:** *Anastrepha fraterculus*, ecologia, *Malus domestica*, *Prunus persica*, *Diospyros kaki*, Mata Atlântica.

### 3.3. Introduction

Among the south Brazilian States, Paraná is growing in temperate fruit production like peach [*Prunus persica* (L.) Batsch], persimmon (*Diospyros kaki* L.) and apple (*Malus domestica* Borkh.). The neighbor counties Porto Amazonas and Lapa are the main producer in the metropolitan region of Curitiba. They respond by 35.5% for apple, 11.6% peach and 3.7% persimmon production, which is 26.2% of total 2013 production of the three fruits in Paraná State (IBGE, 2015). However, crop losses are still frequent, especially because of pests’ attacks (Monteiro & Hickel, 2004).

The South-American fruit fly [*Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae)] is a key pest in many fruit tree species, including the temperate ones like apple, peach and also the persimmon. It has a wide range of hosts: more than 67 fruit species from Mexico to Argentina (Zucchi, 2000a). In Brazil, *A. fraterculus* have preference for native fruits (Zucchi, 2000a) for oviposition and some of them are considered multiplier and prime hosts. However, the exotic peach is also described as prime host in some places (Salles, 1999; Branco et al., 2000). Peach early ripening can difficult fly attack as well as whitish flesh and peel texture (Branco et al., 2000).

Apple is considered a secondary *A. fraterculus* host; even though can cause 100% losses in untreated and small orchards (Branco et al., 2000). Female oviposition puncture on green fruit can cause its deformation even when immature doesn't survive (Sugayama et al., 1997). Apple 'Eva' and persimmon 'Fuyu' are important cultivars in southern Brazil. The first is an early-season and low cold requirement cultivar, whose planted area is growing in Paraná and other warm Brazilian states (IBGE, 2015). The latter is one of the most exported persimmons and is appreciated in Brazilian market (Sato and Assumpção, 2002). However, 'Eva' and 'Fuyu' relationship with *A. fraterculus* have not been studied. *Anastrepha* sp. were recovered in persimmon fruits in São Paulo and Rio Grande do Sul States without cultivar specification (Raga et al., 2011; Nunes et al., 2012).

It's known the *A. fraterculus* domination in southern Brazil, but few studies about its population fluctuation were made in Paraná State (Monteiro & Hickel, 2004). *A. fraterculus* population can vary according to availability of primary and secondary hosts in the environment and to climatic factors (Carvalho, 2005). Studies on fruit flies population fluctuation are required to determine integrated pest management (IPM) strategies. Researches had output data on population peaks and its relationship with other biotic and abiotic factors (Fehn, 1982; Garcia et al., 2003; Chiaradia et al., 2004; Teixeira et al., 2015), as useful information for IPM improvement. Food traps are commonly used for monitoring flies population in IPM. However, besides the good estimate of insect damage levels, they can capture only passing-through individuals. So, fruit sampling is the best way to access the direct fruit fly damage in orchards and it can characterize the primary and secondary hosts (Carvalho, 2005). Besides, fruit flies can use hedgerows and orchard-adjacent forests as refuge, rest and multiplication site during the entire year, returning to orchard when commercial fruits start ripening (Kovaleski et al., 1999; Monteiro & Hickel, 2004). Natural enemies like hymenopteran parasitoids are also influenced by adjacent forest and hedgerows and its biodiversity helps on reducing pest population (Miliczky & Horton, 2005). However, chemical sprays are still used in fruit fly control and toxic baits are commonly applied on its population reduction in Southern Brazil orchards (Sugayama et al., 1997).

This work considered the following objectives, concerning temperate fruit orchards in Porto Amazonas, Paraná, Brazil: (a) identify and compare *A. fraterculus* populations inside the orchard and adjacent forest; and (b) characterize the fluctuation of the population along the year in relation to climatic factors, commercial fruit infestation, number of insecticide applications, floristic richness, hymenopteran parasitoid community and number and phenology of hosts.

### 3.4. Material and methods

The study was performed in two ‘Eva’ apple orchards (apple 1 and apple 2) with 7 and 5 ha (both with more than eight years old), one ‘Charme’ peach orchard (2 ha, five years old) and one ‘Fuyu’ persimmon orchard (5.38 ha, 24 years old) located in Porto Amazonas County in Paraná State, Brazil (25°32'08"S, 49°54'52"W and 865 m average height). In apple 1, peach and persimmon orchards, fruit fly was monitored and controlled using toxic baits with Malathion on the board row. In apple 2, fruit flies were not monitored and were managed through toxic baits, but chemical sprays were used to control other pests. The insecticides/acaricides sprayed in peach orchard were organophosphates and *Bacillus thuringiensis*; in persimmon orchard, organophosphates, novaluron, *B. thuringiensis*, imidacloprid, anthranilamide and espirodiclofen; in apple 1, organophosphates, *B. thuringiensis*, carbaryl and espirodiclofen; and in apple 2, organophosphates and anthranilamide. The insecticides applied in all orchards can be better observed in the attachments 1 and 2.

The study was conducted through two production cycles (two crops) for each orchard, from September, 2012, to July, 2014. In each orchard three to six inside-orchard (IO) sectors, 100 m<sup>2</sup>, were delimited, located close (20 m) to the edges. Apple 1 and peach orchard had three hedgerow sectors, persimmon had five and apple 2 had six sectors (three in hedgerows and three in adjacent forest). The native vegetation was a mixed-ombrophilous forest, considered a part of the southern Atlantic Forest (ITCG, 2009). For each sector, the number of species in the arboreal component and fruit producer’s bushes (floristic richness) was determined following the quadrant point method (Cottam & Curtis, 1956) and are presented in Tables 1 and 2. Species were identified with the help of Dr. Osmar dos Santos Ribas from Botanic Museum of Curitiba, Paraná.

In each sector, a modified McPhail trap was placed 20 m from the edge following the methodology proposed by Monteiro and Hickel (2004) and baited with 5% hydrolyzed protein water solution, replaced every 14 days. Insects captured were collected weakly from November to May and biweekly in other months.

The harvest time in both crops was: for apple 1 from December 16 to February 27; for apple 2, from January 2<sup>nd</sup> to February 1<sup>st</sup>; for persimmon, from March 16 to May 8; and for peach, from November 7 to December 9.

In the first crop (2012-2013), fruit from each orchard were sampled (around one kg) similarly to Gattelli et al. (2008) for accessing fly infestation and identification. In forest sectors, fruits were collected according to their availability. In the second crop (2013-2014), during harvest, four plants from each inside-orchard (IO) sector were randomly chosen from a plant row. From each one, five fruits were collected from canopy and ground, when available. The rest of the year, samples were six fruits from canopy and ground (two fruits from each tree). In laboratory, samples were maintained in plastic boxes with sterile vermiculite similar to Radonjic (2013). Tephritidae pupae recovered were placed in Petri dishes with humid filter paper. After emergency, *Anastrepha* sp. were placed in ethanol 70%.

All female *Anastrepha* sp. captured in McPhail traps or from fruits were identified according to Zucchi (2000b). Hymenopteran parasitoids recovered from fruits or captured in McPhail traps were identified at family level according to Costa (2005). Part of this biological material was identified in the Laboratório de Biologia Comparada de Hymenoptera – Federal University of São Carlos, São Paulo.

Weather data were provided by Simepar (Sistema Meteorológico do Paraná, Curitiba, PR). Data on mean air temperature, maximum and minimum absolute air temperature and relative humidity were obtained from the neighbor county Lapa (closest place to the studied orchards), while rainfall data was registered in Porto Amazonas, PR (Figure 1a and b).

In order to characterize the fluctuation of *A. fraterculus* population and parasitoid community along the year, data on the number of insects trapped by day were split into inside-orchard (IO) or forest, and, together the number of pupae recovered per fruit, were plotted as a function of time. Furthermore, the observation in each sector and date were grouped in 64 combinations (cases) of commercial specie (apple 1, apple 2, peach or persimmon), place (inside-orchard or forest), phenological phase (fruit growth, maturation, ripe or post-harvest) and the crop/year [1, 2 and 3 (peach bloomed a third cycle in the end)] (Attachment 3). Phenological phases are delimited through horizontal double lines in Figure 2 and 3. A multivariate Principal Component Analysis was performed for the 64 cases and the weather variables plus floristic richness, number of host species, toxic-to-*A. fraterculus* sprays, presence of ripe fruits (in the inside orchard and in the adjacent forests), total number of *Anastrepha* sp. trapped and recovered from fruit (pupae) (Attachment 4). The population of *A. fraterculus* inside-orchard (IO), as estimated by the number of insect trapped, was



compared to the forest. An analysis of variance of the total number of *Anastrepha* sp. collected were performed having as factors the fruit orchard (apple1 and 2, peach and persimmon) and the site (IO and forest), and the sectors as repetitions, after a Box-Cox transformation for data suiting. All statistical analyses were performed in R 3.02 (R Development Core Team, 2008).

### 3.5. Results and discussion

Along the study, 3,447 adults of *Anastrepha* sp. were captured in the traps. Among them, 1,835 (53.2%) were females and could be identified at specie level, and 99.7% of the females were identified as *A. fraterculus*. So, the total *Anastrepha* sp. (male and female) captured was considered as *A. fraterculus* in order to allow the analysis with the full dataset, as in Garcia and Corseuil (1998) and Garcia et al. (2003).

In apple 1 orchard first crop, a greater number of *A. fraterculus* were captured inside orchard from December, 2012 until August 2013. Two peaks happened: in late February and mid-June, 2013 (Figure 2a). In the second crop most flies were captured from February to April, 2014, and a peak occurred in late March, 2014. Apple 2 orchard also had two periods with major fly capture: from December, 2012 to March, 2013 and from late January to March, 2014 (Figure 2b). The apple 2 first peak was in early January, 2013 and for the second crop the fly capture peaked in late March, 2014. The population peaks happened following the presence of ripe fruits in both apple orchards. In the first crop, ripe fruits were present until August following 'Eva' out-season blooming in both apple orchards. The persimmon orchard had a smaller fruit fly population when compared to the apple (Figure 3a and 4a). But, as in apple 2, two major capture periods happened, the first longer, and both from maturation to post-harvest. The peaks in both persimmon crops were in the beginning of March. Fruit fly population in the peach orchard was the smallest (Figure 4a). In the first crop harvest time, almost no *Anastrepha* sp. was captured (Figure 3b). More flies were captured in adjacent forest/hedgerows (Figure 4a).

Fruit infestation (pupa/fruit) was more important in apple (Figure 2). The infestation peak reached eight pupae per fruit in the first crop post-harvest (P1) for apple 1 and 1.6 pupae per fruit during ripening in the second crop (R2) in apple 2. In peach and persimmon, no pupa was recovered from fruit collected in the first crop (Figure 3). The quantity of pupae followed

the presence of adults in the traps, excepting for peaches. Infestation by *A. fraterculus* occurred during maturation and ripe-fruit period.

The total amount of flies captured in traps installed in the forest and hedgerows was significantly smaller than IO in apple 1 and bigger in peach (Figure 4a). In the other two orchards the difference was not significant. Sugayama et al. (1997) captured more adults in apple orchard than in adjacent forest, corroborating this work. It was explained by the scarce source of food in the adjacent forest.

Regarding the community of natural enemies, in all orchards more hymenopteran parasitoids were trapped along the second crop (Figure 5a-d). Parasitoids were less frequent from June to October, when lower temperatures, including below 0 °C, were observed (Figure 1a). It was outstanding the higher hymenopteran parasitoids captures observed in apple 1 inside-orchard (IO) compared to adjacent forest in season two (second crop).

The relationship among the variables measured in the 64 cases is summarized in the principal component analysis. In Figure 4b, the variables are plotted in relation to the first, second and third principal components. The first component explained 28.9% of the variance, the second 21% and the third 15.7%, cumulating 66.6% of the total variance. The variable which correlated more strongly to *A. fraterculus* capture was the number of pupae per fruit (Figure 4b), what was expected since one depends directly on the other. The presence of ripe fruit was more, and positively, correlated to *A. fraterculus* than temperature (minimum, maximum or average) and relative humidity, at least in the ranges they occurred in that situation. However, among the meteorological variables, relative humidity was the most correlated with *A. fraterculus*. Fehn (1982) found inconclusive correlations between the *Anastrepha* sp. population and the air temperature in peach orchards in Rio Grande do Sul State. This was attributed to the fact that the correlation is not uniform and inconstant. Chiaradia et al. (2004) only found *A. fraterculus* correlations to maximum and minimum air temperatures, although it didn't happen in this work. Inconclusive correlation was observed between *A. fraterculus* capture and both floristic richness and number of hosts. They were negatively correlated, considering the two main principal components, but the opposite if considered the components one and three (Figure 4b). A negative correlation was expected; however, some plants in these adjacent forests are not hosts (Table 2) and few are alternative hosts (Table 1); only one mandarin plant had some *Anastrepha* sp. recovered from fruits. Teixeira et al. (2015) didn't find higher *A. fraterculus* peaks in apple orchard even with prime hosts in its hedgerows. Their orchard with more *A. fraterculus* had few alternative hosts in its hedgerows, corroborating this work.

It was not observed a clear correlation between insecticides sprays and *A. fraterculus* (Figure 4b), since depending on the component considered it can be positive or negative. It probably happened because fruit flies were trapped in forests and IO in similar rates, instead of sprays which reach only the IO. Furthermore, insecticides used to be sprayed when fruit fly are present, but less frequently after harvest (Attachment 1 and 2). The insecticides could have negative correlations with Tephritidae fruit flies because of the population reduction after sprayed (Fenh, 1982). However, this last work didn't regard the kind of sprays and the application schedules. Sugayama et al. (1997) observed insecticides are able to control *A. fraterculus* immature, but do not interfere in female oviposition. This could partially explain the undetermined correlation between chemical applications and flies capture in Porto Amazonas' orchards.

Adult *A. fraterculus* were more abundant in apple from harvest to post-harvest. This happened because ripe fruit were present, and the two variables were correlated (Figure 4b). Insecticides were reduced in the areas to allow fruit harvested, and so the population could continue high even with less fruit. Out-season fruit were available until the winter (Figure 2a) and were infested. It was observed for *C. capitata* a rising population when ripe fruits were left over ripe in the tree or on the ground (Sciarretta & Trematerra, 2011), corroborating this work's results. From October to November, 2013, in apple 1, no fruit flies were captured, probably because no ripe fruit were available in the IO and fly population were low in all orchards. The second crop in apple 2 orchard was severally harmed by frost and hail, so their amount of fruits in post-harvest was very low when compared to apple 1, what helps explain the smaller capture in that crop.

In persimmon, population was smaller than in apple 1. Considering they were distant less than 200 m, and apple ripens earlier, it would be expected immigration from apple. However, adult flies stop dispersing while a suitable host (apple) is available (Sugayama et al., 1997), what partially explain the smaller population in the inside-orchard persimmon. Furthermore, apple is more suitable than persimmon to *Anastrepha* sp., so they have another reason to stay in the apple. Sciarretta and Trematerra (2011) also trapped more fruit flies in apple orchard than in persimmon.

The peak of number of flies trapped didn't obey the ripening time in peach (Figure 3b) as observed by Salles (1999), Garcia and Corseuil (1998) and Garcia et al. (2003) in Rio Grande do Sul and Santa Catarina States, besides that is the most suitable time for *A. fraterculus* infestation (Salles, 1999). A frost during blooming in the second crop drastically reduced fruit set, so *A. fraterculus* was less attracted to the inside-orchard than in the first

crop. ‘Charme’ is a mid-season cultivar (Hofmann et al., 2003), so its maturation occurs in a time with smaller population of fruit flies, what helps explain the lower rates of capture. The peaks observed in April to June in peach adjacent forest may have been caused by migration from the neighbor orchards (apple 1 and persimmon) where populations were bigger in that moment. In Rio Grande do Sul State, late-maturing peach cultivars had less *A. fraterculus* fruit damage than early-maturing ones, what is apparently due to immigration of flies from other hosts (Branco et al., 2000). There were also some mandarin trees in the peach adjacent forest with ripe fruits in May, which could have attracted the fly. Branco et al. (2000) found *Anastrepha* sp. population peaks higher for mid-to-late and late-season processing peach (yellow flesh) in Curitiba, Paraná. The whitish flesh was less suitable to fruit flies infestation than the yellow ones, especially when cultivar had great firmness and hairy peel texture. ‘Charme’ fruit has whitish flesh and hairy peel what could make the fruit not attractive to fruit flies.

Most parasitoid captures in McPhail traps occurred in the same time as *A. fraterculus* and inside the orchards. This correlation can be observed in the Figures 4b, where the arrows correspondent to parasitoid and *Anastrepha* sp. points to the same direction. Air temperature could be considered a reason for both populations grow concomitantly, however temperature did not correlate with *A. fraterculus* and parasitoid amount (Figure 4b). High natural enemies’ biodiversity enhances pest biological control (Miliczky & Horton, 2005). However, only 0.89% of the insects emerged from the pupae obtained from the fruit collected inside the orchards were parasitoids. So, it is more probable that parasitoids occurred concomitantly with *A. fraterculus* searching for other hosts in the inside-orchard, and such hosts are associated with apple phenology (presence of ripe fruit).

The average temperature dropped to 10 °C (Figure 1a) in the end of July, 2013, with negative absolute minimum temperature, and after that parasitoid population in all orchards was strongly reduced following the same reduction observed by the fruit fly population in all orchards. Temperatures under 10 °C and over 30 °C can harm the development, survivor and also dispersion of insects including parasitoids and its hosts (Hance et al., 2007). For biological activities of *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes, 1924), an indigenous *A. fraterculus* parasitoid, the best temperature is among 18-25 °C (Gonçalves et al., 2014). So, low temperatures as the observed in Porto Amazonas’ winter could have affected negatively parasitoid populations.

In both apple orchards in the second crop, the fly population increased first in the adjacent forests. In December-January, when insecticides applications reduced because of

fruit harvest, *A. fraterculus* population grew. Another explanation could be migration from forest to IO, since *A. fraterculus* are able to move great distances (Kovaleski et al., 1999). Adjacent forest close to orchards can provide alternative pollen, nectar and shelter (Miliczky & Horton, 2005). The female uses the adjacent forest as refuge at night even during apple harvest (Sugayama et al., 1997). This might be happening with these two orchards in Porto Amazonas since the forest in this work have few prime hosts (Table 1). Sugayama et al. (1998) studied *A. fraterculus* biology aspects in some apple cultivars. However, no difference in behavior was observed in female oviposition preference.

Fruit samples and adult monitoring supported *A. fraterculus* is not established in the orchard, returning in each crop. *A. fraterculus* uses the adjacent forest as remaining or multiplication resource and returns to orchard with the ripening of fruits (Kovaleski et al., 1999). This behavior can explain the high amount of fly captures in the forest before ripening until post-harvest in the present work. Salles (1999) captured *A. fraterculus* adults firstly in the adjacent forests of 'Gala' apple, moving into the orchard following fruit ripening. Environment might be selecting the most adapted *A. fraterculus* individuals to temperate fruits as suggested by Sugayama et al. (1997). However, following observations by other authors presented above, the South-American fruit fly cannot be considered established inside the commercial orchards in Porto Amazonas.

### 3.6. Conclusion

*Anastrepha fraterculus* is the domain fruit fly in Porto Amazonas temperate orchards, and occur mainly in apple 1. The main population peaks happen during fruit ripening and harvest in apples and persimmon orchards. *Anastrepha* sp. occurrence is more associated with the presence of ripe fruits and hymenopteran parasitoids in the orchard than with other biotic and abiotic factors.

### 3.7. Acknowledgements

We thank Guilherme G. Garcia, José A. S. Tomba for field support and fruit sample help in laboratory. To Dr. Osmar S. Ribas, André L. Martins and Dr. Angélica M. Penteado-Dias by the biological material identification. To CNPq and CAPES by providing financial support.

### 3.8. References

- Branco, E. S., Vendramin, J. D., & Denardi, F. (2000). Resistência às moscas-das-frutas em fruteiras. In A. Malavasi, & R. A. Zucchi (Eds.). *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*. (p.161-167). Ribeirão Preto: Holos Editora.
- Carvalho, R. S. (2005). *Metodologia para monitoramento populacional de moscas-das-frutas em pomares comerciais*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.
- Chiaradia, A. L., Milanez, M. J., & Dittrich, R. (2004). Flutuação populacional de mosca-das-frutas em pomares de citros no oeste de Santa Catarina, Brasil. *Ciência Rural*, 34, 337-343.
- Costa, V. A. (2005). *Identificação das principais famílias de himenópteros parasitoides que ocorrem no Brasil*. Campinas: Instituto Biológico. 45p.
- Cottam, G., & Curtis, J. T. (1956). The use of distance measures in phytosociological sampling. *Ecology*, 37, 451-460.
- Fehn, L. M. (1982). Influência dos fatores meteorológicos na flutuação e dinâmica de população de *Anastrepha* spp. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 17, 533-544.
- Garcia, F. R. M., & Corseuil, E. (1998). Análise faunística de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em pomares de pessegueiro em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Zoologia*, 15, 1111-1117.
- Garcia, F. R. M., Campos, J. V., & Corseuil, E. (2003). Flutuação populacional de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) na Região Oeste de Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 47, 415-420. <http://dx.doi.org/10.1590/S0085-56262003000300009>.
- Gattelli, T., Silva, F. F., Meirelles, R. N., Redaelli, L. R., & Dal Soglio, F. K. (2008). Moscas

frugívoras associadas a mirtáceas e laranjeira “Céu” na região do Vale do Rio Caí, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, 38, 236-239. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000100038>.

Gonçalves, R. S., Nava, D. E., Andreazza, F., Lisbôa, H., Nunes, A. M., Grützmacher, A. D., Valgas, R. A., Maia, A. H., & Pazianotto, R. A. (2014). Effect of constant temperatures on the biology, life table, and thermal requirements of *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae), a parasitoid of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Environment Entomology*, 43, 491-500. <http://dx.doi.org/10.1603/EN13072>.

Hance, T., Baaren, J. V., Vernon, P., & Boivin, G. (2007). Impact of extreme temperatures on parasitoids in a climate change perspective. *Annual Review of Entomology*, 52, 107–26. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091333>.

Hoffmann, A., Bernardi, J., Raseira, M. C. B., & Simonetto, P. R. (2003). Cultivares. In Sistema de Produção de Pêssego de Mesa na Região da Serra Gaúcha. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Retrieved in 05 August 2015, from: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pessego/PessegodeMesaRegiaoSerraGaucha/cultivar.htm>.

IBGE. (2015). Produção Agrícola Municipal. Retrieved in 10 August 2015, from [http://ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2013/default\\_perm\\_xls.shtm](http://ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2013/default_perm_xls.shtm).

ITCG - Instituto De Terras, Cartografia e Geociências (2009). Mapa Fitogeográfico do Paraná 1989/1990. Curitiba: SEMA. Retrieved in 11 October 2013, from [http://www.itcg.pr.gov.br/arquivos/File/Produtos\\_DGEO/Mapas\\_ITCG/PDF/Mapa\\_Fitogeografico\\_A3.pdf](http://www.itcg.pr.gov.br/arquivos/File/Produtos_DGEO/Mapas_ITCG/PDF/Mapa_Fitogeografico_A3.pdf).

Kovaleski, A., Sugayama, R. L., & Malavasi, A. (1999). Movement of *Anastrepha fraterculus* from native breedings sites into apple orchards in Southern Brazil. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 91, 457-463. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1570-7458.1999.00514.x>.

Miliczky, R. E., & Horton, R. D. (2005). Densities of beneficial arthropods within pear and apple orchards affected by distance from adjacent native habitat and association of natural enemies with extra-orchard host plants. *Biological Control*, 33, 249-259. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.03.002>.

Monteiro, L. B., & Hickel, E. (2004). Pragas de importância econômica em fruteiras de caroço. In L. B. Monteiro, et al. (Eds.). Fruteiras de caroço: uma visão ecológica (p. 223-261). Curitiba: Reprosset I.

Nunes, A. M., Müller, F. A., Gonçalves, R. S. I., Garcia, M. S., Costa, V. A., & Nava, D. E. (2012). Moscas frugívoras e seus parasitoides nos municípios de Pelotas e Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, 42, 6-12. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782012000100002>.

R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved in 20 November 2012, from <http://www.R-project.org>.

- Radonjic, S. (2013). Dispersion of the mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* Wiedem. (Diptera: Tephritidae) in mandarin orchards on Montenegrin Seacoast. *Pesticidi i Fitomedicina*, 28, 31–38. <http://dx.doi.org/10.2298/PIF1301031R>.
- Raga, A., Souza-Filho, M. F., Machado, R. A., Sato, M. E., & Siloto, R. C. (2011). Host ranges and infestation indices of fruit flies (Tephritidae) and lance flies (Lonchaeidae) in São Paulo state, Brazil. *Florida Entomologist*, 94, 787-794. <http://dx.doi.org/10.1653/024.094.0409>.
- Salles, L. A. (1999). Colonização e dispersão de adultos de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) em pomares de pessegueiro e macieira. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, 5, 37-42.
- Sato, G. S., & Assumpção, R. (2002). Mapeamento e análise da produção do caqui no Estado de São Paulo. *Informações Econômicas*, 32, 47-54.
- Sciarretta, A., & Trematerra, P. (2011). Spatio-temporal distribution of *Ceratitis capitata* population in a heterogeneous landscape in Central Italy. *Journal of Applied Entomology*, 135, 241–251. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01515.x>.
- Sugayama, R. L., Branco, E. S., Malavasi, A., Kovaleski, A., & Nora, A. (1997). Oviposition behavior of *Anastrepha fraterculus* in apple and diel pattern of activities in an apple orchard in Brazil. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 83, 239-245. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1570-7458.1997.00178.x>.
- Sugayama, R. L., Kovaleski, A., Liedo, P., & Malavasi, A. (1998). Colonization of a new fruit crop by *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in Brazil: a demographic analysis. *Environmental Entomology*, 27, 642–648. <http://dx.doi.org/10.1093/ee/27.3.642>.
- Teixeira, R., Boff, M. I. C., Ribeiro, L. G., & Boff, P. (2015). Bordadura de pomar e flutuação populacional de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) em sistema orgânico de produção de maçã. *Scientia Agraria*, 16, 33-39. <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v16i1.41045>.
- Zucchi, R. A. (2000a). Espécies de *Anastrepha*, sinonímias, plantas hospedeiras e parasitoides. In A. Malavasi, & R. A. Zucchi (Eds.). *Mosca das frutas de importância no Brasil: conhecimento básico e aplicado* (p. 41-48). Ribeirão Preto: Holos Editora.
- Zucchi, R. A. (2000b). Taxonomia. In A. Malavasi, & R. A. Zucchi (Eds.). *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado* (p. 13-24). Ribeirão Preto, Holos Editora.



TABLE 1. Plant species identified as fruit flies hosts (Zucchi, 2000a) in the adjacent forest from four orchards in Porto Amazonas, Paraná, Brazil (Pr = Peach, Di = Persimmon, A1 = Apple1 and A2 = Apple 2 orchards).

Plants scientific names	Pr	Di	A1	A2
• <i>Syagrus romanzoffiana</i>	X	X	X	
• <i>Cucurbita moschata</i> , <i>Wilbrandia longisepala</i> , <i>Passiflora edulis</i>				X
• <i>Passiflora eichleriana</i> , <i>Prunus myrtifolia</i>		X		
• <i>Rubus urticifolius</i> , <i>Physalis angulata</i>	X			
• <i>Rubus sellowii</i> , <i>P. peruviana</i> , <i>Solanum variabile</i>	X			X
• <i>Eriobotrya japonica</i>	X			
• <i>Citrus limon</i> , <i>Citrus</i> sp.	X		X	

TABLE 2. Plant species, not *Anastrepha* spp. hosts, identified in the adjacent forest from four orchards in Porto Amazonas, Paraná, Brazil (Pr = peach, Di = persimmon, A1 = apple1 and A2 = apple 2 orchards).

Non <i>Anastrepha</i> sp. host plants scientific names	Pr	Di	A1	A2
• <i>Bambusa</i> sp., <i>Myrcia pulchra</i>	X	X	X	X
• <i>Hovenia dulcis</i> , <i>Pinus</i> sp.	X	X	X	
• <i>Myrsine umbellata</i> , <i>Rhamnus sphaerosperma</i> , <i>Schinus terebinthifolius</i>	X	X		
• <i>Araucaria angustifolia</i> , <i>Mikania cordifolia</i>	X			X
• <i>Baccharis vulnerari</i> , <i>Casearia decandra</i> , <i>C. lasiophylla</i> , <i>Citronella gongonha</i> , <i>Crotalaria micans</i> , <i>Cyathea corcovadensis</i> , <i>Lithrea molleoides</i> , <i>Miconia cinerascens</i> , <i>Mimosa scabrella</i> , <i>Ocotea puberula</i> , <i>Piper hispidum</i> , <i>Senna neglecta</i> , <i>Solanum megalochiton</i> , <i>S. swartzianum</i> , <i>Thelypteris dentata</i>	X			
• <i>Allophylus edulis</i> , <i>Casearia sylvestris</i> , <i>Critonia morifolia</i> , <i>Erythroxylum ambiguum</i> , <i>Escallonia farinacea</i> , <i>Lithrea molleoides</i> , <i>Mollinedia clavigera</i> , <i>Pavonia sepium</i> , <i>Piper gaudichaudianum</i> , <i>Podocarpus lambertii</i> , <i>Psychotria suterella</i> , <i>Serjania laruotteana</i>		X		
• <i>Matayba guianensis</i> , <i>Myrcine rubra</i> , <i>Cupania vernalis</i>			X	X
• <i>Araujia sericifera</i> , <i>Bernardia pulchella</i> , <i>Bignonia sciuripabula</i> , <i>Cettis iguanacea</i> , <i>Moquiniastrium polymorphum</i> , <i>Myrcia racemos</i> , <i>Solanum diploconos</i> , <i>S. granulosoleprosum</i> , <i>Vassobia breviflora</i> , <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>				X

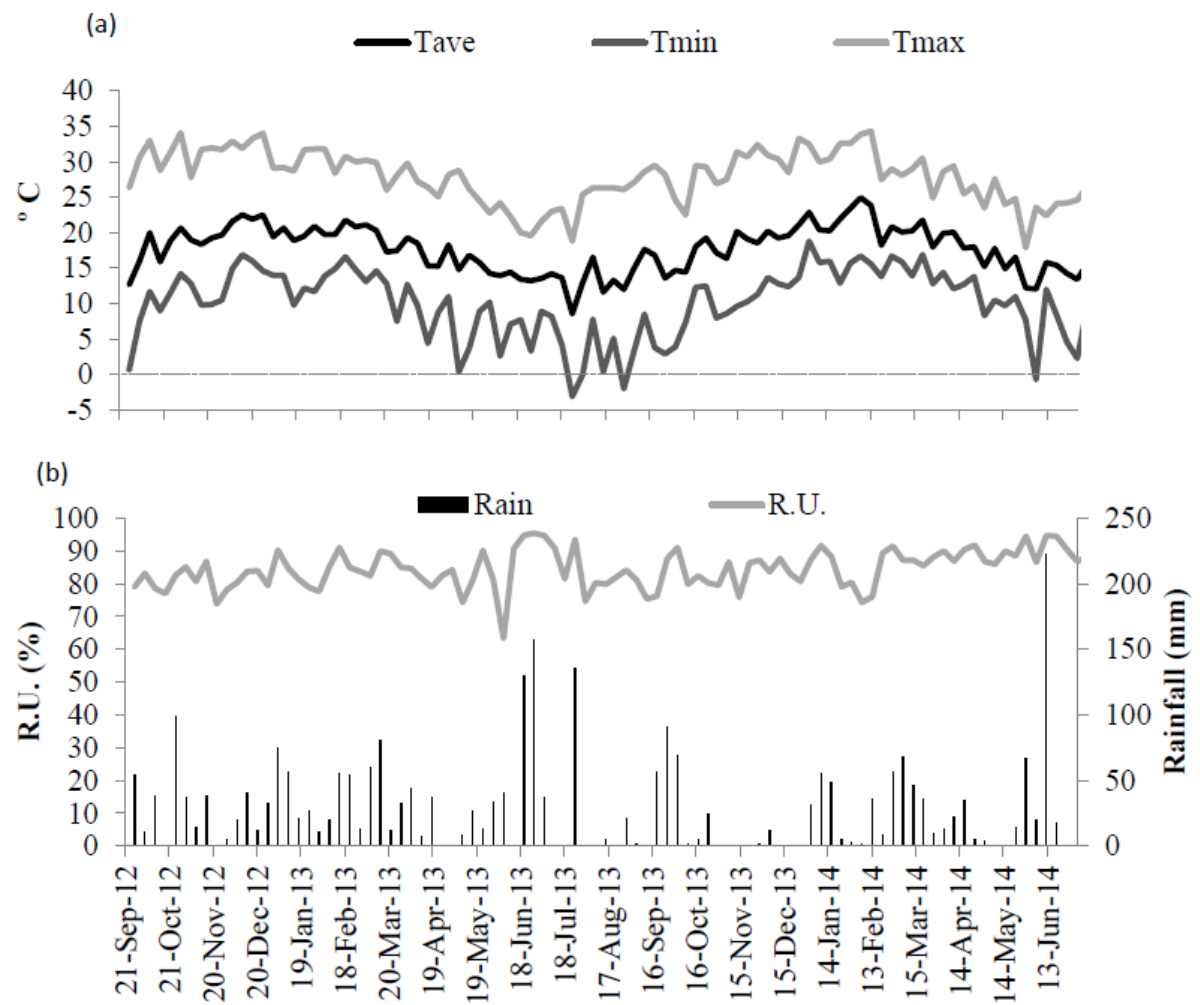


FIGURE 1. (a) Seven-days average (Tave), absolute minimum (Tmin) and maximum (Tmax) air temperature, (b) cumulated rainfall in Porto Amazonas, PR, and relative air humidity (R.U.) in Lapa, from September, 2012, to July, 2014. Source: Simepar.

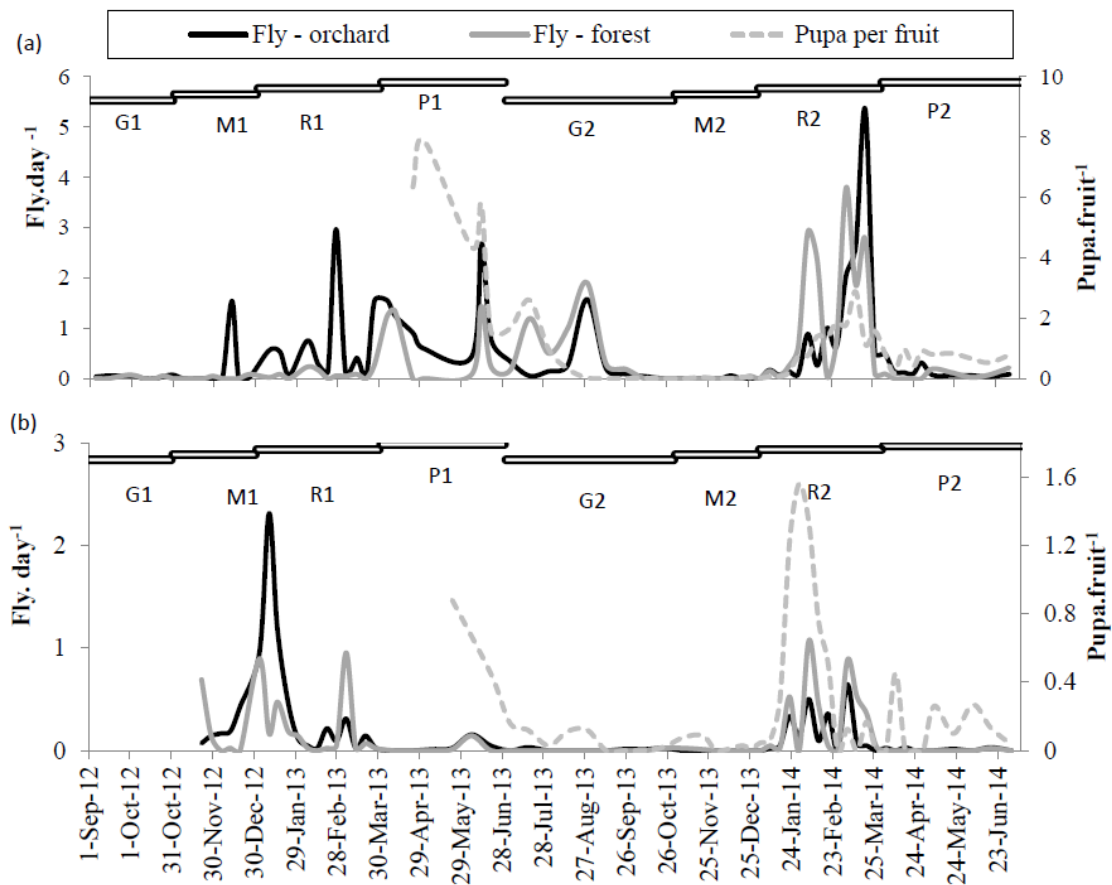


FIGURE 2. Temporal variation on the number of the fruit fly *A. fraterculus* trapped in McPhail traps, inside the orchard or in the adjacent forest, and number of Diptera pupae recovered per apple fruit in two orchards (a = apple 1 and b = apple 2) in Porto Amazonas, PR, Brazil. Double lines mark phenological phases (G=fruit growth; M=fruit maturation; R=ripe; P=post-harvest; 1 and 2 are the crops).

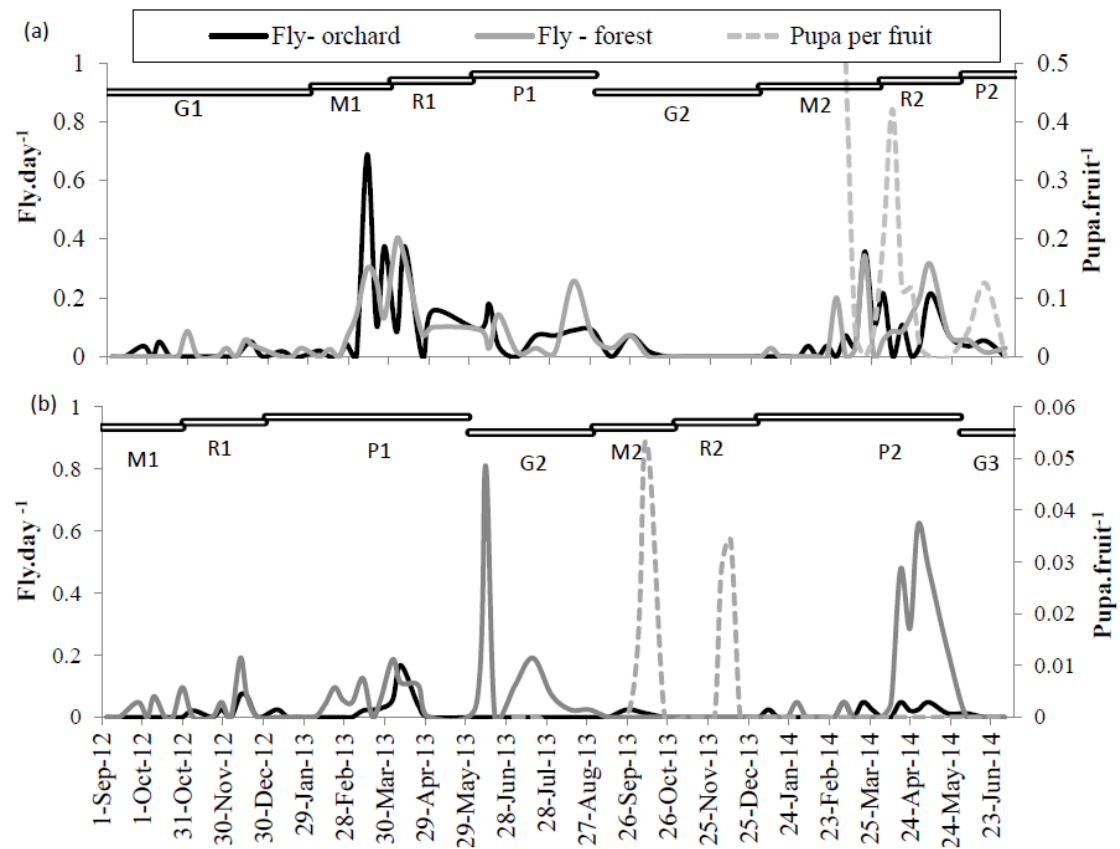


FIGURE 3. Temporal variation on the number of the fruit fly *A. fraterculus* trapped in McPhail traps inside the orchard of persimmon (a) and peach (b) or in its adjacent forest, number of Diptera pupae recovered per fruit in Porto Amazonas, PR, Brazil. Double lines mark phenological phases (G=fruit growth; M=fruit maturation; R=ripe; P=post-harvest; 1, 2 and 3 are the crops).

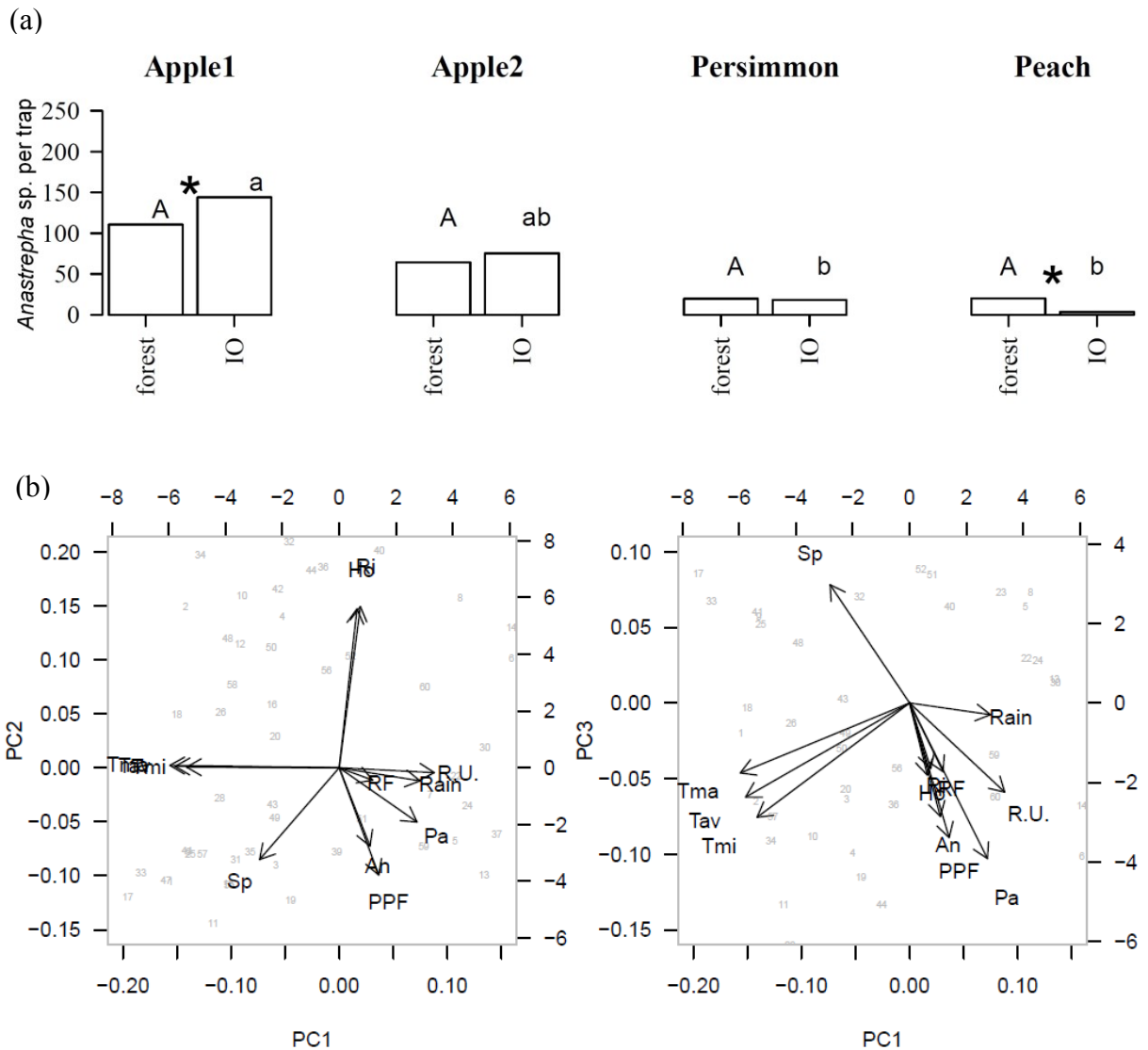


FIGURE 4. (a) Number of *A. fraterculus* captured inside-orchard (IO) and in adjacent forest of four orchards in Porto Amazonas, PR (2012-2014). For each orchard, asterisk (\*) denotes significant difference between forest and inside-orchard (IO). “IO” bars with equal tiny letters did not differ, as well as “forest” bars with equal capital letters (T test,  $p < 0.05$ ). Data transformed (Box-Cox,  $\lambda = -0.1$ ); (b) Biplots for the principal components (PC) 1 versus 2 and 1 versus 3 explaining the variance of the variables number of *A. fraterculus* hosts (Ho), parasitoids (Pa), *A. fraterculus* (An), ripe fruit (RF) insecticide sprays (Sp), floristic richness (Ri), pupa per fruit (PPF), pluvial precipitation (Rain), [average (Tav), minimum (Tmi) and maximum (Tma) air temperature], and relative humidity (R.U.). Grouping is explained in the attachments 3 and 4.

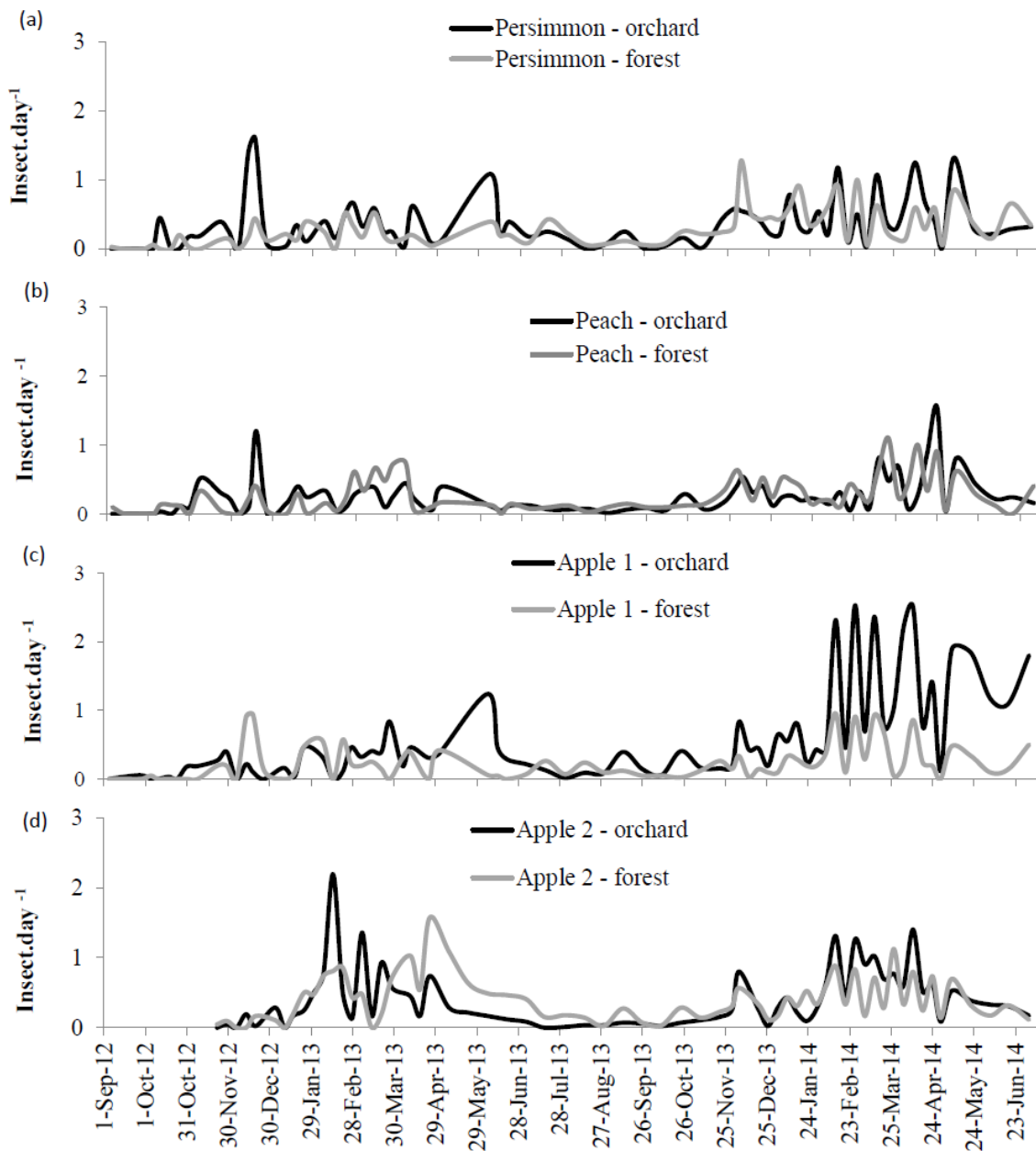


FIGURE 5. Temporal variation in the number of parasitoid insects trapped in McPhail traps in persimmon (a), peach (b) and two apple (c and d) orchards (inside the orchard and in the adjacent forest) of in Porto Amazonas, PR, Brazil.

## **4. CAPÍTULO II. ISOLATION OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES IN AN APPLE ORCHARD IN SOUTHERN BRAZIL AND ITS VIRULENCE TO *Anastrepha fraterculus* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) LARVAE, UNDER LABORATORY CONDITIONS**

### **4.1. Abstract**

Entomopathogenic nematodes (EPNs) are a promising alternative to integrated control in many fruit pests. Few studies were made on the relationship of *Anastrepha fraterculus* natural population with native EPNs population and other biotic and abiotic factors. The aim of this work was to verify the occurrence of endemic nematodes in an apple orchard, concerning environmental conditions and technical procedure, and access isolates virulence to *A. fraterculus* larvae. The experiment was conducted during a year taking monthly soil samples from an apple orchard, with and without fallen fruits just above the soil. Samples were baited with *Tenebrio molitor* and *A. fraterculus* larvae in laboratory. Canopy and fallen fruits were sampled to access the pest infestation. Seventy three EPN isolates were captured, in 23.2% soil samples, more with *T. molitor* than with *A. fraterculus* baits. From the 20 isolates tested against *A. fraterculus*, only five were pathogenic, and they were identified as *Oscheius* sp. The nematodes were captured during all seasons in a similar frequency. Soil and weather conditions, presence of fruit over the orchard soil, and *A. fraterculus* pupae in the fruits had no significant influence on the capture. As a conclusion, nematodes of the genera *Oscheius* are found in an apple orchard of Porto Amazonas constantly along the year, independently of fluctuations in *A. fraterculus* population, climate conditions and presence of fruit over the soil. Some of the isolates are pathogenic to *A. fraterculus*.

## **ISOLAMENTO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM POMAR DE MACIEIRA NO SUL DO BRASIL E VIRULÊNCIA EM LARVAS DE *Anastrepha fraterculus* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

### **4.2. Resumo**

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são alternativa promissora para o controle integrado de várias pragas de frutíferas. Foram feitos poucos estudos ecológicos sobre a relação de populações naturais de *Anastrepha fraterculus* com a de NEPs nativos e outros fatores bióticos e abióticos. O objetivo desse trabalho foi verificar a ocorrência de nematoides endêmicos de um pomar de macieira, considerando condições ambientais e procedimentos técnicos, e testar a virulência de isolados para larvas de *A. fraterculus*. O experimento foi



conduzido durante um ano coletando mensalmente amostras de solo de um pomar de macieira com e sem frutos acima do solo. Foram feitas armadilhas com larvas de *Tenebrio molitor* e de *A. fraterculus* em laboratório. Frutos na copa e caídos no solo foram amostrados para quantificar a infestação da praga. Setenta e três isolados de NEPs foram capturados em 23,2% das amostras de solo, mais em armadilhas de *T. molitor* do que em *A. fraterculus*. Dos 20 isolados testados contra *A. fraterculus*, apenas cinco foram patogênicos, e eles foram identificados como *Oscheius* sp. Os nematoides foram capturados durante todas as estações e em frequência similar. Condições edáficas e climáticas, presença do fruto acima do solo amostrado e de pupas de *A. fraterculus* nos frutos não tiveram influência significativa na captura. Como conclusão, nematoides do gênero *Oscheius* ocorrem em pomar de macieira de Porto Amazonas de forma constante ao longo do ano, independentemente de flutuações na população de *A. fraterculus*, condições climáticas e presença de fruto sobre a superfície do solo. Alguns isolados são patogênicos para *A. fraterculus*.

### 4.3. Introduction

South-American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae), has a wide distribution in America and can be found in almost all parts of South America. In southern Brazil, the species domains and can harm at least 67 hosts, including the exotic ones like apple (*Malus domestica* Borkh.) (Zucchi, 2000a). In laboratory condition, the adult can survive six months and the female is able to lay more than 400 eggs during lifetime (Salles, 2000). The larvae feed on fruit pulp and induce its earlier ripening and falling (Souza-Filho et al., 2009). On soil, late third-instar larva leaves the fruit and turns to pupa nearby into the soil. Last larval instar and pupal phase takes 15 days at 25 °C (Salles, 2000) and this is the suitable time for many soil biocontrollers to infect *A. fraterculus* (Rodrigues-Trentini, 1996).

Entomopathogenic nematodes (EPNs) are having promising results on biological control and are an alternative measure for many soil pests control (Stock, 2005). There are three different genus mostly known as EPNs: *Steinernema*, *Heterorhabditis* and *Neosteinernema*. They are entomopathogenic bacteria vectors (Poinar-Junior, 1990). More recently the genus *Oscheius* was discovered as EPN (Torres-Barragan et al., 2011). There are few studies on demonstrating *Oscheius* contribution to biological control, since most species of this genus have facultative-parasite habit (Ye et al., 2011). *Oscheius* sp. have symbiotic relationship with entomopathogenic bacteria, caring them not inside its body like obligate EPNs do, but in its body surface. When bacteria are present, *Oscheius* sp. are able to infect and kill insect species (Torres-Barragan et al., 2011), but they were not reported infecting *A.*

*fraterculus* yet. In this work, for convenience, all isolated are called EPN, including *Oscheius*. EPNs have been studied as biocontroler candidates of several fruit flies species (Lezama-Gutiérrez et al., 2006; Barbosa-Negrisoni et al., 2009; Rohde et al., 2012; Toledo et al., 2014). However, few studies at orchard condition were found in the literature and even less works reporting EPNs natural occurrence. In a Florida citrus orchard, the increase on EPN population was correlated only with soil temperature (Beavers et al., 1983). McGraw and Koppenhöfer (2009) found a positive correlation between the increase of native EPNs population and the host *Listronotus maculicollis* Kirby (Coleoptera: Curculionidae) in turfgrass.

The aim of this work was to verify the occurrence of isolate endemic entomopathogenic nematodes strains, characterize their seasonality and relation with biotic and abiotic factors in an apple orchard of Porto Amazonas, PR, Brazil, and select strains capable of infect and kill *A. fraterculus* in laboratory conditions.

#### 4.4. Material and Methods

##### 4.4.1. Orchard soil samples and EPN capture

An apple orchard (cultivar Eva), in Porto Amazonas, Paraná, Brazil (25°32'08"S 49°54'52"W, 865-m high, climate Cfb - Köppen) divided in six 100-m<sup>2</sup> sectors was sampled. Samples were taken away and under fallen apples, following Voss et al. (2009). From July 7 to September 19, 2013 (dates at Figure 1A), two sectors were sampled (total of 18 samples each date). From October 17, 2013, to August 8, 2014, all six sectors were sampled (total of 24 samples each date). In laboratory, 25 ± 2 °C and natural photophase and relative humidity, samples were baited with five late-instar *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) in a 500-mL plastic pot (Voss et al., 2009), and alternative baits were made with *A. fraterculus* larvae in smaller pots (50-mL, because *A. fraterculus* is less mobile) sealed with parafilm. Dead insects with EPN symptoms were placed in White traps, kept at 24 ± 1 °C, dark and 70 ± 10% relative humidity (Voss et al, 2009). The infective (dauer larvae) juveniles (IJ) were recovered every two days, purified and placed in tissue culture bottles. Isolates were tested for entomopathogenicity, and multiplied, in late-instar *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera:

Pyralidae) as Rio and Cameron (2000). The isolates were identified by a numeric code following the soil sample order. EPN stock samples were kept at 15 °C (Barbosa-Negrisoni et al., 2009).

#### 4.4.2 Monitoring environmental condition and *Anastrepha sp.* population

Data on temperature in Lapa County (closer available data) and rainfall in Porto Amazonas were provided by Simepar (Sistema Meteorológico do Paraná, Brazil) (Figure 2). Physical and chemical soil characteristics were accessed for each sector by specialized laboratories. The soil is a Haplic Cambisol, loam in four orchard sectors (42.25% sand, 24.25% clay, 33.25% silt, 4.78% O.M., 450.9 mg/dm<sup>3</sup> K, 71.28 mg/dm<sup>3</sup> P, 2.92 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup> Mg, 13.13 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup> Ca, 6.38 pH) and sandy loam in the other two sectors (45.5% sand, 12.5% clay, 42% silt, 4.5% O.M., 435.6 mg/dm<sup>3</sup> K, 194.3 mg/dm<sup>3</sup> P, 2.6 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup> Mg, 16 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup> Ca, 6.6 pH).

The relationship of the proportion of EPN-positive samples with clay, sand and organic matter soil content, precipitation cumulated and mean air temperature two until six days before sampling, was analyzed through Spearman correlation.

*Anastrepha fraterculus* population fluctuation was determined by monitoring fruit fly apple infestation. Fruit samples were collected from July 11, 2013 to July 03, 2014. Samples from each sector were composed by twenty fruits (from four plants of a row) every week during harvest season and six fruit (from three plants) biweekly after and before harvest. Fallen fruit were sampled the same way when available. In laboratory, fruit were laid on vermiculite according to Nascimento et al. (2000). Pupae were placed in Petri dishes with filter paper and moist with distilled water until fly emergency. Two days after emergency, flies were registered and stored in ethanol 70% to identification (Nascimento et al., 2000; Zucchi, 2000b; Marsaro Júnior et al., 2012).

The relationship of the proportion of EPN-positive samples with *A. fraterculus* pupae was analyzed through Spearman correlation. The proportions of EPN-positive samples in the subsets with and without fruit upon the sample site were compared by chi-square tests. The software BIOESTAT 5.0 was used to both tests (Ayres et al., 2007). Additionally, data on EPN capture were split by season and the proportion on EPN-positive samples was compared through a chi-square test (Campbell et al., 1995).

#### 4.4.3. Virulence to *A. fraterculus*

An *A. fraterculus* population from Cena (Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba – Brazil), was reared following Walder et al. (2014) to obtain late third-instar larvae. They were used in an experiment completely random designed, with five repetitions composed by a nine-centimeter Petri dishes (Rohde et al., 2012) with 12 larvae, in a dark climatic chamber ( $24 \pm 2$  °C, U.R.  $70 \pm 10\%$  ). Twenty nematode isolates from Porto Amazonas apple orchard, pathogenic to *G. mellonella*, were tested split in three trials, each one including a negative control (distilled water) and a positive control with *S. carpocapsae* CB 02 (provided by Instituto Biológico de Campinas), multiplied as in Voss et al. (2009). The IJ concentration was determined by counting 20-microliter drops with five replicates, using an optical microscope (Voss et al., 2009). Each larva (except in water control) was treated with 100 IJ (Barbosa-Negrisoni et al., 2009) suspended in 0.6 mL distilled water. The number of flies emerged was registered twenty five days after inoculation. Dead insects were dissected under amplification for confirmation of infection by nematode (Barbosa-Negrisoni et al., 2009). The control efficiency in each plot (including the control ones) was calculated according to Abbott (1925). Data were square-root transformed to reach normality and submitted to analysis of variance and Tukey test using R 3.02 (R Development Core Team, 2008).

#### 4.4.4. Isolates identification

Five isolates were selected based on its virulence to *A. fraterculus* and sent to identification by Dr. Tesfamariam Mengistu at Florida University. DNA was extracted from five first generation female nematodes from each isolate placed in 1.5-mL Eppendorf tubes each containing 20 µl 0.25 M NaOH and incubated at 25 °C overnight (Floyd et al., 2002). Thereafter, samples were incubated at 99 °C for three minutes and allowed to cool to room temperature, and then 4 µl 0.25 M HCl, 10 µl 0.5 M Tris-HCl, (pH 8.0), and 5 µl 2% Triton X-100 were added to each tube. Samples were vortexed, spun down, incubated at 99 °C for three minutes, cooled to room temperature, and stored at  $-20$  °C until further use. ITS-rRNA gene was amplified using the ITS primers TW81 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3')

and AB28 (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') (Subbotin et al., 2001) by PCR in an Applied Biosystems 2720 Thermocycler (MJ Research, Waltham, MA, USA). The PCR conditions were: denaturation at 94 °C for five minutes; followed by 35 cycles of 94 °C for one minute, 52 °C for one minute, and 72 °C for one minute; and a final extension at 72 °C for 10 minutes. Eight microliters of the amplification product was electrophoresed on a 1.8% agarose gel and stained with ethidium bromide.

The sizes of amplified products were determined by comparison with a 1 kb molecular weight ladder (Invitrogen). For direct sequencing, PCR products were purified with the QIA quick PCR purification kit (Qiagen) and sequenced. DNA sequences were compared to sequences from the GenBank National Centre for Biotechnology Information (NCBI) using BLAST search with standard algorithm parameters (NCBI, 2015).

## 4.5. Results

### 4.5.1. EPN capture

Seventy eight pathogenic isolates were captured from a total of 315 soil samples. Seventy three samples were positive for EPN (23.2%), because some samples were positive in both the trap types. The baits with *T. molitor* captured more EPNs than the ones with *A. fraterculus* (Chi-square test,  $p < 0.05$ ) (Figure 1A). EPNs were captured in 63% *T. molitor* baits against 15% with *A. fraterculus*.

EPN-positive samples without fruit over the soil were 21% of the total against 25.7% with some fruit (Figure 1B). The difference was not significant (Chi-square test,  $p = 0.39$ ). Furthermore, there was no significant correlation between the number of *A. fraterculus* pupae in the fruits of the sector and the proportion of positive samples ( $r = 0.52$ ;  $p = 0.09$ ) (Figure 1C). Ninety one percent of the pupae emerged from fruits gave rise to *Anastrepha* sp. and, among them, all females were *A. fraterculus*. In the same way, the proportion of EPN-positive samples among the year seasons was not significantly different (Chi-square test,  $p = 0.36$ ), besides the differences in air temperature which fell during winter to 16-12 °C (Figure 2A).

The correlation between cumulated rainfall two to six days before sampling and the proportion of EPN-positive samples was not significant ( $r = -0.01$ ;  $p = 0.96$ ). Some rain

happened in the six days preceding soil collection in almost all evaluations (Figure 2B). No rain occurred before the sampling in November 2013 and August 2014 and EPNs were captured as well.

There was no correlation between sand or clay content and proportion of EPN positive samples ( $r= 0.26$ ,  $p= 0.62$  and  $r= -0.8$ ,  $p= 0.10$ , respectively). In the same way, no correlation was observed between soil organic matter content and the proportion of EPN positive sample ( $r= -0.39$ ,  $p= 0.27$ ).

#### 4.5.2. Isolates identification and virulence against *A. fraterculus*

Among 20 isolates tested, native from Porto Amazonas apple orchard soil, five caused significantly higher mortality of *A. fraterculus* larvae than the control without nematode: 158, 222, 288, 304 and 319 (Figure 3). Isolates 304 and 319 scored virulence of 73 and 71%, respectively (Figure 3B). For the other three pathogenic isolates, *A. fraterculus* mortality ranged from 33 to 54%, also differing from the control (Figure 3A and 3C). Among the five pathogenic isolates, two (158 and 288) had significantly worse results on attacking *A. fraterculus* larvae than *S. carpocapsae* CB 02, which killed all the larvae exposed.

DNA amplification for the five isolates pathogenic to *A. fraterculus* with the primers TW81 and AB28 produced sequences ranging from 802 to 820 base pairs. When compared to the gene bank, the isolate 222 showed 88% identity with *Oscheius* sp. isolate TEL-2014 (accession number KM492926.1) and 85% with *Oscheius* sp. isolate MCB (accession number KF684370.1) (Table 1). All the other isolates showed higher identity (98%) with *Oscheius* sp. isolate MCB (accession number KF684370.1), with null e-values (Table 1).

## 4.6. Discussion

*T. molitor* baits captured significantly more EPN than *A. fraterculus* ones. This difference is probably due to the bigger soil volume in *T. molitor* baits. Besides, *T. molitor* moves inside the soil, which made the infection more likely. The proportion of EPN-positive samples obtained was considered low, when compared with other works using *G. mellonella*

as bait: samples with nematodes reached 50% (Rio and Cameron, 2000); Campbell et al. (1995) found nematode-positive soil samples between 25 and 38%. Besides the possible difference in EPN density in the soils, for most EPNs *G. mellonella* is better than *T. molitor* because of its higher susceptibility and body size (Boff et al., 2000), what can explain at least partially the lower frequency observed here.

The presence of a fallen fruit over the soil was expected to increase arthropods abundance nearby, because of fruit fly larvae and pupae came from the fruit (Salles, 2000) and other insect species that feeds on the decomposing fruit are stimulated. These arthropods are possible hosts for EPNs. So, it was expected an increase in EPN capture when soil samples is taken underneath a fallen apple, but it was not observed here (Figure 1B), despite fruit infestation by *A. fraterculus* (Figure 1C). This trial didn't regard the total host range in the apple orchard, so the nematodes could have other suitable host or food source, even because *A. fraterculus* is not present during the entire year. Furthermore, a great number of arthropods live in orchards and are possible nematode hosts during all seasons, regardless fallen fruit (Glazer et al., 1996).

EPN-positive samples were not different across year seasons. Temperatures between 16-10 °C as observed in Porto Amazonas during winter usually reduces EPN efficacy (Klein, 1990; Mejia-Torres and Sáenz, 2013). However, winter temperatures seemed to be high enough to assure nematode capture during the entire year, even because samples were kept at 25 °C in the laboratory, what favored the infection. The homogeneous occurrence of EPNs along the year corroborates Campbell et al. (1995) findings on *Heterorhabditis* sp. constancy during all seasons, and Puza and Mracek (2005) on *Steinernema affine* (Gerdin and Beddind). The capture of EPNs over different seasons, and recoveries in the same area during and after winter, indicates its population is well established.

Soil moisture is one of the most critical factors on nematodes movement and survival (Kaya, 1990), as observed in a *Citrus* sp. grove where higher humidity close to the roots was responsible by higher number of EPN-positive soil samples (Glazer et al., 1996). However, in the present work there was no correlation between rainfall and the proportion of samples with EPN captured, probably because sample soil humidity was corrected in laboratory (Voss et al., 2009), so this influence could have been diminished. It's prudent to have in mind that between-work differences could be related to the species considered. However, results for *Oscheius* sp. are still few or inexistent.

Different textures of soil didn't affect the capture of nematodes. It was expected that sandy soil could have more EPNs captured, especially because of the pore sizes that enhance

nematode efficiency (Kaya, 1990). Hoy et al. (2008) observed that *Rhabditis* sp. bacteria feeders were found in most vegetable cultivated soil, beside the differences in sand content from 29.7 to 49.1%. In the same way, organic matter was not an important factor in EPN capture. Organic matter richer soils have more microorganism activity, which means more food sources for facultative EPNs like *Oscheius*. Bacterial activity in the soil correlated positively with number of the facultative-EPN *Rhabditis* sp. collected (Hoy et al., 2008). The soil collected in this trial was rich in organic matter (3.8 - 5%) what can be enough to ensure good microorganism activity.

Five isolates from this trial were found to be close related to two accessions of *Oscheius* sp. (MCB and TEL-2014). Besides other accessions were found to be more identical to isolate 222, e-values for TEL-2014 and MCB pairing were lower (0.0), because the query cover was higher. The smaller the e-value, the higher the chance of matches not to be random, but due to relativeness. The accession MCB was already supported as entomopathogenic (Serepa and Gray, 2014). The isolate *Oscheius* sp. TEL-2014 was collected in a loam sandy soil on *G. mellonella* baits in South Africa (NCBI, 2015).

In South America, some *Oscheius* species [*Oscheius colombiana* and *Rhabditis (Oscheius) pheropsophi* n. sp.] were already found associated with insect in Colombia and southeast Brazil, respectively (Smart and Nguyen, 1994; Stock et al., 2005). However, it is possible that the captured isolates are new species since there is no report of this genus in south Brazil. The identification of these new facultative insect-parasitic nematodes is important since they can be natural pest enemies, and also can help on equilibrating soil insect populations. Further studies are necessary on the species-level identification, morphometric characteristics, associated bacteria identification and the relationship between them, involving biotic and abiotic factors.

It was observed differences in virulence to *A. fraterculus* between 304 and 297 as well as 319 and 297 (Figure 3B). Assuming the isolates are the same species (if not, it would explain the differences), the difference in virulence can be explained by the kind and amount of bacteria each isolate carries. In *Oscheius* sp., the association between nematode and bacteria is symbiotic, not mutualistic as in *Heterorhabditis* and *Steinernema* genera. Although the associated bacterium was not studied in this work, it is known that *Oscheius*-associated bacterium doesn't live inside its body, but on its surface (Torres-Barragan et al., 2011). Four different bacteria species were associated with *Rhabditis (Oscheius) blumi* Sabhaus. Only two were pathogenic to *G. mellonella* and with different virulence (Park et al., 2011). So, it is likely to be similar in the isolates captured here. Still, *Oscheius* sp. isolates



which were less virulent to *A. fraterculus* can have other suitable food source at field since they have facultative-parasitic behavior.

It was expected that EPNs captured in the orchard would be more virulent to the same orchard pest *A. fraterculus* than *S. carpocapsae* CB 02, which was collected in Florida (USA). However, it didn't happen. Similar observation was already reported in other insects (Grewal et al., 2002). Rodrigues-Trentini (1996) also found high virulence of *S. carpocapsae* to *A. fraterculus* larvae. *S. carpocapsae* is an obligate parasite, with a wide range of hosts, and needs to be highly effective to survive, while *Oscheius* sp., as explained above, can feed in sources other than live insects.

As a conclusion, nematodes of the genera *Oscheius* are found in an apple orchard of Porto Amazonas, PR, Brazil. Some of them are pathogenic to *Anastrepha fraterculus*. Facultative EPNs population is constant along the year in the orchard, independently of fluctuations in *A. fraterculus* population, air temperature, pluvial precipitation and presence of fruit over the soil surface.

#### **4.7. Acknowledgements**

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq). We thank Edson Chappuis by the help with the insect rearing, Maria de Lourdes Zamboni Costa, from CENA, and Luis Garrigós Leite, from Instituto Biológico de Campinas, by the provision of biological material.

#### **4.8. References**

- ABBOTT, WS., 1925. A method of computing effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, vol. 18, no. 2, p. 265-267.
- AYRES, M., AYRES JR., M., AYRES, DL. and SANTOS, AAS., 2007. *Bioestat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas*. Versão 5.0. Belém, PA: Sociedade Civil Mamirauá. 324 p.

- BARBOSA-NEGRISOLI, CRC., GARCIA, MS., DOLINSKI, C., NEGRISOLI-JUNIOR, AS., BERNARDI, D. and NAVA, DE., 2009. Efficacy of indigenous entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae), from Rio Grande do Sul, Brazil, against *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in peach orchards. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 102, no. 1, p. 6-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.05.005>.
- BEAVERS, JB., MCCOY, CW. and KAPLAN, DT., 1983. Natural enemies of subterranean *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) larvae in Florida. *Environment Entomology*, vol. 12, p. 840-843.
- BOFF, MIC., WIEGERS, GL. and SMITS, PH., 2000. Influences of host size and host species on the infectivity and development of *Heterorhabditis megidis* (strain NLH-E87.3). *BioControl*, vol. 45, no. 4, p. 469-482.
- CAMPBELL, JF., LEWIS, E., YODER, F., GAUGLER, R., 1995. Entomopathogenic nematode (Heterorhabditidae and Steinernematitidae) seasonal population dynamics and impact on insect populations in turfgrass. *Biological Control*, vol. 5. no. 4, p. 598-606. <http://dx.doi.org/10.1006/bcon.1995.1071>.
- FLOYD, R., ABEBE, E., PAPERT, A., BLAXTER, M., 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology*, vol. 11, no. 4, p. 839-850.
- GLAZER, I., KOZODOI, E., SALAME L. and NESTEL, D., 1996. Spatial and temporal occurrence of natural populations of *Heterorhabditis* spp. (Nematoda: Rhabditida) in a semiarid region. *Biological Control*, vol. 6, no. 1, p. 130-136.
- GREWAL, PS., GREWAL, S.K., MALIK, VS. and KLEIN, MG., 2002. Differences in susceptibility of introduced and native white grub species to entomopathogenic nematodes from various geographic localities. *Biological Control*, vol. 24, no. 3, p. 230-237. [http://dx.doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00025-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00025-7).
- HOY, CW., GREWAL, PS., LAWRENCE, JL., JAGDALE, G. and ACOSTA, N., 2008. Canonical correspondence analysis demonstrates unique soil conditions for entomopathogenic nematode species compared with other free-living nematode species. *Biological Control*, vol. 46, no. 3, p. 371-379. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.06.001>.
- KAYA, HK., 1990. Soil ecology. In GAUGLER, R. and KAYA, HK. (Eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 93-116.
- KLEIN, MG., 1990. Efficacy against soil-inhabiting insect pests. In GAUGLER, R. and KAYA, HK. (Eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 195-211.
- LEZAMA-GUTIÉRREZ, R., MOLINA-OCHOA, J., PESCADOR-RUBIO, A., GALINDO-VELASCO, E., ÁNGEL-SAHAGÚN, CA., MICHEL-ACEVES, AC. and GONZÁLEZ-REYES, E., 2006. Efficacy of Steinernematid nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) on the suppression of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae in soil of differing textures: laboratory and field trials. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, vol. 23, no. 1, p. 41-49.

MARSARO JÚNIOR, AL., DEUS, EG., RONCHI-TELES, B., ADAIME, R. and SILVA JÚNIOR, RJ., 2013. Species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) captured in a guava orchard (*Psidium guajava* L., Myrtaceae) in Boa Vista, Roraima, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, vol. 73, no. 4, p. 879-886. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-698420130004000026>.

MCGRAW, A. and KOPPENHÖFER, AM., 2009. Population dynamics and interactions between endemic entomopathogenic nematodes and annual bluegrass weevil populations in golf course turfgrass. *Applied Soil Ecology*, vol. 41, no. 1, p. 77-89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.09.002>.

MEJIA-TORRES, MC. and SÁENZ, A., 2013. Ecological characterisation of the Colombian entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* sp. SL0708. *Brazilian Journal of Biology*, vol. 73, no. 2, p. 239-243. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842013000200003>.

NASCIMENTO, AS., CARVALHO, RS. and MALAVASI, A., 2000. Monitoramento populacional. In MALAVASI, A. and ZUCCHI, RA. (Eds.). *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*. Ribeirão Preto: Holos Editora. p. 110-112.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. *BLAST: basic local alignment search tool*. 2015. Available from: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch). Accessed in: Feb 02 2015.

PARK, HW., KIM, YO., HA, J., YOUN, SH., KIM, HH., BILGRAMI, AL. and SHIN, CS., 2011. Effects of associated bacteria on the pathogenicity and reproduction of the insect-parasitic nematode *Rhabditis blumi* (Nematoda: Rhabditida). *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 57, no. 9, p. 750–758. <http://dx.doi.org/10.1139/W11-067>.

POINAR-JUNIOR, GO., 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In GAUGLER, R. and KAYA, HK. (Eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 23-61.

PUZA, F. and MRACEK, Z., 2005. Seasonal dynamics of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* as a response to abiotic factors and abundance of insect hosts. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 89, no. 2, p. 116–122. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2005.04.001>.

R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013. *R: A language and environment for statistical computing*. 2013. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2008. Online. Available from: <http://www.R-project.org>. Accessed in: Nov 20 2014.

RIO, RVM. and CAMERON, EA., 2000. *Heterorhabditis bacteriophora*: seasonal dynamics and distribution in a stand of sugar maple, *Acer saccharum*. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 75, no. 1, p. 36-40. <http://dx.doi.org/10.1006/jipa.1999.4887>.

RODRIGUES-TRENTINI, F., 1996. Mecanismos de defesa e controle de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) expostas a nematoides

entomopatogenicos. Curitiba, Universidade Federal do Paraná. 73 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas.

ROHDE, C.R., MOINO-JUNIOR, A., CARVALHO, FD. and SILVA, MAT., 2012. Selection of entomopathogenic nematodes for the control of the fruit fly *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, vol. 7, suppl., p. 797-802. <http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v7isa2217>.

SALLES, LA., 2000. Biologia e ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus* (Wied.). In MALAVASI, A. and ZUCCHI, RA. (Eds.). *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*. Ribeirão Preto: Holos Editora. p. 81-91.

SEREPÁ, MH. and GRAY, VM., 2014. Draft whole-genome sequence of *Serratia marcescens* strain MCB, associated with *Oscheius* sp. MCB (Nematoda: Rhabditidae) isolated from South Africa. *Genome Announcements*, vol. 2, no. 5, p. 911-914. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00911-14>.

SMART, GC. and NGUYEN, KB., 1994. *Rhabditis (Oscheius) pheropsophi* n. sp. (Rhabditida: Rhabditidae). *Journal of Nematology*, vol. 22, no. 1, p. 19-24.

SOUZA-FILHO, MF., RAGA, A., AZEVEDO-FILHO, JA., STRIKIS, PC., GUIMARÃES, JA. and ZUCCHI, RA, 2009. Diversity and seasonality of fruit flies (Diptera: Tephritidae and Lonchaeidae) and their parasitoids (Hymenoptera: Braconidae and Figitidae) in orchards of guava, loquat and peach. *Brazilian Journal of Biology*, vol. 69, no.1, p. 31-40. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842009000100004>.

STOCK, SP., CAICEDO, AM. and CALATAYUD, PA., 2005. *Rhabditis (Oscheius) colombiana* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae), a necromenic associate of the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* (Hemiptera: Cydnidae) from the Cauca Valley, Colombia. *Nematology*, vol. 7, no. 3, p. 363-373. <http://dx.doi.org/10.1163/156854105774355590>.

STOCK, SP., 2005. Insect-parasitic nematodes: from lab curiosities to model organisms. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 89, no. 5, p. 57-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2005.02.011>.

SUBBOTIN, SA., VIERSTRAETE, A., DE-LEY, P., ROWE, J., WAEYENBERGE, L., MOENS, M. and VANFLETEREN, JR., 2001. Phylogenetic relationships within the cyst-forming nematodes (Nematoda: Heteroderidae) based on analysis of sequences from the ITS regions of ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 21, no. 1, p. 1-16. <http://dx.doi.org/10.1006/mpev.2001.0998>.

TOLEDO, J., SÁNCHEZ, JE., WILLIAMS, T., GÓMEZ, A., MONTOYA, P. and IBARRA, JE., 2014. Effect of soil moisture on the persistence and efficacy of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) against *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae. *Florida Entomologist*, vol. 97, no. 2, p. 528-533. <http://dx.doi.org/10.1653/024.097.0225>.

TORRES-BARRAGAN, A., SUAZOB, A., BUHLERC, WG. and CARDOZA, YJ., 2011. Studies on the entomopathogenicity and bacterial associates of the nematode *Oscheius carolinensis*. *Biological Control*, vol. 59, no. 2, p. 123-129.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.05.020>.

VOSS, M., ANDALÓ, V., NEGRISOLI-JUNIOR, AS. and BARBOSA-NEGRISOLI, CR., 2009. *Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematoides entomopatogênicos*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 44 p. Available from: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/853176>>. Accessed in: May 21 2013.

WALDER, JMM., MORELLI, R., COSTA, KZ., FAGGIONI, KM., SANCHES, PA., PARANHOS, BAJ., BENTO, JMS. and COSTA, MLZ., 2014. Large scale artificial rearing of *Anastrepha* sp.1 aff. *fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in Brazil. *Scientia Agricola*, vol. 71, no. 4, p. 281-286. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2013-233>.

YE, A., TORRES-BARRAGAN, A. and CARDOZA, YJ., 2011. *Oscheius carolinensis* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae), a potential entomopathogenic nematode from vermicompost. *Nematology*, vol. 12, no. 1, p. 121-13. <http://dx.doi.org/10.1163/156854109X458464>.

ZUCCHI, R., 2000a. Espécies de *Anastrepha*, sinonímias, plantas hospedeiras e parasitoides. In MALAVASI, A. and ZUCCHI, RA. (Eds.). *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*. Ribeirão Preto: Holos Editora. p. 41-48.

ZUCCHI, R., 2000b. Taxonomia. In MALAVASI, A. and ZUCCHI, RA. (Eds.). *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*. Ribeirão Preto: Holos Editora. p. 13-24.

TABLE 1. Scores of identity (%) and e-values (e) output in the comparisons of DNA sequences of eight accessions available at NCBI nucleotide data bank (NCBI, 2015) with sequences found in five nematode isolates from Porto Amazonas, PR.

Accession <sup>1</sup>	Porto Amazonas' isolates									
	158		222		288		304		319	
	%	e	%	e	%	e	%	e	%	e
KF684370.1	98	0.0	85	0.0	98	0.0	98	0.0	98	0.0
KM492926.1	84	0.0	88	0.0	84	0.0	84	0.0	84	0.0
KF500235.1	85	1e <sup>-100</sup>	89	3e <sup>-92</sup>	85	1e <sup>-100</sup>	85	1e <sup>-100</sup>	85	1e <sup>-100</sup>
EF503690.1	85	2e <sup>-99</sup>	89	3e <sup>-92</sup>	85	2e <sup>-99</sup>	85	2e <sup>-99</sup>	85	2e <sup>-99</sup>
EU273598.1	85	7e <sup>-98</sup>	89	1e <sup>-90</sup>	85	7e <sup>-98</sup>	85	7e <sup>-98</sup>	85	8e <sup>-98</sup>
JQ002565.1	85	3e <sup>-96</sup>	89	1e <sup>-90</sup>	85	3e <sup>-96</sup>	85	3e <sup>-96</sup>	85	4e <sup>-96</sup>
FJ547241.1	89	4e <sup>-66</sup>	90	1e <sup>-70</sup>	89	4e <sup>-66</sup>	89	4e <sup>-66</sup>	89	4e <sup>-66</sup>
AM398825.1	81	8e <sup>-53</sup>	87	8e <sup>-53</sup>	81	8e <sup>-53</sup>	81	8e <sup>-53</sup>	81	8e <sup>-53</sup>

<sup>1</sup>KF684370.1| *Oscheius* sp. MCB; KM492926.1| *Oscheius* sp. TEL-2014; KF500235.1| *Heterorhabditoides chongmingensis* isolate FUMN101; EF503690.1| *Heterorhabditoides chongmingensis*; EU273598.1| *Rhabditis* sp. Tumian-2007; JQ002565.1| *Heterorhabditoides* sp. RG081015; FJ547241.1| *Oscheius carolinensis*; AM398825.1| *Pellioditis mediterranea*.

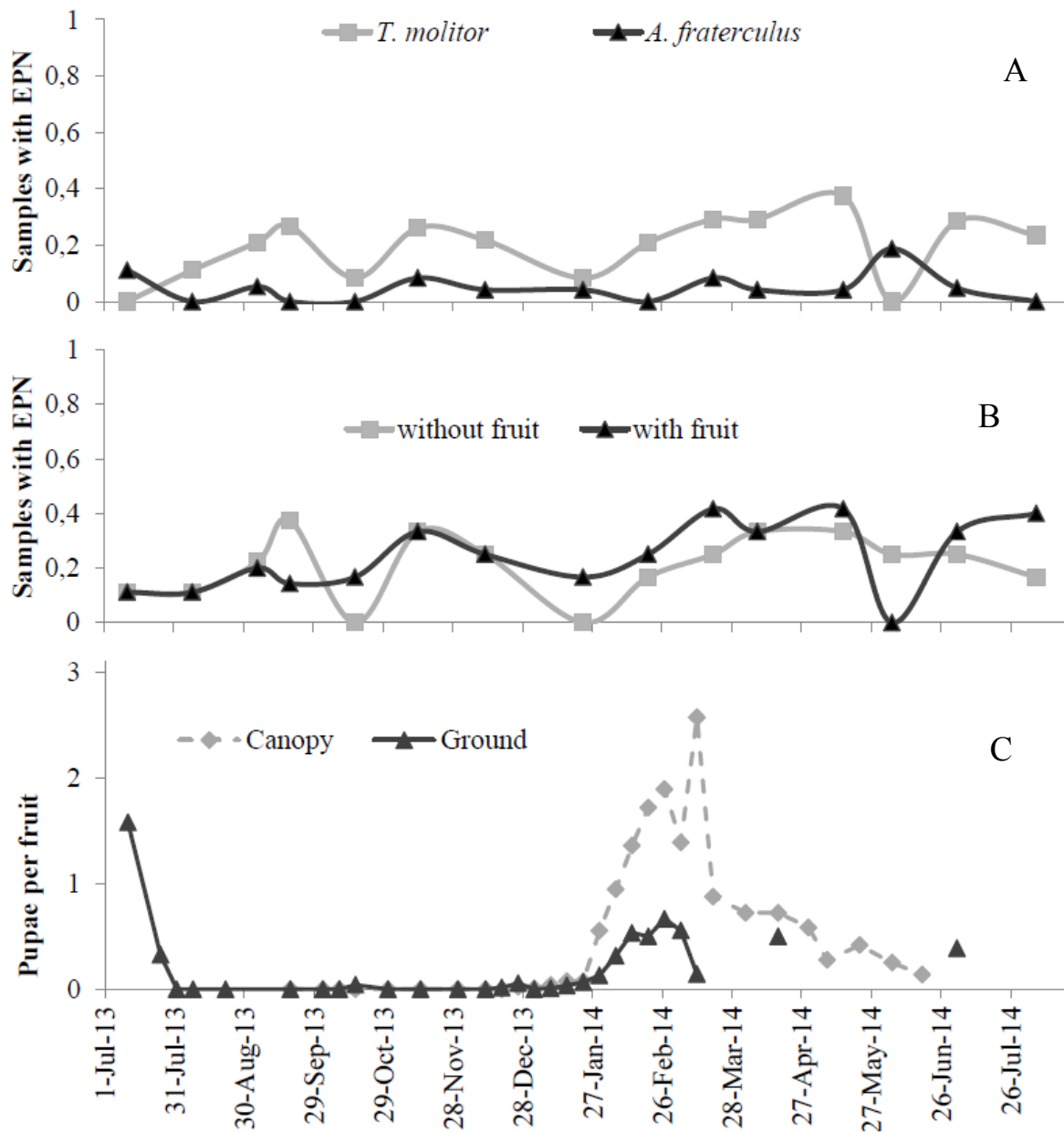


FIGURE 1. Relative frequency of EPNs-positive soil samples when the bait was *T. molitor* or *A. fraterculus* larvae (A), and when samples were collected without or with an apple over the soil (B). In chart C the number of *Anastrepha* sp. pupae obtained from apples collected in the canopies or orchard ground. Time is about one 'Eva' apple production cycle in Porto Amazonas, PR.

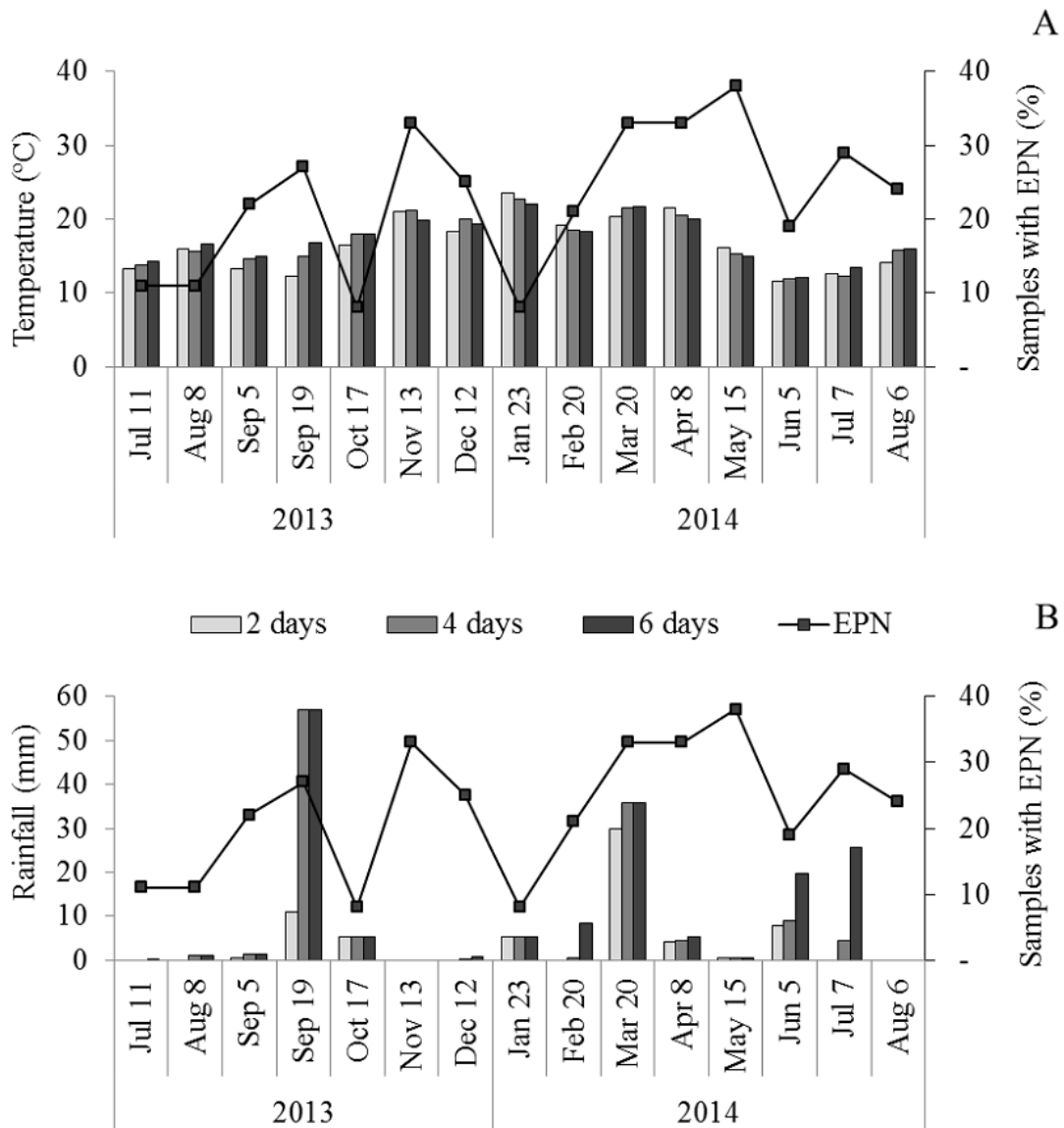


FIGURE 2. Mean air temperature measured in Lapa- PR (A) and rainfall cumulated in Porto Amazonas- PR (B), 2, 4 and 6 days before soil sampling (sampling day included) from Jul 11, 2013 to Aug 6, 2014, and percentage of samples with entomopathogenic nematode (EPN) captured (right axis) in soil from an apple orchard in in Porto Amazonas. Weather data provided by Simepar.



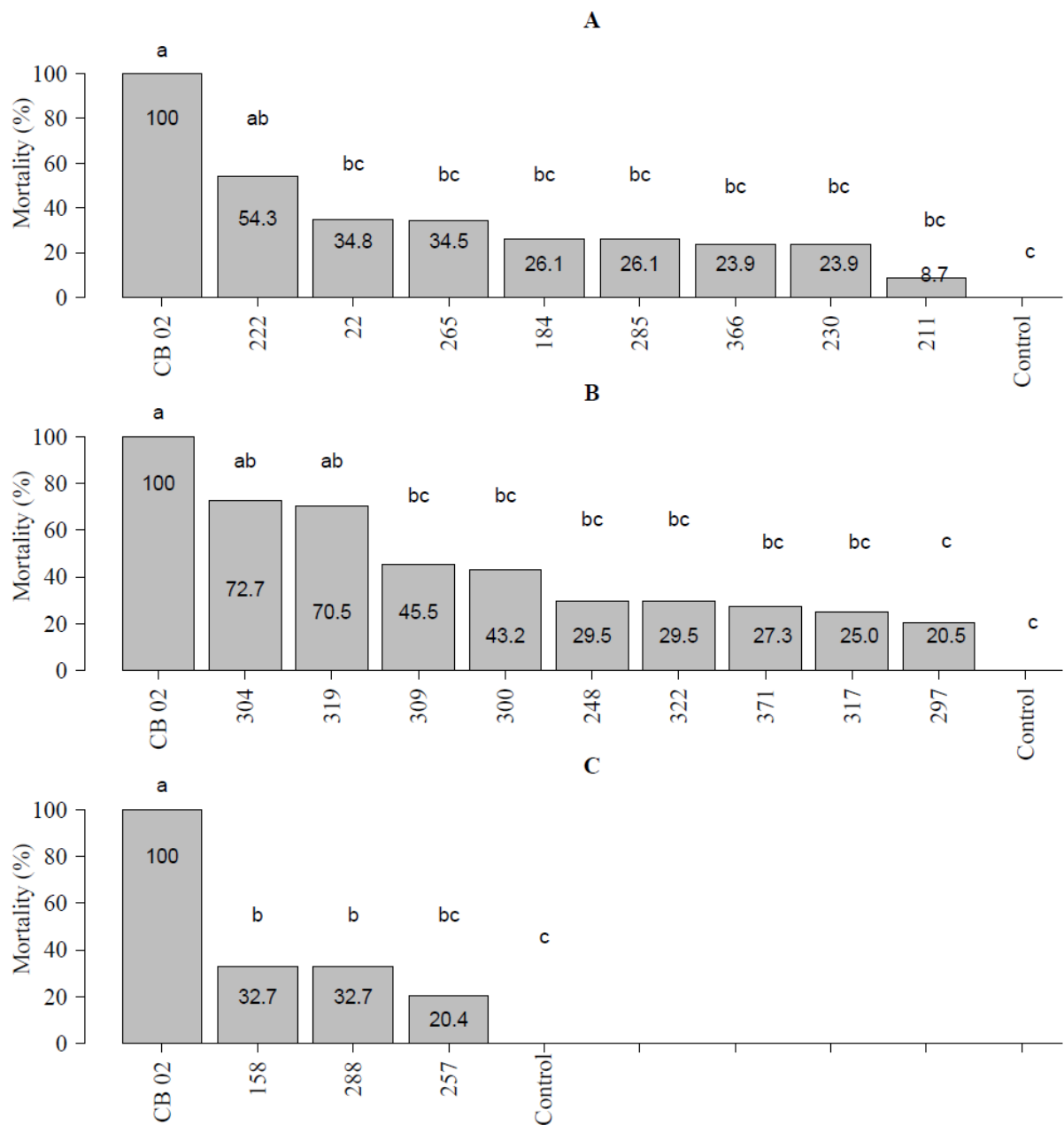


FIGURE 3. Mortality of *Anastrepha fraterculus* larvae corrected according to Abbott (1925) following inoculation of different nematode strains isolated from soil in Porto Amazonas, PR, and *Steinernema carpocapsae* CB 02, in three trials performed in Petri dishes ( $100 \text{ IJ larva}^{-1}$ ) (A, B and C). Mortality was transformed by square root for statistical analysis, resulting in coefficient of variation 9.58, 8.75 and 6.26 for A, B and C, respectively; columns with the same letter above are not different (Tukey test,  $\alpha=0.05$ ).

## 5. CAPÍTULO III. VIRULENCE OF NEMATODES AGAINST LARVAE OF THE SOUTH-AMERICAN FRUIT FLY IN LABORATORY USING SOIL FROM PORTO AMAZONAS, PARANÁ, BRAZIL, AS SUBSTRATE

### 5.1. Abstract

*Anastrepha fraterculus* is an important orchard pest. Its management has been based in chemical sprays, but biological control is a growing demand. The objective of this work was to evaluate, under laboratory conditions, the virulence of eight nematode isolates to *A. fraterculus* in a soil collected in Porto Amazonas, Paraná, Brazil, and to estimate lethal doses (LD<sub>50</sub> and LD<sub>90</sub>) for the more virulent isolate. *Steinernema carpocapsae* CB 02, three *Heterorhabditis* sp., two *H. amazonensis* and two *Oscheius* sp. isolates were tested in laboratory against *A. fraterculus* third-instar larvae using as substrate a loam Cambisol collected in an apple orchard. *S. carpocapsae* CB 02 isolate caused the higher percent mortality of *A. fraterculus*. *Heterorhabditis* sp. isolates and LAMIP 9 (*Oscheius* sp.) isolates were intermediate, while LAMIP 92 (*Oscheius* sp.) didn't differ from the control. *S. carpocapsae* CB 02 is able to kill 50% and 90% of *A. fraterculus* population with 96.3 and 314.7 infective juveniles per larva, respectively, in that soil. As a conclusion, CB 02 is the most virulent to *A. fraterculus* when the substrate is Porto Amazonas' apple orchard soil and it is able to kill 50 and 90% larval population with 96.3 and 314.7 infective juveniles per larva, respectively.

**Key words:** *Steinernema carpocapsae*; *Heterorhabditis*; *Oscheius*; *Anastrepha fraterculus*.

## VIRULÊNCIA DE NEMATOIDES CONTRA LARVAS DE MOSCA-DAS-FRUTAS-SULAMERICANA EM LABORATÓRIO UTILIZANDO SOLO DE PORTO AMAZONAS, PARANÁ, BRASIL, COMO SUBSTRATO

### 5.2. Resumo

*Anastrepha fraterculus* é uma importante praga em pomares. Seu manejo tem se baseado no uso de inseticidas químicos, porém, o controle biológico é uma demanda crescente. O objetivo do trabalho foi avaliar, em condições laboratoriais, a virulência de oito isolados de nematoides contra *A. fraterculus* em um solo coletado em Porto Amazonas, Paraná, Brasil, e estimar a dose letal do nematoide mais virulento. *Steinernema carpocapsae* CB 02, três isolados de *Heterorhabditis* sp., dois de *H. amazonensis* e dois de *Oscheius* sp.

foram testados em laboratório contra larvas de terceiro instar de *A. fraterculus* usando como substrato um Cambissolo franco coletado em um pomar de macieira. *S. carpocapsae* CB 02 provocou maior percentual de mortalidade de *A. fraterculus*. Isolados do gênero *Heterorhabditis* sp. e o LAMIP 9 (*Oscheius* sp.) foram intermediários, enquanto o LAMIP 92 (*Oscheius* sp.) não diferiu da testemunha. *S. carpocapsae* CB 02 é capaz de matar 50% e 90% da população de larvas de *A. fraterculus* com 96,3 e 314,7 juvenis infectivos por larva, respectivamente, naquele solo. Como conclusão, CB 02 é o mais virulento à *A. fraterculus* quando o substrato é solo de pomar de macieira de Porto Amazonas, e ele é capaz de controlar 50% e 90% da população de larvas com 96,3 e 314,7 juvenis infectivos por larva, respectivamente.

**Palavras-chave:** *Steinernema carpocapsae*; *Heterorhabditis*; *Oscheius*; *Anastrepha fraterculus*.

### 5.3. Introduction

Apple [*Malus domestica* (Borkhausen)] is one of the most important fruit crop in Southern Brazil. In Paraná State, Porto Amazonas and Lapa counties are responsible for about 30% of apple production (IBGE, 2015). The South-American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) is an apple and peach key pest in Southern Brazil and harms fruits by feeding and ovipositing on fruit (MONTEIRO & HICKEL, 2004). The extensive use of chemicals to control the pest has brought many environmental threats and human contamination. It has given rise to new researches on alternative control methods. Chemical-free or low-residue fruit are nowadays a demand. Biological control is an alternative measure, which includes the use of nematodes, since *Anastrepha* spp. have stages of larva and pupa in the soil (MONTEIRO & HICKEL, 2004).

There are already some studies on the main entomopathogenic nematode (EPN) genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* as fruit flies biocontrolers. LEZAMA-GUTIÉRREZ et al. (2006) and TOLEDO et al. (2014) studied EPNs against *A. ludens* Loew; TOLEDO et al. (2005), in *A. obliqua* (Macquart); and TOLEDO et al. (2006) in *A. serpentina* (Wied). BARBOSA-NEGRISOLI et al. (2009) and RODRIGUES-TRENTINI (1996) tested the virulence of some EPNs against *A. fraterculus*, using sterile substrates. *Oscheius* genus contains species recently found to be facultative entomopathogenic nematodes (FEPNs): *O. carolinensis* (TORRES-BARRAGAN et al., 2011), *O. chongmingensis* (LIU et al., 2012) and *O. gingeri* (PERVEZ et al., 2014), but they were not reported infecting *A. fraterculus*, yet.

Few studies about EPNs and FEPNs against *A. fraterculus* were made under soil influence. Soil characteristics as organic matter content, moisture, texture and biotic antagonists can affect nematode action (KAYA, 1990; LEZAMA-GUTIÉRREZ et al., 2006). Therefore, trials in sterile substrate like sand or Petri dishes with paper can estimate the potential efficiency of EPNs, but trials in not sterilized soil reflects more closely the answer at field conditions for that specific soil (VOSS et al., 2009).

Thus, the objective of this work was to evaluate the virulence of nematode isolates of the genera *Steinernema*, *Heterorhabditis* and *Oscheius* to *A. fraterculus* larvae and estimate lethal doses for the more efficient nematode, having as substrate a loam Haplic Cambisol from an apple orchard of Porto Amazonas (Paraná State, Brazil), in laboratory condition.

#### 5.4. Material and methods

*A. fraterculus* utilized in the trial were obtained from laboratory rearing from the CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura), São Paulo - Brazil, started eight years before in Piracicaba, SP. The insects were reared according to WALDER et al. (2014).

Five *Heterorhabditis* sp. isolates were obtained from UENP (Universidade Estadual do Norte do Paraná) and from IB (Instituto Biológico), and also one *Steinernema carpocapsae* from IB (Table 1). Two *Oscheius* sp. strains were isolated in Porto Amazonas (-25°32'07", -49°54'41"), Paraná State, BR, by the authors, from a loam soil of an apple orchard, and identified by genetic markers at Florida University (unpublished results). After the initial purification, all the nematodes were inoculated on late-instar *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvae and maintained in culture tissue bottles, with sponge, at 15 °C (VOSS et al., 2009).

Eight nematode isolates (Table 1) were experimented against *A. fraterculus* late third-instar larvae in a completely random design with ten repetitions (two sets of five repetitions at different times). Each plot consisted of 12 *A. fraterculus* larvae disposed in a 50-mL plastic container with 14.4 g sieved (2 mm) loam Haplic Cambisol from a Porto Amazonas orchard (22% clay, 41% silt, 37% sand, pH 5.9, 255 mg.dm<sup>-3</sup> P, 462 mg.dm<sup>-3</sup> K, 3.8% organic matter, 22% gravimetric moisture), equivalent to 13,04 cm<sup>2</sup> of soil surface. The plastic cup was covered with parafilm to avoid loss of soil moisture. The soil was collected as VOSS et al. (2009) and the samples were tested for EPNs and FEPNs absence by exposing *Tenebrio*

*molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae during 15 days (VOSS et al., 2009). After *A. fraterculus* larvae had reached late third instar, they were removed from the semiliquid diet and mixed to an EPN-free soil for at least 30 minutes before use them in the bioassay, to avoid carrying excess of moisture and diet residues to the experimental plots. Then, 12 larvae were placed on the plots to penetrate the soil by themselves. Those that didn't penetrate the soil after 30 minutes were replaced (VOSS et al., 2009). EPNs infective juveniles (IJ) were obtained from inoculated *G. mellonella* larvae and had less than 20 days since its production. The IJ concentration was determined in 20-microliter EPNs suspension drop with five replicates, with micropipette, using a stereomicroscope, as described by VOSS et al. (2009). After soil larvae penetration, 1,200 IJ (100 IJ larva<sup>-1</sup>) were distributed on the soil surface suspended in 1.2 mL distilled water, after homogenized, using a micropipette. The control plots received only distilled water in same volume. Plots were incubated in a controlled chamber at  $25 \pm 2$  °C, RH  $70 \pm 10\%$  (BARBOSA-NEGRISOLI, 2009).

Seven days later, the soil was sieved and each larva or pupa (since some larvae turned to pupae) was placed in a 1.1-cm<sup>2</sup> well of a tissue culture plate (Kasvi®, model K12-024), with two layers of filter paper. They were observed every two days to recover moisture of the filter paper. Twenty days after inoculation individuals not giving rise to an adult were dissected and observed under stereomicroscope, to verify the presence/absence of EPNs. To access virulence, only insect individuals infected with nematode were counted for the mortality data (LEZAMA-GUTIÉRREZ et al., 2006). The virulence in each plot (including the control ones) was calculated by the equation:  $V = (Y - X)/(1-X)*100$ , where  $V$  is the virulence,  $X$  is the mean mortality in the control and  $Y$  is the mortality observed in each plot (ABBOTT, 1925). Data on mortality of *A. fraterculus* were transformed  $[(y+1)^{0.5}]$  to normalize and submitted to analysis of variance and a Tukey tests using R 3.0.2 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

Lethal doses (LD<sub>50</sub> and LD<sub>90</sub>) were determined for the more virulent isolate, using the previous methodology for nematode inoculum, insect larvae preparation, EPN-free soil, arena dimensions, incubation time, mortality determination and experimental design. The treatments were 0 (control), 75, 150, 225, 300, 375 IJ larva<sup>-1</sup>. Lethal concentrations were estimated submitting the mean corrected mortality for each dose to a Probit regression using PoloPlus 1.0. (ROBERTSON et al., 1980).

## 5.5. Results and discussion

### 5.5.1. *Nematodes virulence against A. fraterculus*

All isolates of nematodes tested were able to infect *A. fraterculus*. Infection rates ranged from 28 to 84.2% among the treated larvae, significantly higher than the control ( $F=19.26$ ;  $p<0.05$ ). Irrespective to the treatment, most of the infected insects (at least 79%) reached pupal phase during the first week after inoculation (Figure 1A). The methodology couldn't define the time of infection: pupal or larval stage. The higher amount of pupae indicates infected insects died slowly and could reach pupal phase before, probably because *A. fraterculus* larva had active defenses against nematode by retarding its development on hemolymph (RODRIGUES-TRENTINI, 1996). However, the insect died anyways.

The virulence of the treatments against *A. fraterculus* in the loam soil is showed in figure 1B. CB 02 had the highest virulence (90.5%). CB 24 and JPM4 reached 47.4 and 45.3% mortality of *A. fraterculus*, respectively. Moreover, Alho, LAMIP 9, RSC 05 and NEPET 11 formed another group with lower virulence, but still different from the control (Figure 1B). However, LAMIP 92 not surpassed the control.

*S. carpocapsae* CB 02 was highly virulent, killing 90.5% of the treated larvae. As a comparison, using an unspecified isolate of *S. carpocapsae*, RODRIGUES-TRENTINI (1996) observed insect mortality lower than 31% using clay loam soil (100 IJ larva<sup>-1</sup>). Five times more IJ larva<sup>-1</sup> were necessary to cause 91.7% mortality. Besides the possible inherent difference in virulence among the two isolates, the higher clay content of the soil can have influenced negatively the infection by the nematodes, especially because clay reduces soil pore size and aeration which hampers host finding by the EPN (KAYA, 1990). The present experiment was performed in a loam soil, with less clay, and probably enhanced CB 02 action. A similar, but sandier soil (sandy loam), was found to be more appropriated than sand, clay loam, and clay soils to *S. carpocapsae* survival and pathogenicity (KUNG & GAUGLER, 1990). Beyond the differences in soil texture, RODRIGUES-TRENTINI (1996) used a bigger soil volume per larva, compared to this work, what caused dilution of the pathogen in the soil. In Petri dishes (best substrate for EPNs), 316 IJ larva<sup>-1</sup> were needed to kill 90% of *A. fraterculus* larvae, what suggest CB 02 is more virulent.

BARBOSA-NEGRISOLI et al. (2009) tested other EPN species, *H. bacteriophora* and *S. riobrave* (100 IJ larva<sup>-1</sup>), against *A. fraterculus* and found 55 and 58% of larvae mortality, respectively, using sterile sand as substrate. These results are better than the virulence of the most part of the EPNs tested in this work. Sand is better than fine-textured soils to general EPNs action (KAYA, 2009), what helps explain the difference. However, the *S. carpocapsae* CB 02 was still more virulent (Figure 1B), even in loam soil.

*Heterorhabditis* sp. isolates performed worse than *S. carpocapsae* in the trials now presented. *Heterorhabditis* differ from *Steinernema* by its searching behavior that helps in the prey finding (KAYA, 1990). *S. carpocapsae* is ambusher, whilst most of the *Heterorhabditis* species are cruisers. However, in the present work, this characteristic could have been not important. The passive dispersal of the nematodes by the water through the soil pore space and the small soil depth could have helped *S. carpocapsae* to spread in the soil. The temperature is another possible explanation, since *Steinernema* genus was observed to be more efficient at 25 °C (temperature of this experiment) while *Heterorhabditis* showed higher efficiency at 30 °C (ROHDE et al., 2010). Furthermore, Steinernematids seems to be more adaptable to different textures of soil than *Heterorhabditis* sp. (KAYA, 1990).

The *Oscheius* sp. isolate LAMIP 9 was able to infect and kill *A. fraterculus* larvae (Figure 1). This pathogenic relationship has not been previously reported. Both *Oscheius* sp. were able to develop and kill *G. melonella*. Some *Oscheius* sp. are known to be facultative parasites like: *O. carolinensis* (TORRES-BARRAGAN et al., 2011); *O. chongmingensis* (LIU et al., 2012); and *O. gingeri* (PERVEZ et al., 2013). Difference between LAMIP 9 and LAMIP 92 virulence, considering they are the same species, can be explained by the amount and kind of bacteria they are associated. An unique *Oscheius* species can carry more than one bacteria species outside its body (TORRES-BARRAGAN et al., 2011), with different virulence.

LAMIP isolates performed as well or worse than other-origin ones. In agreement with this result, GREWAL et al. (2002) found that it was common the EPNs from an insect species to be less virulent than isolates from other insect and/or geographical origin. Specificity seems to be a more important factor in EPN virulence than adaptation to the environment. It's possible that LAMIP isolates facultative parasitic behavior allows them to survive on other suitable food sources than *A. fraterculus*, since this insect is not present in the orchards during the entire year.

### 5.5.2. Lethal doses of CB 02

*S. carpocapsae* CB 02 lethal doses are presented in figure 2. Its virulence rose as the dose of IJ increased until 300 IJ larva<sup>-1</sup>, and reached 92.2%. The lethal doses, LD<sub>50</sub> and LD<sub>90</sub>, of *S. carpocapsae* CB 02 on *A. fraterculus* larvae were estimated to be 96.3 IJ larva<sup>-1</sup> (confidence interval: 80.6 to 110.2 IJ larva<sup>-1</sup>) and 314.7 IJ larva<sup>-1</sup> (confidence interval: 272.7 to 380.9 IJ larva<sup>-1</sup>), respectively ( $\chi^2=2.47$ , heterogeneity=0.82).

RODRIGUES-TRENTINI (1996) estimated the confidence interval of LD<sub>50</sub> for *S. carpocapsae* against *A. fraterculus*, in a loam clay soil, to be 261.5 to 429.0 IJ cm<sup>-2</sup>, similar to LD<sub>90</sub> of the *S. carpocapsae* CB 02. Besides differences of inherent virulence among the isolates tested, the lower LD<sub>50</sub> estimated in this work for *S. carpocapsae* CB 02 can be due to the used substrate. Comparing to other studies (RODRIGUES-TRENTINI, 1996; BARBOSA-NEGRISOLI et al., 2009), the relative low LD of *S. carpocapsae* CB 02 in the loam soil is a suitable characteristic for its possible use as a biocontrollers in the orchard.

Insect mortality usually falls down after EPN concentration over an optimal point because of IJ competition (ROHDE et al., 2012). However, this work did not report decrease in control efficiency of *S. carpocapsae* CB 02 against *A. fraterculus* larvae, corroborating the observation by RODRIGUES-TRENTINI (1996).

## 5.6. Conclusion

All *Heterorhabditis* sp. isolates, *S. carpocapsae* CB 02 and *Oscheius* sp. LAMIP 9 are virulent to *A. fraterculus* larvae when the substrate is Porto Amazonas' apple orchard loam soil. *Oscheius* sp. LAMIP 9 and LAMIP 92 are less effective than EPNs from other origins tested in this trial. CB 02 is the most efficient on *A. fraterculus* control, and it is able to kill 50% and 90% of *A. fraterculus* population with 96.3 and 314.7 infective juveniles per larva, respectively, in that soil.



## 5.7. References

ABBOTT, W.S. A method of computing effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p.265-267, 1925.

BARBOSA-NEGRISOLI, C.R.C. et al. Efficacy of indigenous entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae), from Rio Grande do Sul Brazil, against *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in peach orchards. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.102, p.6-13, 2009. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.05.005>>. Accessed: Jan. 21, 2015. doi: 10.1016/j.jip.2009.05.005.

GREWAL, P.S. et al. Differences in susceptibility of introduced and native white grub species to entomopathogenic nematodes from various geographic localities. **Biological Control**, v.24, p.230-237, 2002. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964402000257>>. Accessed: Feb. 22, 2015. doi: 10.1016/S1049-9644(02)00025-7.

IBGE (2015) **Produção Agrícola Municipal**. Available from: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2013/default\\_perm\\_xls.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2013/default_perm_xls.shtm)>. Online. Accessed: Feb. 02, 2015.

KAYA, H.K. Soil ecology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (Eds.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton, FL: CRC, 1990. Cap.5, p.93-116.

KUNG, S.P.; GAUGLER, R. Soil type and entomopathogenic nematode persistence. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.55, p.401-406, 1990. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002220119090084J#>>. Accessed: Jan. 19, 2015. doi: 10.1016/0022-2011(90)90084-J.

LEZAMA-GUTIÉRREZ, R. et al. Efficacy of Steinernematid nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) on the suppression of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae in soil of differing textures: laboratory and field trials. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, v.23, p.41-49, 2006.

LIU, Q. et al. Re-description of *Oscheius chongmingensis* (Nematoda: Rhabditidae) and its entomopathogenicity. **Nematology**, v.14, p.139-149, 2012. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1163/138855411X580777>>. Accessed: Jan. 12, 2015. doi: 10.1163/138855411X580777.

MONTEIRO, L.B.; HICKEL, E. Pragas de importância econômica em fruteiras de caroço. In.: MONTEIRO, L.B. et al. (Ed.). **Fruteiras de caroço: uma visão ecológica**. Curitiba: Reproset I. 2004. Cap.11, p.223-261.

PERVEZ, R. et al. Penetration and infectivity of entomopathogenic nematodes against *Lema* sp. (Chrysomelidae: Coleoptera) infesting turmeric (*Curcuma longa* L.) and their multiplication. **Journal of Spices and Aromatic Crops**, v.23, p.71-75, 2014. Available from: <<http://www.indianspicesociety.in/josac/index.php/josac/article/view/143/139>>.

Accessed: Feb. 02, 2015.

RODRIGUES-TRENTINI, R.F. **Mecanismos de defesa e controle de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) expostas a nematoides entomopatogênicos.** 1996. 73f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) – Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, PR.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing.** Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2008. Available from: <<http://www.R-project.org>>. Online. Accessed: Nov. 20, 2013.

ROHDE, C.R. et al. Influence of soil temperature and moisture on the infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) against larvae of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**, v.39, p.608-611, 2010. Available from: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-566X2010000400022&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-566X2010000400022&script=sci_arttext)>. Accessed: Jan. 19, 2014. doi: 10.1590/S1519-566X2010000400022.

ROHDE, C.R. et al. Selection of entomopathogenic nematodes for the control of the fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.7, p.797-802. 2012. Available from: <<http://www.redalyc.org/pdf/1190/119025455014.pdf>>. Accessed: Jan. 19, 2014. doi: 10.5039/agraria.v7isa2217.

ROBERTSON, J. et al. **Polo Plus: a user's guide to probit or logit analysis.** Berkeley: Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, 1980. Available from: <[http://www.fs.fed.us/psw/publications/documents/psw\\_gtr038/psw\\_gtr038.pdf](http://www.fs.fed.us/psw/publications/documents/psw_gtr038/psw_gtr038.pdf)>. Online. Accessed: May 15, 2014.

TOLEDO, J. et al. Susceptibilidad de larvas de *Anastrepha obliqua* Macquart (Diptera: Tephritidae) a *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) (Rhabditida: Heterorhabditidae) en condiciones de laboratorio. **Vedalia**, v.12, p.11-21, 2005.

TOLEDO, J. et al. Efficiency of *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae) on *Anastrepha serpentina* (Diptera: Tephritidae) larvae under laboratory conditions. **Florida Entomologist**, v.89, p.524-526, 2006. Available from: <[http://dx.doi.org/10.1653/0015-4040\(2006\)89\[524:EOHBNH\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1653/0015-4040(2006)89[524:EOHBNH]2.0.CO;2)>. Accessed: Jan. 19, 2015.

TOLEDO, J. et al. Effect of soil moisture on the persistence and efficacy of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) against *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) Larvae. **Florida Entomologist**, v.97, p.528-533, 2014. Available from: <<http://www.bioone.org/doi/full/10.1653/024.097.0225>>. Accessed: Jan. 19, 2015. doi: 10.1653/024.097.0225.

TORRES-BARRAGAN, A. et al. Studies on the entomopathogenicity and bacterial associates of the nematode *Oscheius carolinensis*. **Biological Control**, v.59, p.123–129, 2011. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.05.020>>. Accessed: Feb 02, 2015. doi: 10.1016/j.biocontrol.2011.05.020.

VOSS, M. et al. **Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e**

**caracterização de nematoides entomopatogênicos.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. 44p. Available from: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/853176>>. Online. Accessed: May 21, 2013.

WALDER, J.M.M. et al. Large scale artificial rearing of *Anastrepha* sp.1 aff. *fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 71, p.281-286, 2014. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2013-233>>. Accessed: Jan. 19, 2015. doi: 10.1590/0103-9016-2013-233.

TABLE 1. Specie, source and origin of the entomopathogenic nematode isolates used in the experiment against *A. fraterculus* larvae.

Identification code	Specie	Source	Origin
Alho	<i>Heterorhabditis</i> sp.	UENP <sup>1</sup>	Minas Gerais, BR
CB 02	<i>Steinernema carpocapsae</i>	Instituto Biológico <sup>2</sup>	Florida, USA
CB 24	<i>H. amazonensis</i>	Instituto Biológico <sup>2</sup>	São Paulo, BR
RSC 05	<i>H. amazonensis</i>	UENP <sup>1</sup>	Amazonas, BR
JPM4	<i>Heterorhabditis</i> sp.	UENP <sup>1</sup>	Minas Gerais, BR
NEPET 11	<i>Heterorhabditis</i> sp.	UENP <sup>1</sup>	Rio Grande do Sul, BR
LAMIP 9	<i>Oscheius</i> sp.	UFPR <sup>3</sup>	Paraná, BR
LAMIP 92	<i>Oscheius</i> sp.	UFPR <sup>3</sup>	Paraná, BR

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Norte do Paraná, Cornélio Procópio, PR, Brazil, kindly provided by Professor Viviane Sandra Alves. <sup>2</sup>Instituto Biológico (Campinas, SP, Brazil), kindly provided by Dr. Luis Garrigós Leite; <sup>3</sup>Universidade Federal do Paraná - Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LAMIP).

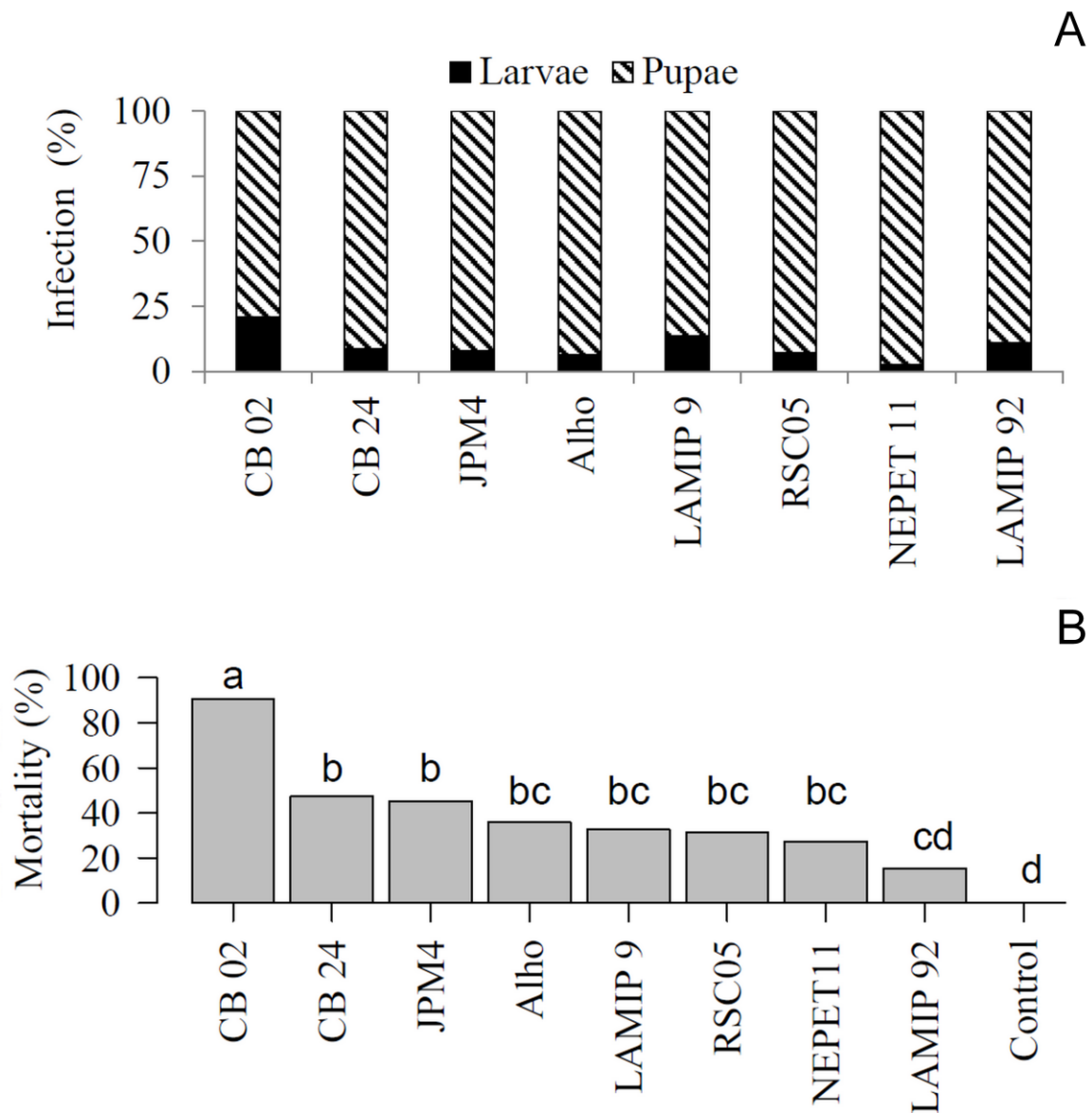


FIGURE 1. (A) Percentage of *A. fraterculus* deaths occurred at larval or pupal phase following infection by entomopathogenic nematode isolates. (B) Mortality caused by entomopathogenic nematodes isolates ( $100 \text{ IJ larva}^{-1}$ ) on *A. fraterculus* corrected according to ABBOTT (1925). In B, statistical analysis was performed in transformed data [ $y'=(y+1)^{0.5}$ ], and columns with the same letter do not differ (Tukey test,  $\alpha=0.05$ ). All data were obtained in a loam soil from an apple orchard of Porto Amazonas, PR, under laboratory condition ( $25 \pm 2$  °C, RH  $70 \pm 10\%$ ).

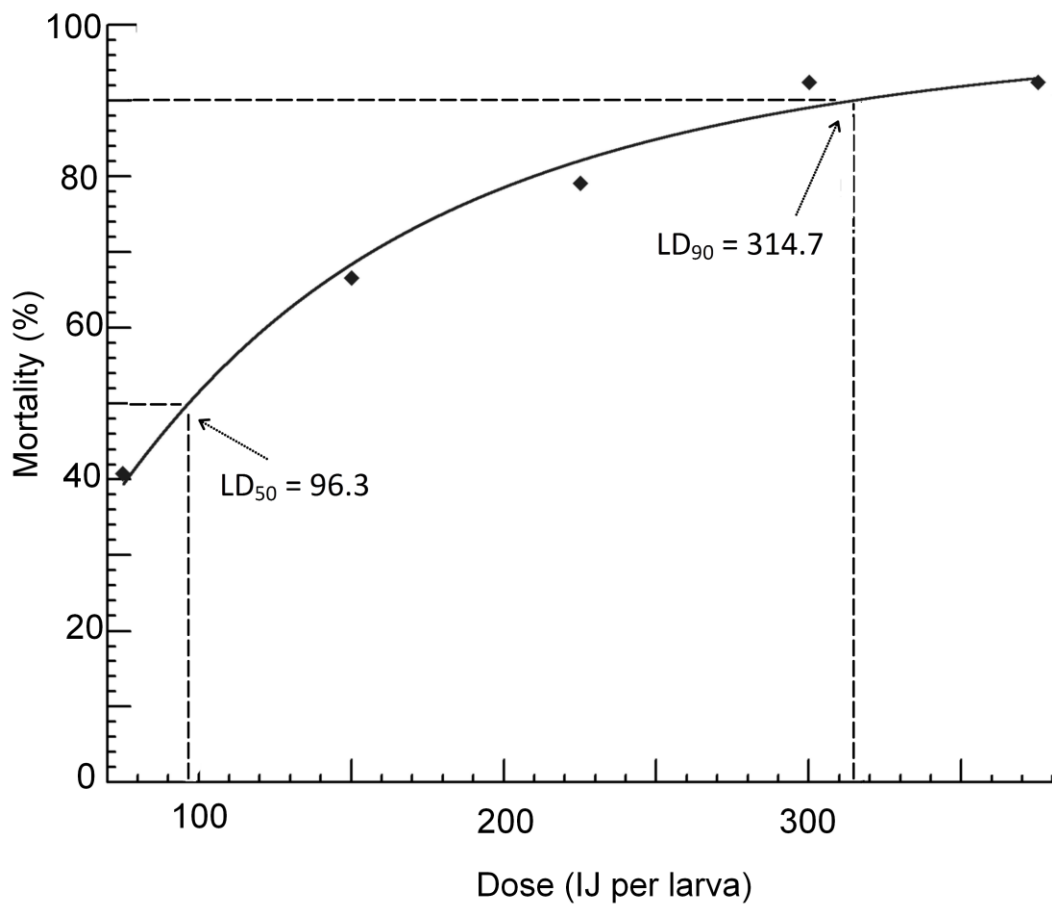


FIGURE 2. Probit regression (dark line) for observed mortality [corrected according ABBOTT (1925)] of the fruit fly *A. fraterculus* following increasing doses of *S. carpocapsae* CB 02, in a loam soil of an apple orchard of Porto Amazonas (PR, Brazil) as substrate, at laboratory condition. LD<sub>50</sub> and LD<sub>90</sub> are indicated by dash lines.

## 6. CAPÍTULO IV. EFICIÊNCIA A CAMPO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS CONTRA A MOSCA-DA-FRUTA-SULAMERICANA EM POMAR DE MACIEIRA

### 6.1. Resumo

*Anastrepha fraterculus* é uma praga chave de pomares de maçã. Formas de controle alternativos são uma demanda em busca da substituição aos agrotóxicos. O controle biológico com nematoides entomopatogênicos (NEPs) pode ser uma alternativa. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a eficiência de controle de dois isolados de NEPs contra *A. fraterculus* em um pomar de macieira. O experimento foi realizado em blocos ao acaso com dez repetições. Cada parcela era constituída por um cilindro de PVC de 20 cm de altura, cravado 10 cm no solo, onde 60 larvas de *A. fraterculus* de 3º instar foram liberadas. Os tratamentos foram: *Steinernema carpocapsae* CB 02, *Heterorhabditis amazonensis* CB 24, CB 02 + CB 24 e controle. A mortalidade observada com CB 02 e CB 02 + CB 24 foi de 86,5 e 90,8%, respectivamente. Suas médias não diferiram significativamente entre si, mas foram maiores do que as do CB 24 e do controle. Porém, os resultados foram inconclusivos devido à alta mortalidade da testemunha.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Anastrepha fraterculus*; controle biológico; *Heterorhabditis*; *Steinernema*.

## FIELD EFFICIENCY OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES AGAINST SOUTH-AMERICAN FRUIT FLY IN APPLE ORCHARD

### 6.2. Abstract

*Anastrepha fraterculus* is among the key pests in apple orchards. Alternative control measures have been demanded for replace chemicals sprays. The biological control with entomopathogenic nematodes (EPN) can be an alternative tool. The aim of this work was to evaluate the field control efficiency of two EPN isolates against *A. fraterculus* in apple orchard. The experiment was performed in a randomized block design with ten repetitions. Each plot was a PVC cylinder, where 60 third-instar *A. fraterculus* larvae were released. The treatments were: *Steinernema carpocapsae* CB 02, *Heterorhabditis amazonensis* CB 24, CB 02 + CB 24, and control. In CB 02 and CB 02 + CB 24, the observed mortalities were 86.5 and 90.8%, respectively. Their means did not differ significantly from each other, but they were higher than CB 24 and the control (70.6% and 68.1%, respectively). However, the results were inconclusive due to high mortality in the control.

**KEY-WORDS:** *Anastrepha fraterculus*; biological control; *Heterorhabditis*; *Steinernema*.

### 6.3. Introdução

A maçã (*Malus domestica* Borkh) é uma das frutas mais consumidas mundialmente, inclusive no Brasil (PETRI E LEITE, 2011). O Estado do Paraná é o terceiro maior produtor brasileiro da fruta, concentrando 3,9% do total produzido em 2013 (IBGE, 2015). Dentre os municípios produtores, Porto Amazonas foi responsável por 14,74% da produção estadual no ano de 2013 e sua produção está em ascensão (IBGE, 2015). Tanto a produção integrada de frutos (PIF) quanto à produção orgânica vem crescendo em todo o Brasil (CANESIN, 2011). Para a maçã isso não é diferente, principalmente pela exigência do mercado externo por produtos cada vez mais sustentáveis (PETRI E LEITE, 2011; FERREIRA et al., 2012).

Problemas de ordem fitossanitária são responsáveis por grande parte das perdas de produção tanto orgânica quanto de PIF (BRANCO et al., 200). Entre as pragas, *Anastrepha fraterculus* (Wied.) é considerada uma das mais importantes (MALAVASI et al., 2000). Na macieira, os danos iniciam-se em frutos verdes com a inserção do ovipositor pela fêmea, causando deformações posteriores nos frutos. Porém, os frutos somente se tornam propícios para o desenvolvimento das larvas quando estão em maturação (SUGAYAMA et al., 1997). O controle químico ainda é a forma mais usada para o controle da praga (MONTEIRO; HICKEL, 2004); porém, formas alternativas de controle vêm ganhando espaço por pressão da sociedade por alimentos livres de resíduos de agrotóxicos, sem agressão ao meio ambiente e que preservem a biodiversidade dos agroecossistemas (ZAMBOLIN et al., 2000).

O controle biológico pode ser utilizado em conjunto com outras práticas de controle em programas de manejo integrado de pragas (MIP) (MONTEIRO; HICKEL, 2004) e também como uma das principais formas de controle junto com o controle cultural na agricultura orgânica (CANESIN, 2011). Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) se apresentaram eficientes para o controle de diversos dípteros Tephritidae, inclusive para a mosca-da-fruta-sulamericana (*A. fraterculus*) (RODRIGUES-TRENTINI, 1996; BARBOSA-NEGRISOLI et al., 2009 CANESIN, 2011). Os gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são os NEPs mais conhecidos e estudados, apresentando associações mutualísticas com bactérias *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, respectivamente (POINAR, 1990). A fase de juvenil infectivo



(JI) é a única de vida livre e infecta diversos hospedeiros, inclusive larvas e pupas de moscas-das-frutas, levando o inseto à morte em menos de 72 h. Apesar da comprovada eficiência de NEPs em laboratório, poucos estudos foram desenvolvidos relatando a eficiência em condições de pomares. Barbosa-Negrisoni et al. (2009) desenvolveram estudo a campo em pomar de pessegueiro no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Já Canesin (2011) realizou experimento com mosca-das-frutas em pomar de citrus em São Paulo, Brasil. Ambos realizaram revolvimento no solo do pomar, podendo ter influenciado nos resultados por haver condições distintas de matéria orgânica, compactação e porosidade (CANESIN, 2011). Ainda não foi observada a eficiência de isolados de nematoide em pomar de macieira e menos ainda no Estado do Paraná, Brasil.

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi o de avaliar a eficiência de isolados de nematoides entomopatogênicos no controle de larvas de *A. fraterculus* em pomar de macieira cv. Eva localizado em Porto Amazonas, Paraná, Brasil.

#### **6.4. Material e Métodos**

O experimento foi realizado no município de Porto Amazonas, PR, em pomar de macieira cv. Eva de oito anos de produção e área de 7 ha (25°32'08"S, 49°54'52"O e 865 m de altitude média). O clima é Cfb (classificação de Köppen e Geiger), com geadas frequentes no inverno e com temperaturas médias anuais do ar de 17,5 °C (CLIMATE-DATA.ORG, 2015).

O solo do local do experimento é um Cambisol háplico, franco-arenoso, com 21% argila; 28% silte; 51% areia; pH 6; 146,1 mg.dm<sup>-3</sup> P; 338,4 mg.dm<sup>-3</sup> K; 4,1% matéria orgânica. Desde 2004, a empresa responsável pelo pomar apresenta a certificação GlobalGap (GLOBALGAP, 2012) e o manejo de pragas do pomar é integrado, realizando aplicação de inseticidas seletivos aos inimigos naturais e possuindo monitoramento populacional das principais pragas [ácaros, *Grapholita molesta* (Bulck), *A. fraterculus* e lagartas desfolhadoras].

Os dados diários de condições meteorológicas [temperatura do ar (média, máxima e mínima) e umidade relativa do ar], referentes ao período do experimento, foram adquiridos para o município vizinho Lapa (local mais próximo com esses dados meteorológicos disponíveis, a 30 km de distância). Os dados de precipitação foram obtidos no município de

Porto Amazonas. Todos os dados meteorológicos foram obtidos junto ao SIMEPAR (Sistema Meteorológico do Paraná, Curitiba, BR) (Figura 1).

Os isolados *Steinernema carpocapsae* CB 02 e *Heterorhabditis amazonensis* CB 24 foram obtidos junto à coleção do Instituto Biológico de Campinas, cedidos gentilmente pelo Dr. Luis G. Leite. *S. carpocapsae* CB 02 era proveniente dos Estados Unidos, enquanto que *A. amazonensis* CB 24 foi capturado no Estado de São Paulo, Brasil. Os isolados foram mantidos em câmara climatizada ( $T= 15 \pm 1$  °C,  $UR= 70 \pm 10\%$  e sem fotofase) e conservados em frascos de cultura de tecidos de 50 mL com esponja umedecida. Um mês antes do experimento, foram inoculados em lagartas de último instar de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) para multiplicação. As *G. mellonella* foram criadas de forma semelhante à de Machado (1988). As lagartas mortas após dois a três dias foram transferidas para armadilhas de White (VOSS et al., 2009) e mantidas em câmaras climatizadas ( $T= 23 \pm 1$  °C,  $UR= 70 \pm 10\%$  e sem fotofase), onde eram observadas a cada dois dias para purificação dos JI. Os JI foram mantidos a 15 °C em sacolas com umidade adequada e esponjas (semelhante a MOLYNEUX; BEDDING, 1984) para posterior diluição e aplicação no dia do experimento (VOSS et al., 2009). *H. amazonensis* CB 24 já foi testado em experimento conduzido por Canesin (2011) tendo bons resultados em pomar de citros em São Paulo. Já o isolado *S. carpocapsae* CB 02 não foi testado a campo com *A. fraterculus*. RODRIGUES-TRENTINI (1996) já realizou testes de laboratório com outro isolado *S. carpocapsae*, porém, sem realizar testes em pomares.

O experimento foi instalado no dia 12 de fevereiro de 2014, em uma linha de plantas do pomar sem a presença de frutos caídos no chão para evitar a mistura de população nativa de *A. fraterculus* com a de laboratório. Na linha, previamente, uma amostra do solo foi coletada em cinco pontos, conforme Voss et al. (2009), para a verificação da ausência de captura de nematoides nativos, utilizando como iscas, larvas de últimos instares de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). O experimento foi delineado em blocos casualizados com dez repetições. Cada bloco foi constituído por quatro parcelas espaçadas de 40 cm e locadas embaixo da copa de uma planta de macieira. As parcelas foram cilindros de PVC de 20 cm de altura, sendo 10 cm cravados no solo por pressão, sem revolvimento (Figura 2A). Inicialmente, os canos foram cobertos com tela “voile” durante 14 dias para evitar infestação prévia de moscas no local. No dia 25 de fevereiro, foram depositadas na superfície do solo, dentro de cada cano, 60 larvas de terceiro instar de *A. fraterculus*. As moscas foram obtidas de criação do CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura, São Paulo – Brasil), e posteriormente criadas em laboratório de forma semelhante à descrita por Walder et al.

(2014). Após a total penetração das larvas, que levava em média 30 minutos, 500 mL de solução contendo os tratamentos foram irrigados em cada cilindro com regador da marca Metasull 5L. A liberação das larvas de moscas e a aplicação dos tratamentos foram realizadas no final da tarde (VOSS et al., 2009). Os tratamentos constituíram-se de 180 JI larva<sup>-1</sup> de *S. carpocapsae* CB 02; 180 JI larva<sup>-1</sup> de *H. amazonensis* CB 24; CB 02 + CB 24 (90 JI larva<sup>-1</sup> para cada isolado); e controle (água). Foram aplicados em cada tratamento 34 JIs cm<sup>-2</sup> de superfície de solo, o que equivaleu a 3,4X 10<sup>8</sup> JI ha<sup>-1</sup>.

As concentrações dos JI foram determinadas através da técnica da contagem de cinco gotas de 20 microlitros cada, utilizando micropipetador e um estereomicroscópio ótico (VOSS et al., 2009).

Após aplicação dos tratamentos, os tubos foram novamente vedados com telas “voile” e receberam internamente duas etiquetas adesivas de coloração amarela (10 x 10 cm) para a captura dos adultos emergentes (Figura 2B). Semanalmente, durante 45 dias, os cilindros foram vistoriados para a observação da presença das moscas e troca dos cartões.

Foram consideradas mortas as moscas não capturadas. As médias de porcentagem de moscas emergidas foram transformadas pela raiz quadrada e submetidas a uma análise de variância e teste de Tukey através do aplicativo R 3.1.0. (R Development Core Team, 2008).

## 6.5. Resultados e discussão

Os tratamentos com NEPs afetaram significativamente a mortalidade de *A. fraterculus* (Teste F,  $p < 0,001$ , C.V. = 4,45%). Com *S. carpocapsae* CB 02 e a mistura CB 02 + *H. amazonensis* CB 24, a mortalidade observada foi de 86,5 e 90,8%, respectivamente. As médias de mortalidade desses tratamentos não diferiram entre si, mas foram significativamente maiores do que as de *H. amazonensis* CB 24 e do controle (70,6 e 68,1% de mortalidade, respectivamente) (Figura 3).

A aplicação de *H. amazonensis* CB 24 realizadas por Canesin (2011) em *A. fraterculus* em pomar de citros não resultou em diferença na mortalidade de pupas nas três doses testadas. A dose tratada no presente experimento (3,4 X 10<sup>8</sup> JI ha<sup>-1</sup>) foi semelhante à dose de 3,5 X 10<sup>8</sup> JI ha<sup>-1</sup> de Canesin (2011), com a qual obteve 69% de mortalidade observada para pupas, o que também se assemelhou à do presente experimento (70,6%). Porém, no experimento de

Canesin (2011) a mortalidade observada na testemunha foi 35%, significativamente inferior aos outros tratamentos.

O que pode ter contribuído para a diferença do CB 24 para os dois estudos é o revolvimento do solo, a textura diferenciada (solo franco-argilo-arenoso) e a presença de pupas, não de larvas. Além disso, no experimento de Canesin (2011) as pupas foram dispostas em sacos de malha parcialmente enterrados, contendo *A. fraterculus* no seu interior. A falta de mobilidade pupal pode ter feito com que *A. fraterculus* não tivesse como escapar dos nematoides como as larvas fazem (RODRIGUES-TRENTINI, 1996). Apesar de não se ter capturado nematoides nativos na linha do pomar em estudo, outros nematoides bacteriófagos e organismos antagonistas aos próprios NEPs, como fungos, ácaros e bactérias, podem ter influenciado no resultado (DUNCAN et al., 2003), visto que houve uma alta mortalidade de *A. fraterculus* na testemunha no presente trabalho (68,1%) e a mortalidade das pupas do experimento de Canesin (2011) foram de 31 e 35% para *Ceratitis capitata* (Wied.) e para *A. fraterculus*, respectivamente. O próprio autor comentou que a mortalidade elevada das testemunhas pode ser devida a fatores tanto bióticos quanto abióticos (KAYA, 1990). No presente estudo, enquanto as larvas se enterravam no solo dos cilindros (período anterior à aplicação dos tratamentos), foi observado a predação por formigas, o que pode ter prejudicado o resultado do estudo.

A dose utilizada no presente experimento está abaixo do limite máximo para liberações inundativas:  $2,5 \times 10^9$  JI ha<sup>-1</sup>, sugerido por Grewal et al. (1994), da mesma forma que as utilizadas por Canesin (2011). Doses superiores tais como 250 JIs cm<sup>-2</sup> de *S. carpocapsae* e de *S. riobrave* foram utilizadas para o controle de larvas de *Anastrepha ludens*; contudo, a emergência de moscas foi reduzida em 64,1% e em 14%, respectivamente, em solo franco-arenoso (LEZAMA-GUTIÉRREZ et al., 2006). A mesma dose de *S. riobrave* e de *Heterorhabditis bacteriophora* foi aplicada em *A. fraterculus* em suspensão em pomar de pêssago do Rio Grande do Sul, causando mortalidades semelhantes a *S. carpocapsae* CB 02 do presente estudo (BARBOSA-NEGRISOLI et al., 2009). Muitos autores comentaram da dificuldade de conseguir controle eficiente de tefritídeos utilizando doses baixas de NEPs e que o aumento da dose eleva a virulência (ROHDE et al., 2012). Toledo et al. (2005) usaram altas concentrações de JI de *H. bacteriophora* (três vezes mais a DL<sub>50</sub> observada em laboratório - 345 JI cm<sup>-2</sup>) para alcançar mortalidade de 76,1%. A mortalidade de larvas de *A. ludens* subiu de 52 utilizando-se a dose de *H. bacteriophora* de 250 JI cm<sup>-2</sup> para 74% com 500 JI cm<sup>-2</sup> (TOLEDO et al., 2006). Barbosa- Negrisoli (2009) comentou que a dose utilizada (250 JI/cm<sup>2</sup>) foi superior à recomendada para aplicações no campo (GREWAL et al., 1994);

contudo, a quantidade de nematoides aplicada direcionada na projeção da copa (locais com maior densidade da praga-alvo) poderia ser menor, tornando viável para o uso comercial.

Características como a textura do solo, dose, temperatura, umidade, antagonistas, podem influenciar tanto na biologia do hospedeiro quanto na eficiência do nematoide entomopatogênico (KAYA, 1990; KUNG; GLAUGLER, 1990; KUNG et al., 1991). Solos argilosos, geralmente apresentam menor aeração, e baixa capacidade de dispersão e de sobrevivência dos NEPs (KAYA, 1990). O solo do presente experimento possuiu 21% de argila (solo franco-arenoso), menos do que no pomar utilizado por Canesin (2011) (26%). Porém, somente esse fator, não explicaria a piora na eficiência de *H. amazonensis* CB 24, mesmo isolado utilizado no presente experimento.

As condições ambientais devem ser compatíveis para que o NEP consiga expressar sua virulência (KLEIN, 1990). A temperatura da mesma região de origem do NEP geralmente é a que permite expressar seu potencial virulento. Durante os primeiros 30 dias (período de emergência dos adultos de *A. fraterculus*) no presente experimento a temperatura média do ar variou entre 16 a 25 °C e os extremos térmicos foram 13 e 29 °C (Figura 1a). A temperatura do local de origem de *S. carpocapsae* é inferior à de *Heterorhabditis* sp. (ROHDE et al., 2010). *S. carpocapsae*, apesar de ser endêmico dos Estados Unidos da América, suporta temperaturas mais frias e tem 25 °C como ótimo térmico para o controle de *C. capitata* em laboratório. Já *Heterorhabditis* sp. apresentou ótimo térmico em 30 °C (ROHDE et al., 2010).

As temperaturas durante o período do experimento em Porto Amazonas, PR foram mais amenas, havendo inclusive extremo de 13 °C, temperatura que pode ter prejudicado *H. amazonensis* CB 24, o que não aconteceu em São Paulo, região mais quente (CANESIN, 2011). As condições podem ter prejudicado a infectividade de CB 24, uma vez que seu desempenho em laboratório foi superior (CANESIN, 2011). Com relação à precipitação, houve um dia de acúmulo de chuva de 30 mm após a inoculação dos NEPs no solo, o que pode ter prejudicado tanto a sobrevivência dos mesmos a campo quanto a do hospedeiro (*A. fraterculus*) (Figura 1B). Grandes volumes de chuva podem diluir os nematoides na profundidade do solo com larvas e-ou pupas, podendo fazer também com que o solo se torne menos oxigenado (KLEIN, 1990). Isso poderia ter prejudicando a infecção por *H. amazonensis* CB 24, visto que em experimento de Canesin (2011) o tratamento com o mesmo isolado apresentou maiores taxas de mortalidade de *G. mellonella* na primeira e segunda semana após sua aplicação no solo.

Próximo à fase de maior emergência das moscas (30 dias após o tratamento) houve um déficit hídrico, o que também pode ter prejudicado a virulência e sobrevivência dos NEPs a

campo. Sabe-se que a umidade relativa do solo é um importante fator para a sobrevivência, dispersão e infectividade de NEPs (KUNG et al., 1991). A umidade do solo não foi mensurada para o presente estudo; porém, em experimento de laboratório, Rhode et al. (2010) obtiveram maior mortalidade de *C. capitata* por *S. carpocapsae* na umidade de 75% da capacidade de campo. Já *Heterorhabditis* sp. apresentou baixas mortalidades para as três umidades testadas (100%, 75% e 50% da capacidade de campo) (ROHDE et al., 2010). *H. bacteriophora* também foi influenciado pela umidade de solo estéril franco arenoso para causar mortalidade de *A. ludens*. Solo com 18% de umidade foi o que causou maiores mortalidades das larvas, ultrapassando 70%. Em solo com apenas 5% de umidade a mortalidade caiu para menos de 20% (TOLEDO et al., 2014).

A mortalidade observada de *A. fraterculus* por *S. carpocapsae* CB 02 foi maior do que a de *H. amazonensis* CB 24 (Figura 3). O comportamento de ataque dos isolados pode influenciar na sua virulência (CAMPBELL; KAYA, 2000). *S. carpocapsae* tem o comportamento de “tocaia”, esperando por insetos móveis para a infecção. Nematoides com essa estratégia de ataque geralmente são mais abundantes na superfície do solo (POINAR, 1990) o que pode ter influenciado no resultado positivo para *A. fraterculus*, visto que suas larvas são móveis, porém, não se aprofundam para empupar (SALLES, 2000). Já *H. amazonensis* se desloca para buscar seus alvos. Por outro lado, gasta grande parte do seu tempo em movimento e tem pausas de curta duração. Dessa forma, podem se aprofundar mais rápido no solo e seus principais hospedeiros são insetos crípticos e sedentários (GRIFFIN, 2012). Em experimento realizado com *S. carpocapsae* para o controle de *Anastrepha obliqua* em cilindros de PVC, constatou-se que tanto a profundidade quanto a textura do solo influenciaram na eficiência de controle e que a profundidade de dois centímetros foi a que apresentou melhores resultados de controle com o isolado (TOLEDO et al., 2009).

Canesin (2011) comentou sobre a alta mortalidade da população de *A. fraterculus* na testemunha, prejudicando a avaliação do experimento, de forma semelhante ao ocorrido em Porto Amazonas. Em experimentos a campo, Barbosa-Negrisoni (2009) e Toledo et al. (2005) registraram mortalidade no controle inferior a 10%; contudo seus experimentos foram conduzidos com modificações das condições ambientais naturais, tais como: mudança do solo do pomar para areia, correção de umidade e retirada das pupas do solo para a emergência das moscas em laboratório.

Condições ambientais naturais e predadores podem ter influenciado na emergência de adultos da mosca-das-frutas-sulamericana no controle do presente experimento (KAYA, 1990; SALLES, 2000). As larvas de *A. fraterculus* utilizadas no experimento foram

provenientes de criação em laboratório em dietas artificiais, o que pode ter tornando-as menos aptas a sobreviverem em temperaturas extremas (29 °C e 13 °C) observadas durante o mês do experimento (SALLES et al., 1993; SALLES et al., 1995). Temperaturas de 13 °C podem prejudicar tanto o desenvolvimento dos imaturos quanto dos próprios nematoides. A aplicação dos nematoides e a inoculação das larvas no solo foram realizadas no final da tarde para tentar diminuir a influência do ambiente (principalmente de radiação, temperatura e umidade, capazes de desidratar as larvas) nos resultados (VOSS et al., 2009).

Apesar de *S. carpocapsae* CB 02, em dose isolada ou em conjunto com *H. amazonensis* CB 24, ter mostrado potencial como biocontrolador, o presente experimento foi inconclusivo, devido à alta mortalidade verificada na testemunha sem causa determinada. Novos estudos são necessários para avaliar o potencial de permanência dos isolados a campo e sua real eficiência sobre o controle de *A. fraterculus*. Como sugestão, novo experimento poderia ser conduzido, utilizando-se larvas de população de *A. fraterculus* nativa do local, aumentando-se também o número de repetições para a redução do erro experimental.

## 6.6. Agradecimentos

Ao Dr. Luis G. Leite e a Maria de Lourdes Zamboni Costa pelo fornecimento de material biológico. Ao Edson Chappuis, Eduardo Cesar Brugnara e Guilherme Nishimura pela ajuda na criação dos insetos e auxílio na instalação do experimento e coleta de dados a campo. Ao CNPq pela bolsa concedida à primeira autora.

## 6.7. Referências Bibliográficas

BARBOSA-NEGRISOLI, C.R.C. Isolamento, identificação e eficiência de nematoides entomopatogênicos (Heterorhabditidae e Steinernematidae) no controle da mosca-das-frutas *Anastrepha fraterculus* (Wied. 1830) (Diptera: Tephritidae) na cultura do pessegueiro. Pelotas, 2009. 93p. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Pelotas.

BARBOSA-NEGRISOLI, C.R.C., et al. Efficacy of indigenous entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae), from Rio Grande do Sul, Brazil, against *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in peach orchards. *Journal of Invertebrate Pathology*, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 6-13, 2009.

BRANCO, E.S.; VENDRAMIN, J.D.; DENARDI, F. Resistência às moscas-das-frutas em fruteiras. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto, Holos Editora. 2000. p. 161-167.

CAMPBELL, J.F.; KAYA, H.K. Influence of insect associated cues on the jumping behavior of entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. Behavior, Leiden, v. 137, p. 591-609, 2000.

CANESIN, A. Avaliação de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) no controle de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) e do gorgulho-da-goiaba (Coleoptera: Curculionidae). Dourados, 2011. 116p. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Grande Dourados.

CLIMATE-DATA.ORG. Clima de Porto Amazonas. Disponível em: 15 set. 2015. Acesso em: <<http://pt.climate-data.org/location/313387/>>

DUNCAN, L.W. et al. Competition between entomopathogenic and free-living bacterivorous nematodes in larvae of the weevil *Diaprepes abbreviatus*. Journal of Nematology, Leiden, v. 35, p. 187-193, 2003.

FERREIRA, C.R.R.P.T.; CAMARGO, M.L.B.; VEGRO, C.L.R. Defensivos Agrícolas: comercialização recorde em 2011 e expectativas de acréscimo nas vendas em 2012. Instituto de economia agrícola. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=12409>>. Acesso em: 20 out. 2012.

GLOBALGAP. Certification. Disponível em: <[http://www.globalgap.org/uk\\_en/what-we-do/globalg.a.p.-certification/](http://www.globalgap.org/uk_en/what-we-do/globalg.a.p.-certification/)> Acesso em: 20 out. 2012.

GREWAL, P.S. et al. Host finding behavior as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. Parasitology, Cambridge, v. 108, p. 207-215, 1994.

GRIFFIN, C.T. Perspectives on the behavior of entomopathogenic nematodes from dispersal to reproduction: traits contributing to nematode fitness and biocontrol efficacy. Journal of Nematology, Leiden, v. 44, n. 2, p. 177-184, 2012.

IBGE. Produção Agrícola Municipal. 2015. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2013/default\\_perm\\_xls.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2013/default_perm_xls.shtm)>. Acesso em: 02 Fev., 2015.

KAYA, H.K. Soil ecology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. Cap.5, p. 93-116.

KLEIN, M.G. Efficacy against soil-inhabiting insect pests. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. Cap.10, p. 195-211.

KUNG, S.P.; GAUGLER, R. Soil type and entomopathogenic nematode persistence. Journal of Invertebrate Pathology, Amsterdam, v. 55, p. 401-406, 1990.

KUNG, S.P.; GAUGLER, R.; KAYA, H.K. Effects of soil temperature, moisture and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. Journal of Invertebrate Pathology,



Amsterdam, v. 57, p. 242-249, 1991.

LEZAMA-GUTIÉRREZ, R. et al. Efficacy of Steinernematid nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) on the suppression of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae in soil of differing textures: laboratory and field trials. *Journal of Agriculture and Urban Entomology*, Mt. Pleasant, v. 23, n. 1, p. 41-49, 2006.

MACHADO, L.A. Criação de insetos em laboratório para utilização em pesquisas de controle biológico. In: CRUZ, B.B. *Pragas das Culturas e Controle Biológico*. Campinas: Fundação Cargill, 1988. p. 8-35.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A.; SUGAYAMA, R.L. Biogeografia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. *Mosca-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*. Ribeirão Preto: Holos, 2000. Cap.10, p. 93-98.

MOLYNEUX, A.S.; BEDDING, R.A. Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. D1 and *Steinernema glaseri* for larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Nematologica*, Leiden, v. 30, p. 358–365, 1984.

MONTEIRO, L.B.; HICKEL, E. Pragas de importância econômica em fruteiras de caroço. In: MONTEIRO, L.B. et al. *Fruteiras de caroço: uma visão ecológica*. Curitiba: UFPR, 2004. Cap.11, p. 223-261.

PETRI, J.L.; LEITE, G.B. Macieira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal v. 30, n. 4, p. 857-1166, 2011.

POINAR JR., G. O. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. Cap. 2, p. 23-58.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. 2013. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2008. Online. Available from: <<http://www.R-project.org>>. Accessed: Nov. 20, 2014.

RODRIGUES-TRENTINI, F. Mecanismos de defesa e controle de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) expostas a nematoides entomopatogenicos. Curitiba, 1996. 73p. Tese (mestrado) - Universidade Federal do Paraná.

ROHDE, C.R. et al. Influence of soil temperature and moisture on the infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) against larvae of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Neotropical Entomology*, Londrina, v. 39, n. 4, p. 608-611, 2010.

ROHDE, C. et al. Effect of *Heterorhabditis* sp. and *Steinernema carpocapsae* applied in different periods of soil infestation with larvae of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia*, Guarapuava, v. 5, n. 3, p. 79-84, 2012.

SALLES, L.A.B. Efeito da temperatura constante na oviposição e no ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Londrina, v. 22, n. 1, p. 57-62. 1993.

SALLES, L.A.B.; CARVALHO, F.L.C.; JUNIOR R. Efeitos da temperatura e da umidade do solo sobre pupas e emergência de *Anastrepha fraterculus* (Wied.). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Londrina, v. 24, n. 1, p. 147:152, 1995.

SALLES, L.A.B. Biologia e ciclo de vida. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto, Holos, 2000. Cap.8, p. 81-86.

SUGAYAMA, R.L. et al. Oviposition behavior and preference of *Anastrepha fraterculus* in apple and diel pattern of activity in an apple orchard in Brazil. Entomologia Experimentalis et Applicata, Dordrecht, v. 83, n. 2, p. 239-245, 1997.

TOLEDO, J. et al. Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae by *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) under laboratory and field conditions. Biocontrol Science and Technology, London, v. 15, n. 6, p. 627-634, 2005.

TOLEDO, J. et al. Infection of *Anastrepha ludens* following soil applications of *Heterorhabditis bacteriophora* in mango orchard. Entomologia Experimentalis et Applicata, Dordrecht, v. 119, p. 155-162, 2006.

TOLEDO, J. et al. Abiotic factors affecting the infectivity of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) on larvae *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). Biocontrol Science and Technology, London, v. 19, n. 9, p. 887-898, 2009.

TOLEDO, J. et al. Effect of soil moisture on the persistence and efficacy of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) against *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae. Florida Entomologist, Lutz, v. 97, n. 2, p. 528-533, 2014.

VOSS, M. et al. 2009. Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematoides entomopatogênicos. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 44p. Disponível em : <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/853176>>. Acesso em: 21 Mai. 2013.

WALDER, J.M.M. et al. Large scale artificial rearing of *Anastrepha* sp.1 aff. *fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in Brazil. Scientia Agricola, Piracicaba, v. 71, n. 4, p. 281-286, 2014.

ZAMBOLIN, L. Manejo integrado: Doenças, pragas e plantas daninhas. Viçosa: UFV, 2000. 416 p.

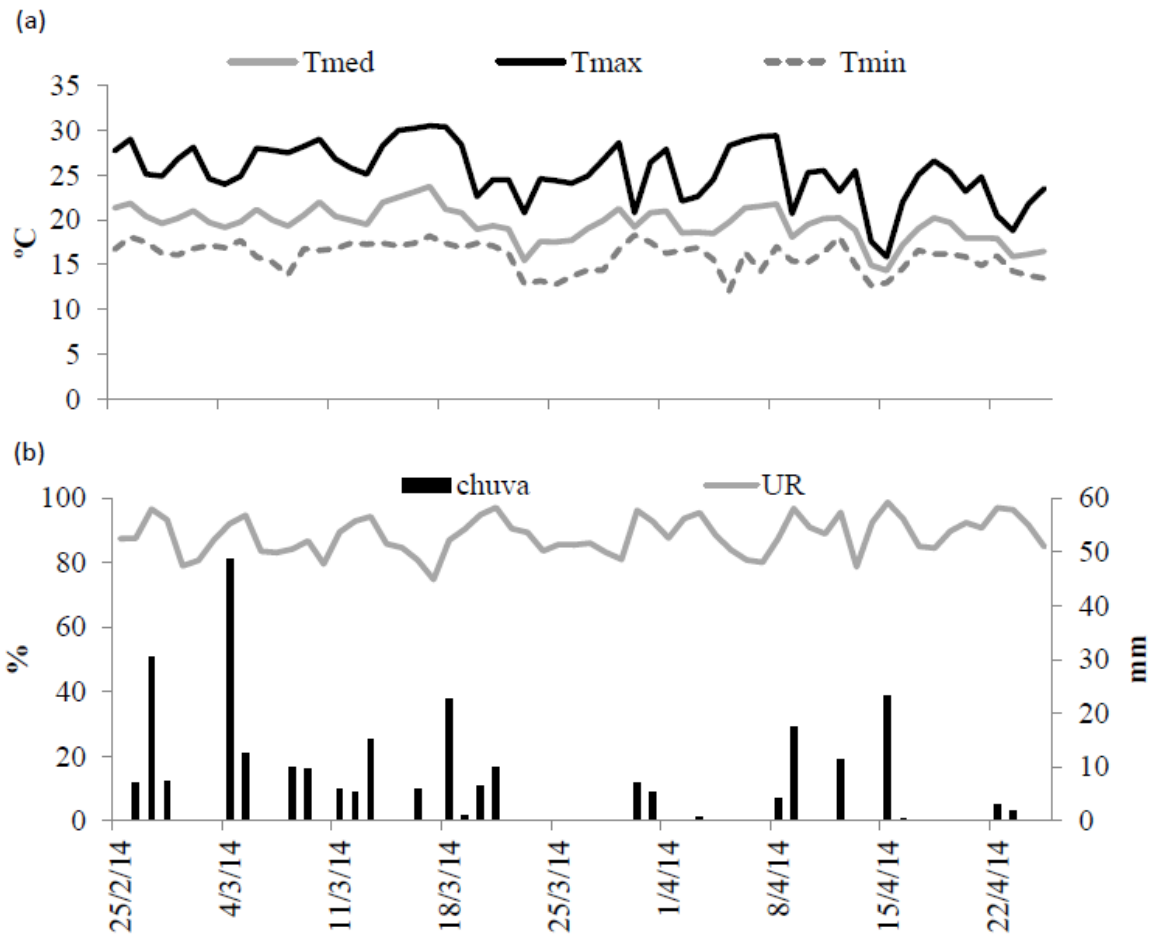


FIGURA 1. (a) Média das temperaturas do ar [médias diárias (Tmed), máxima (Tmax) e mínima (Tmin) absolutas diárias] para o município de Lapa, Paraná, Brasil. (b) Médias diárias de umidade relativa do ar (UR) para o município de Lapa, PR e precipitação pluvial acumulada diária em Porto Amazonas, PR, Brasil.



FIGURA 2. (a) Disposição dos cilindros de PVC em um dos lados da linha do experimento em pomar de macieira em Porto Amazonas, PR, Brasil. (b) Cartões adesivos amarelos dispostos dentro dos cilindros para captura de adultos de *A. fraterculus*.

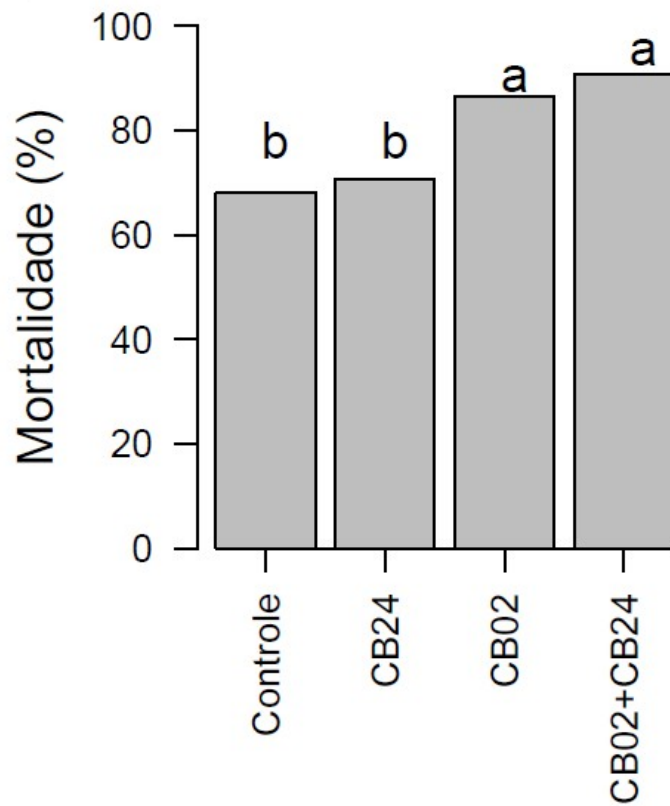


FIGURA 3. Mortalidade observada de *A. fraterculus* de acordo com o tratamento testado em um pomar de macieira em Porto Amazonas, PR, Brasil. Colunas com a mesma letra não diferiram (Teste de Tukey,  $\alpha=0,05$  - teste realizado com dados transformados pela função raiz quadrada).

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

*Anastrepha fraterculus* é a espécie dominante de mosca-das-frutas em Porto Amazonas, Paraná (Brasil), e ocorre principalmente em macieira. O pico populacional dentro de pomares obedece à maturação dos frutos para a macieira e o caquizeiro. A ocorrência de *A. fraterculus* é associada mais fortemente com a presença de frutos maduros nos pomares e com a captura de parasitoides himenópteros do que outros fatores bióticos e abióticos.

*Oscheius* sp. é o nematoide facultativo encontrado em pomar de macieira em Porto Amazonas, PR e alguns de seus isolados são eficientes no controle de *A. fraterculus*. Isolados de *Oscheius* sp. são capturados durante todas as estações do ano no pomar e em taxas semelhantes. A presença de maçãs sobre o solo e fatores edafoclimáticos desse local não influenciam significativamente na captura de NEPs.

Em condições de laboratório, todos os isolados *Heterorhabditis* sp., *S. carpocapsae* CB 02 e *Oscheius* sp. LAMIP 9 provocam mortalidade nas larvas de *A. fraterculus*, quando utilizado solo franco de pomar de macieira de Porto Amazonas. *Oscheius* sp. LAMIP 9 e LAMIP 92 são menos eficientes do que os NEPs originários de outras regiões. *S. carpocapsae* CB 02 é o NEP mais eficiente no controle de *A. fraterculus*, reduzindo 50% e 90% da população com, respectivamente, 96,3 e 314,7 juvenis infectivos por larva utilizando-se solo de Porto Amazonas como substrato, em laboratório.

O experimento de campo no pomar de macieira em Porto Amazonas, PR, utilizando *S. carpocapsae* CB 02 tanto em dose isolada quanto em aplicação conjunta com *H. amazonensis* CB 24, foi inconclusivo devido à alta mortalidade de *A. fraterculus* na testemunha. Sugere-se a repetição do experimento utilizando-se população de *A. fraterculus* nativas do local e menos domesticada, capaz de suportar condições ambientais desfavoráveis ao desenvolvimento.

Os resultados obtidos neste trabalho serão considerados na definição de novos estudos, incluindo redefinições de metodologias para verificar mais detalhadamente as oscilações dos fatores climáticos e de manejo de pomares de macieiras na ocorrência de mosca-das-frutas-sulamericana. Também, de estudos para averiguar a possibilidade de incluir os NEPs dentro das técnicas de manejo integrado dessa praga, tendo em conta a existência de isolado eficiente no controle de *A. fraterculus* em condições de laboratório. Estudos com os isolados patogênicos de *Oscheius* poderão ser conduzidos com fim da identificação da espécie e também da sua bactéria entomopatogênica associada. Os isolados poderão ter sua virulência testada em outras populações, pragas e regiões, onde eles não ocorrem.

## 8. REFERÊNCIAS

- ADAMS, B.J.; NGUYEN, K.B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2002, p. 1-3.
- AGUIAR-MENEZES, E.L.; MENEZES, E.B. Natural occurrence of parasitoids of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in different host plants in Itaguaí (RJ), Brazil. **Biological Control**, Maryland, v. 8, n. 1, p.1-6, 1997.
- AGUIAR-MENEZES, E.L.; MENEZES, E.B.; SILVA, P.S.; BITTAR, A.C.; CASSINO, P.C.R. Native hymenopteran parasitoids associated with *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in Seropédica City, Rio De Janeiro, Brazil. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 84, n. 4, p. 706-711, 2001.
- AGUIAR-MENEZES, A.L.; MENEZES E.B. Effect of permanence of host fruits in the fields on natural parasitism of *Anastrepha* spp. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 589-595, 2002.
- ALTIERI, M.A.; NICHOLLS, C.I. A biodiversidade e seu papel ecológico na agricultura. In: ALTIERI, M.A. (Ed.). **O papel da biodiversidade no manejo de pragas**. Ribeirão Preto: Holos, 2003, p. 17-23.
- ALVARENGA, C.D.; GIUSTOLI, T.A.; QUERINO, R.B. Alternativas no controle de moscas-das-frutas. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T.J.; PALLINI, A.L. (Ed.). **Tecnologias alternativas para o controle de pragas e doenças**. Viçosa: Epamig/CTZM, 2006, p. 227-252.
- ANDALÓ, V.; MOREIRA, G.F.; MAXIMINIANO, C.; MOINO JR. A.; CAMPOS, V.P. Suscetibilidade de *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) a fungos predadores de nematoides. **Nematologia Brasileira**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 177-184, 2008.
- BARBOSA-NEGRISOLI, C.R.C. **Isolamento, identificação e eficiência de nematoides entomopatogênicos (Heterorhabditidae e Steinernematidae) no controle da mosca-das-frutas *Anastrepha fraterculus* (Wied. 1830) (Diptera: Tephritidae) na cultura do pessegueiro**. 2009. 93 f. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2009.
- BARBOSA-NEGRISOLI, C.R.C.; GARCIA, M.S.; DOLINSKI, C.; NEGRISOLI JR., A.S.; BERNARDI, D.; NAVA, D.E. Efficacy of indigenous entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae), from Rio Grande do Sul, Brazil, against *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in peach orchards. **Journal of Invertebrate Pathology**, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 6-13, 2009.
- BEAVERS, J.B.; CALKINS, C.O. Susceptibility of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) to sterneinernematid and heterorhabditid nematodes in laboratory studies. **Environmental Entomology**, College Park, v. 13, p. 137-139, 1984.
- BLEICHER, J. A história da macieira. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: Epagri, 2002. p. 29-37.

BOTTON, M.; MACHOTA JUNIOR, R.; NAVA, D.E.; ARIOLI, C.J. Novas alternativas para o monitoramento e controle de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae) na fruticultura de clima temperado. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 22, 2012. Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Aptor Software, 2012.

BRANCO, E.S.; VENDRAMIN, J.D.; DENARDI, F. Resistência às moscas-das-frutas em fruteiras. MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto, Holos Editora. 2000. p. 161-167.

CAMPBELL, J.F.; LEWIS, E.; YODER, F.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematode (Heterorhabditidae and Steinernematidae) seasonal population dynamics and impact on insect populations in turfgrass. **Biological Control**, Maryland, v. 5. n. 4, p. 598-606. 1995.

CANAL, N.A.; ZUCCHI, R.A. Parasitoides - Braconidae. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**: Conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto, SP: Holos, 2000. p. 119-126.

CANESIN, A. **Avaliação de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) no controle de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) e do gorgulho-da-goiaba (Coleoptera: Curculionidae)**. 2011. 116 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Grande Dourados, Dourados, MG, 2011.

CARVALHO, R.S.; NASCIMENTO, A.S. Criação e utilização de *Diachasmimorpha longicaudata* para controle biológico de mosca das frutas (Tephritidae). In: PARRA, J.R.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S (Ed.). **Controle biológico no Brasil**: Parasitoides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. p. 65-179.

CARVALHO R.S. **Metodologia para monitoramento populacional de moscas-das-frutas em pomares comerciais**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2005. 17 p. Circular Técnica 75.

CARVALHO, V.A.M. **Estudos taxonômicos e armazenamento de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae)**. 2006. 182 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2006.

CHIARADIA, L.A.; MILANEZ, J.M.; DITTRICH, R. Flutuação populacional de moscas-das-frutas em pomares de citros no oeste de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 337-343, 2004.

CITADIN, I. O cultivo do pessegueiro no Paraná. In: RASERIA, M.C.B.; PEREIRA, J.F.M.; CARVALHO, F.L.C. (Ed.). **Pessegueiro**. Brasília DF: Embrapa, 2014. p. 635-651.

DOWDS, B.C.A.; PETERS, A. Virulence mechanisms. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 79-98.

DUNCAN, L.W.; DUNN, L.W.; BAGUE, G.; NGUYEN, K. Competition between entomopathogenic and free-living bacterivorous nematodes in larvae of the weevil *Diaprepes abbreviatus*. **Journal of Nematology**, Leiden, v. 35, p. 187-193, 2003.



FEHN, L.M. Influência dos fatores meteorológicos na flutuação e dinâmica de população de *Anastrepha* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Pelotas, v.17, p. 533-544, 1982.

FERREIRA, C.R.R.P.T.; CAMARGO, M.L.B.; VEGRO, C.L.R. **Defensivos Agrícolas: comercialização recorde em 2011 e expectativas de acréscimo nas vendas em 2012**. Instituto de economia agrícola. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=12409>>. Acesso em: 20 out. 2012.

GATTELLI, T. **Moscas frugívoras (Diptera: Tephritidae) e parasitoides associados a mirtáceas e laranjeira ‘Céu’ em Montenegro e Harmonia, RS**. 2006. 82 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2006.

GARCIA, F.R.M.; CORSEUIL, E. Análise faunística de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em pomares de pessegueiro em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zoologia**, Uruguaiana, v. 15, n. 4, p. 1111-1117, 1998.

GARCIA, F.R.M.; CAMPOS, J.V.; CORSEUIL, E. Flutuação populacional de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) na Região Oeste de Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 415-420, 2003.

GOMES, R.P. O caquizeiro. In: GOMES, R. P. (Ed.). **Fruticultura brasileira**. São Paulo: Nobel, 1980. p. 153-162.

GUIMARÃES, J.A.; DIAZ, N.B.; ZUCCHI, R.A. Parasitoides: Figitidae (Eucoilinae). In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000, p. 127-134.

HERNÁNDEZ, M.A.R. **Patogenicidad de nematodos entomopatógenos (Nemata: Steinernematidae, Heterorhabditidae) em larvas y pupas de mosca de la fruta *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae)**. 2003. 129 f. Dissertação (Mestrado), Universidade de Colima, Colima, MEX, 2003.

HOMINICK, W.M. Biogeography. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2002. p. 115-143.

IAPAR – Instituto Agrônômico do Paraná. **Macieira IAPAR 75 Eva**. [s.d.]. Disponível em: <[http://www.iapar.br/arquivos/File/zip\\_pdf/eva.pdf](http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/eva.pdf)>. Acesso em: 31 mai. 2014.

IBGE (2015) **Produção Agrícola Municipal**. Online. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2013/default\\_perm\\_xls.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2013/default_perm_xls.shtm)>. Acesso em: 02 ago. 2015.

JAHNKE, S.M.; REYES, C.P.; REDAELLI, L.R. Influência da fase de maturação de pêssegos e goiabas na atratividade de iscas para *Anastrepha fraterculus*. **Científica**, Jaboticabal, v. 42, n. 2, p. 134-142, 2014.

KAYA, H.K. Soil ecology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. p. 93-116.

KOVALESKI, A.; SUGAYAMA, R.L., MALAVASI, A. Movement of *Anastrepha*

*fraterculus* from native breedings sites into apple orchards in Southern Brazil. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 91, p. 457-463, 1999.

KOVALESKI, A.; SUGAYAMA, R.L.; URAMOTO, K.; MALAVASI, A. Rio Grande do Sul. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 285-290.

KOVALESKI, A. Pragas. In: KOVALESKI, A. (Ed.). **Maçã: Fitossanidade**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. 85 p. (Frutas do Brasil, 38).

KUNG, S.P.; GAUGLER, R. Soil type and entomopathogenic nematode persistence. **Journal of Invertebrate Pathology**, Amsterdam, v. 55, p. 401–406, 1990.

KUNG, S.P.; GAUGLER, R.; KAYA, H.K. Effects of soil temperature, moisture and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. **Journal of Invertebrate Pathology**, Amsterdam, v. 57, p. 242-249, 1991.

LEONEL JR., F.L.; ZUCCHI, R.A.; WHARTON, R.A. Distribution and tephritid hosts (Diptera) of braconid parasitoids (Hymenoptera) in Brazil. **International Journal of Pest Management**, London, v. 41, p. 208-213, 1995.

LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA, O.J.; CONTRERAS, O.J.O.; GONZÁLES, R.M.; TRUJILLO, D.L.A.; REBOLLEDO, D.O. Susceptibilidad de larvas de *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) a diversos nematodos entomopatógenos (Steinernematidae y Heterorhabditidae). **Vedalia**, Chiapas, v. 3, p. 31-33, 1996.

LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; PESCADOR-RUBIO, A.; GALINDO-VELASCO, E.; ÁNGEL-SAHAGÚN, C.A.; MICHEL-ACEVES, A.C.; GONZÁLEZ-REYES, E. Efficacy of Steinernematid nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) on the suppression of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae in soil of differing textures: laboratory and field trials. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, Clemson, v. 23, n. 1, p. 41-49, 2006.

LIU, Q.; MRACEK, Z.; ZHANG, L.; PUZA, V.; DONG, L. Re-description of *Oscheius chongmingensis* (Nematoda: Rhabditidae) and its entomopathogenicity. **Nematology**, College Park, v. 14, n. 2, p. 139–149, 2012.

MACHADO, A.E.; SALLES, L.A.B.; LOECK, A. Exigências térmicas de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) e estimativa do número de gerações anuais em Pelotas, RS. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 24, n. 3, p. 573-578, 1995.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A.; SUGAYAMA, R.L. Biogeografia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Mosca-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 93-98.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema Agrofit**. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 25 out. 2011.

MCGRAW A.; KOPPERHOFER, A.M. Population dynamics and interactions between endemic entomopathogenic nematodes and annual bluegrass weevil populations in golf course turfgrass. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 77-89, 2009.

MEJIA-TORRES, M.C.; SÁENZ, A. Ecological characterization of the Colombian entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* sp. SL0708. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 73, n. 2, p. 239-243, 2013.

MINAS, R.S.; DOLINSKI, C.; CARVALHO, R.S.; SOUZA, R.M. Controle biológico da mosca-do-mediterrâneo *Ceratitidis capitata* utilizado nematoides entomopatogênicos em laboratório. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 12, n. 2, p. 115-119, 2011.

MONTEIRO, L.B.; HICKEL, E. Pragas de importância econômica em fruteiras de caroço. In: MONTEIRO, L.B.; DE MIO, L.L.M.; SERRAT, B.M.; MOTTA, A.C.; CUQUEL, F.L. **Fruteiras de caroço: uma visão ecológica**. Curitiba: UFPR, 2004. p. 223-261.

NASCIMENTO, A.S.; CARVALHO, R.A.S. Manejo integrado de moscas das frutas. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Mosca das frutas de importância no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 169-173.

NAVA, D.E.; BOTTON, M. **Bioecologia e controle de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitidis capitata* em pessegueiro**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 29 p. Documento 315.

NAVA, D.; BOTTON, M.; ARIOLI, C.J.; GARCIA, M.S.; GRUTZMACHER, A.D. Insetos e ácaros-praga. In: RASERIA, M.C.B.; PEREIRA, J.F.M.; CARVALHO, F.L.C. (Ed.). **Pessegueiro**. Brasília - DF: Embrapa, 2014. p. 433-486.

NEVES, M.F.; LOPES, F.F. **Estratégias para a laranja no Brasil**. São Paulo: Atlas, 2005. 232 p.

ODUN, E.P. Ecologia dos sistemas: abordagem por análise de sistemas e por modelação matemática em ecologia. In: ODUN, E.P. (Ed.). **Fundamentos de ecologia**. 6.ed. São Paulo: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004. p. 445-462.

OVRUSKI, S., ALUJA, M., SIVINSKI, J.; WHARTON, R. Hymenoptera parasitoids on fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and Southern United States: diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. **Integrated Pest Management Reviews**, Berlin, v. 5, n. 2, p. 81-107, 2000.

PAPADOPOULUS, N.T.; KATSOYANNOS, B.I.; CAREY J.R.; KOULOSSIS, N.A. Seasonal and annual occurrence of the mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in northern Greece. **Annals of the entomological Society of America**, Columbia, v. 94, n. 1, p. 41-50, 2001.

PETRI, J.L.; LEITE, G.B. Macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 4, p. 857-1166, 2011.

POINAR JR., G.O. **Entomopathogenic nematodes – a manual and host list of insect**. Leiden: E.J. Brill, 1975. 317p.

POINAR JR., G.O. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R.; KAYA, HK. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. p. 23-58.

PUZA, F; MRACEK, Z. Seasonal dynamics of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* as a response to abiotic factors and abundance of insect hosts. **Journal of Invertebrate Pathology**, Amsterdam, v. 89, n. 2, p. 116–122, 2005.

RAGA, A.; SOUSA FILHO, M.F. Manejo e monitoramento de moscas-das-frutas. In: Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico, 3. 2000. Mogi das Cruzes. **Anais...** Mogi das Cruzes: Instituto Biológico, 2000. p. 87-99.

RIO, R.V.M.; CAMERON, E.A. *Heterorhabditis bacteriophora*: seasonal dynamics and distribution in a stand of sugar maple, *Acer saccharum*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Amsterdam, v. 75, n. 1, p. 36-40. 2000.

RODRIGUES-TRENTINI, F. **Mecanismos de defesa e controle de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) expostas a nematoides entomopatogenicos**. 1996. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, 1996.

ROHDE, C.R.; MOINO JR., A.; SILVA, M.A.; CARVALHO, F.D.; FERREIRA, C.S. Influence of soil temperature and moisture on the infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) against larvae of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 4, p. 608-611, 2010.

ROHDE, C.R.; MOINO JR., A.; CARVALHO, F.D.; SILVA, M.A. Selection of entomopathogenic nematodes for the control of the fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.7, p. 797-802, 2012a.

ROHDE, C.; MOINO JUNIOR, A.; SILVA, M.A.T.; CARVALHO, F.D. Effect of *Heterorhabditis* sp. and *Steinernema carpocapsae* applied in different periods of soil infestation with larvae of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia**, Guarapuava, v. 5, n. 3, p. 79-84, 2012b.

RUPP, L.C.D.; BOTTON, M.; BOFF, P. Percepção do agricultor frente à mosca-das-frutas na produção orgânica de pessegueiro. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 19, n. 2, p. 53-56, 2006.

SÁ, R.F. **Bioecologia de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) e dispersão de machos estéreis de *Ceratitis capitata* (Wied.) em pomares comerciais de manga (*Mangifera indica* L.) na região Sudoeste da Bahia**. 2006. 129 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, BA, 2006.

SALLES, L.A.B.; KOVALESKI, A. Mosca-das-frutas em macieira e pessegueiro no Rio Grande do Sul. **Hortisul**, Pelotas, v. 1, p. 5-9, 1990.

SALLES, L.A.B. Efeito da temperatura constante na oviposição e no ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 57-62, 1993a.

SALLES, L.A.B. Influência do fotoperíodo no desenvolvimento de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera, Tephritidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 47-55, 1993b.

SALLES, L.A.B.; CARVALHO, F.L.C.; JUNIOR R. Efeitos da temperatura e da umidade do solo sobre pupas e emergência de *Anastrepha fraterculus* (Wied.). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 147-152, 1995.

SALLES, L.A.B. Colonização e dispersão de adultos de *Anastrepha fraterculus* (WIED.) (Diptera: Tephritidae) em pomares de pessegueiro e macieira. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, 1997. Disponível em: <[http://www.fepagro.rs.gov.br/upload/1398909560\\_art\\_05.pdf](http://www.fepagro.rs.gov.br/upload/1398909560_art_05.pdf)>. Acesso em: 15 jul. 2015.

SALLES, L.A.B. Ocorrência precoce da mosca-das-frutas em ameixas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 349-350, 1999.

SALLES, L.A.B. Biologia e ciclo de vida. 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.

SALLES, L.A.B. Conheça e controle o terror dos pomares: Mosca-das-frutas. **Caderno técnico cultivar HF**, Pelotas, v. 1, n. 5, p. 1-11, 2001.

SARMIENTO, C.E.; AGUIRRE H.; MARTÍNEZ A.J. *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) y sus asociados: dinámica de emergencia de sus parasitoides en frutos de tres especies de plantas. **Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle**, Cali, v. 13, n. 1, p. 25-32, 2012.

SATO, G.S.; ASSUMPCÃO, R. Mapeamento e análise da produção do caqui no Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 47-54, 2002.

SEREPÁ, M.H.; GRAY, V.M. Draft whole-genome sequence of *Serratia marcescens* strain MCB, associated with *Oscheius* sp. MCB (Nematoda: Rhabditidae) isolated from South Africa. **Genome Announcements**, Washington, v. 2, n. 5, p. 911-914, 2014.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; HAN, R.; DOLINKSI, C. Entomopathogenic nematode production and application technology. **Journal of Nematology**, College Park, v. 44, n. 2, p. 206–217, 2012.

SILVA, F.F. **Espécie de moscas frugívoras (Diptera: Tephritidae e Lonchaeidae), quantificação de danos e avaliação de medidas para o seu manejo em pomares orgânicos de citros**. 2005. 152 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2005.

SIVINSKI, J.; VULINEC, K.; ALUJA, M. Ovipositor length in a guild of parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) attacking *Anastrepha* spp. fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Southern Mexico. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 94, n. 6, p. 886-895, 2001.

SMART, G.C; NGUYEN, K.B., *Rhabditis (Oscheius) pheropsophi* n. sp. (Rhabditida: Rhabditidae). **Journal of Nematology**, College Park, v. 22, n. 1, p. 19 -24. 1994.

SOUZA FILHO, M.F. **Infestação de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae e Lonchaeidae) relacionada à fenologia da goiabeira (*Psidium guajava* L), nespereira (*Eriobotrya japonica* Lindl.) e do pessegueiro (*Prunus persica* Batsch).** 2006. 125 f. Tese (Doutorado em Entomologia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

STOCK, S.P.; CAICEDO, A.M.; CALATAYUD, P.A. *Rhabditis (Oscheius) colombiana* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae), a necromenic associate of the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* (Hemiptera: Cydnidae) from the Cauca Valley, Colombia. **Nematology**, College Park, v. 7, n. 3, p. 363-373. 2005.

SUGAYAMA, R.L.; BRANCO, E.S.; MALAVASI, A.; KOVALESKI, A.; NORA, I. Oviposition behavior and preference of *Anastrepha fraterculus* in apple and dial pattern of activity in an apple orchard in Brazil. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 83, n. 2, p. 239-245, 1997.

SUGAYAMA, R.L.; KOVALESKI, A.; LIEDO, P.; MALAVASI, A. Colonization of a new fruit crop by *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in Brazil: a demographic analysis. **Environmental Entomology**, College Park, v. 27, n. 3, p. 642-648, 1998.

TAUFER, M.; NASCIMENTO, J.C.; CRUZ, I.B.M.; OLIVEIRA, A.L.K. Efeito da temperatura na maturação ovariana e longevidade de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, n. 4, p. 639-648, 2000.

TEIXEIRA, R.; BOFF, M.I.C.; RIBEIRO, L.G.; BOFF, P. Bordadura de pomar e flutuação populacional de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) em sistema orgânico de produção de maçã. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 16, n. 1, p. 33-39, 2015.

TOLEDO, J.; GURGÚA, J.L.; LIEDO, P.; IBARRA, J.E.; OROPEZA, A. Parasitismo de larvas y pupas de la mosca mexicana de la fruta, *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae) por el nemátodo *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Rhabditida: Steinernematidae). **Vedalia**, Chiapas, v. 8, n. 1, p. 27-36, 2001.

TOLEDO, J.; PEREZ, C.; LIEDO, P.; IBARRA, J.E. Susceptibilidad de larvas de *Anastrepha obliqua* Macquart (Diptera: Tephritidae) a *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) (Rhabditida: Heterorhabditidae) en condiciones de laboratorio. **Vedalia**, Chiapas, v. 12, n. 1, p. 11-22, 2005a.

TOLEDO, J.; IBARRA, J.E.; LIEDO, P.; GÓMEZ, A.; RASGADO, M.A.; WILLIAMS, T. Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae by *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) under laboratory and field conditions. **Biocontrol Science and Technology**, London, v. 15, n. 6, p. 627-634, 2005b.

TOLEDO, J.; RASGADO, M.A.; IBARRA, J.E.; GÓMEZ, A.; LIEDO, P.; WILLIAMS, T. Infection of *Anastrepha ludens* following soil applications of *Heterorhabditis bacteriophora* in mango orchard. **Entomologia Experimentalis el Applicata**, Dordrecht, v. 119, n. 2, p. 155-162, 2006a.

TOLEDO, J.; ROJAS, R.; IBARRA, J.E. Efficiency of *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae) on *Anastrepha serpentina* (Diptera: Tephritidae) larvae under laboratory conditions. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 89, n. 4, p. 524-526, 2006b.

TOLEDO, J.; SÁNCHEZ, J.E.; WILLIAMS, T.; GÓMEZ, A.; MONTOYA, P.; IBARRA, J.E. Effect of soil moisture on the persistence and efficacy of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) against *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 97, n. 2, p. 528-533, 2014.

TORRES-BARRAGAN, A.; SUAZOB, A.; BUHLERC, W.G.; CARDOZA, Y.J. Studies on the entomopathogenicity and bacterial associates of the nematode *Oscheius carolinensis*. **Biological Control**, Maryland, v. 59, n. 2, p. 123–129, 2011.

URAMOTO, K.; WALDER J.M.M.; ZUCCHI, R.A. Biodiversidade de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) no campus da ESALQ-USP, Piracicaba, São Paulo. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 48, n. 1, p. 33-39, 2004.

URAMOTO, K. **Diversidade de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em pomares comerciais de papaya e em áreas remanescentes de Mata Atlântica e suas plantas hospedeiras nativas, no município de Linhares, Espírito Santo**. 2007. 105 f. Tese (Doutorado em Entomologia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2007.

VOSS, M.; ANDALÓ, V.; NEGRISOLI-JÚNIOR, A.S.; BARBOSA-NEGRISOLI, C.R. **Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematoides entomopatogênicos**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009, 44p. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/853176>>. Acesso em: 21 Mai. 2013.

YE, A.; TORRES-BARRAGAN, A.; CARDOZA, Y.J. *Oscheius carolinensis* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae), a potential entomopathogenic nematode from vermicompost. **Nematology**, College Park, v. 12, n. 1, p. 121-13, 2011.

WHARTON, R.A. Bionomics of the Braconidae. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 38, p. 121-143, 1993.

ZAMBOLIN, L. (Ed.). **Manejo integrado: Doenças, pragas e plantas daninhas**. Viçosa: UFV, 2000. 416 p.

ZUCCHI, R.A. Espécies de *Anastrepha*, sinônimas, plantas hospedeiras e parasitoides. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Mosca das frutas de importância no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 41-48.

## ATTACHMENT I

TABLE 1. Number of insecticide applications in apple 1 and 2 orchards during each phenological phase, in two crop times in Porto Amazonas, Paraná, Brazil.

Crop	Plant phase	Apple 1		Apple 2	
		Number of applications	Insecticide (number)	Number of applications	Insecticide (number)
1	growth	5	organophosphate (5)	3	anthranilamide (1) organophosphate (2)
1	maturation	5	carbaryl (2) organophosphate (3)	2	organophosphate (2)
1	harvest	3	espirodiclofen (2) organophosphate (1)	1	organophosphate (1)
1	post-harvest	0		0	
2	growth	4	organophosphate (4)	0	
2	maturation	3	organophosphate (3)	3	organophosphate (3)
2	harvest	3	organophosphate (2) <i>Bacillus thuringiensis</i> (1)	2	organophosphate (2)
2	post-harvest	0		1	organophosphate (1)



## ATTACHMENT II

TABLE 1. Number of insecticide applications in persimmon and peach orchards during each phenological phase, in two crop times in Porto Amazonas, Paraná, Brazil.

Crop	Plant phase	Persimmon		Peach	
		Number of applications	Insecticide (number)	Number of applications	Insecticide (number)
1	growth	8	espirodiclofen (2) imidacloprid (2) <i>Bacillus thuringiensis</i> (1) organophosphate (2) novaluron (1)		
1	maturation	4	<i>B. thuringiensis</i> (3) espirodiclofen (1)	4	organophosphate (4)
1	harvest	2	<i>B. thuringiensis</i> (1) espirodiclofen (1)	4	organophosphate (4)
1	post-harvest	0		3	organophosphate (3)
2	growth	7	organophosphate (3) anthranilamide (3) espirodiclofen (1)	2	organophosphate (2)
2	maturation	6	espirodiclofen (3) <i>B. thuringiensis</i> (1) novaluron (1) antranilamide (1)	3	organophosphate (3)
2	harvest	0		6	organophosphate (3) <i>B. thuringiensis</i> (3)
2	post-harvest	3	espirodiclofen (3)	0	
3	growth			0	

## ATTACHMENT III

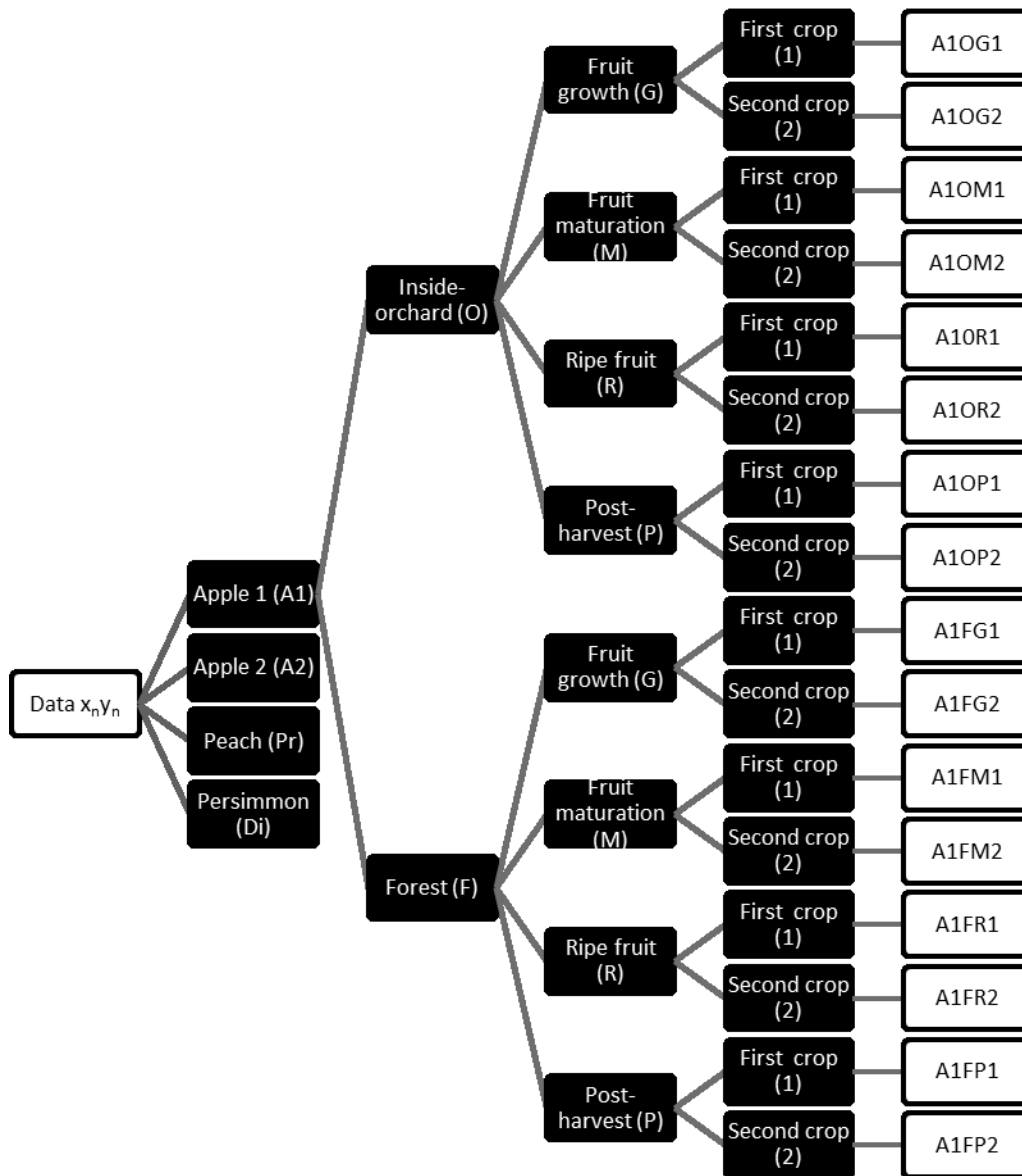


FIGURE 1. Example of data combination of commercial species, place, phenological phase and crop (year) in cases for Principal Component Analysis. The same procedure drawn bellow for apple 1 orchard was used for the other commercial species apple 2, peach and persimmon.

## ATTACHMENT IV

TABLE 1. Mathematical operations applied in each response variable for data combination in cases (Attachment III).

Variable	Code	Operation
Number of <i>Anastrepha</i> sp. trapped by day	An	Mean of the observations in the case
Number of pupae recovered per fruit	PPF	Mean of the observations in the case
Number of parasitoids trapped by day	Pa	Mean of the observations in the case
Number of events of insecticide spraying	Sp	Sum of events in the case
Presence of ripe fruits	RF	Attributed 1 for presence or 0 for absence in the case
Floristic richness	Ri	Number of arboreal and fruit-producer bush species in the case
Number of <i>A. fraterculus</i> hosts	Ho	Number of host plant species in the case
Pluvial precipitation	Rain	Mean daily-accumulated pluvial precipitation in the case
Average air temperature	Tav	Mean daily-average air temperature in the case
Minimum air temperature	Tmi	Mean daily-minimum air temperature in the case
Maximum air temperature	Tma	Mean daily-maximum air temperature in the case
Air relative humidity	R.U.	Mean daily-average air relative humidity