



**MECANISMOS DE DEFESA E CONTROLE DE *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (DIPTERA: TEPHRITIDAE) EXPOSTAS A NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS**

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

ROSITA DE FÁTIMA RODRIGUES TRENTINI

**MECANISMOS DE DEFESA E CONTROLE DE *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (DIPTERA: TEPHRITIDAE) EXPOSTAS A NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS**

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

CURITIBA

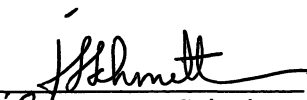
1996

**ROSITA DE FÁTIMA RODRIGUES - TRENTINI**

**MECANISMOS DE DEFESA E CONTROLE DE *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (DIPTERA: TEPHRITIDAE) EXPOSTAS A NEMATÓIDES ENTOMOPATOGENÉTICOS**

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

**Aprovada em 16 de dezembro de 1996**

  
Dra. Aurea Teresa Schmitt  
(orientadora)

  
Dra. Luciane Marinoni

  
Dr. Claudio Jose Barros de Carvalho

**A Deus , pelo dom da vida**  
**AGRADEÇO**

**Ao Egon Frederico Trentini**  
**pelo apoio e companheirismo,**  
**presença constante em todos**  
**os momentos**

**DEDICO**

**À todos que passam em**  
**nossos caminhos, deixando**  
**um pouco de si e levando**  
**um pouco de nós**

**OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade de crescimento profissional.

À Dra. Áurea T. Schmitt, pesquisadora da EPAGRI\EEI de Itajaí (SC), pela orientação deste trabalho.

À Dra. Lúcia M. de Almeida, profa. do Departamento de Zoologia da UFPR, pela co-orientação, amizade e respeito durante o desenvolvimento da tese.

À Dra. Marineide M. Aguilera, profa. da Universidade Federal de São Carlos de Araras (SP), pelo fornecimento dos nematóides, idéias e sugestões.

Ao Dr. Luis A. B. Salles, pesquisador da EMBRAPA de Pelotas (RS), pelas pupas de *Anastrepha fraterculus*.

Ao Eng. Agrônomo Ademir Pegoraro, professor do Departamento de Zootecnia da UFPR, pelo fornecimento de favos-de-abelha e larvas de *Galleria mellonella*.

A todos os colegas da EPAGRI\EEI de Itajaí (SC), em especial ao Eng. Agrônomo Lucas Miura pelo uso do laboratório, sugestões, apoio, amizade e respeito.

Ao Departamento de Estatística da UFPR, e ao Dr. Adilson B. de Oliveira da EMBRAPA - CNPFlorestas, pelo auxílio na análise estatística da tese.

Ao Estatístico Henri Stuker, pesquisador da EPAGRI/EEI de Itajaí (SC), pela revisão final da parte estatística da tese.

Aos colegas do curso de mestrado Cláudia H. Santos, Crisleide M. Lazzarotto, Luis G. Santos Neto, Maria S. P. Leite e Maurício O. Moura pelo convívio nos momentos difíceis e alegres, fortalecendo a nossa amizade.

Ao colega Airton Pinto Junior, aluno de doutorado do Curso de Pós-Graduação em Entomologia, pelo auxílio em muitas fases do curso.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Entomologia, pela transmissão de seus conhecimentos.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## Índice

|                                                                                                                                |             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Lista de tabelas.....</b>                                                                                                   | <b>viii</b> |
| <b>Lista de figuras.....</b>                                                                                                   | <b>x</b>    |
| <b>Resumo.....</b>                                                                                                             | <b>xii</b>  |
| <b>Summary.....</b>                                                                                                            | <b>xiii</b> |
| <b>1 - INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                     | <b>01</b>   |
| <b>2 - REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                                                                          | <b>03</b>   |
| <b>2.1 - Moscas-das-frutas do gênero <i>Anastrepha</i> Schiner, 1868.....</b>                                                  | <b>03</b>   |
| 2.1.1 - Distribuição geográfica e hospedeiros.....                                                                             | 03          |
| 2.1.2 - Aspectos biológicos de <i>Anastrepha fraterculus</i> .....                                                             | 04          |
| 2.1.3 - Fatores abióticos que afetam <i>A. fraterculus</i> : Temperatura, umidade relativa e fotoperíodo.....                  | 05          |
| 2.1.4 - Técnicas de controle.....                                                                                              | 06          |
| <b>2.2 - Nematóides entomopatogênicos.....</b>                                                                                 | <b>07</b>   |
| 2.2.1 - Interação com o hospedeiro, reprodução do nematóide e associação simbiótica com a bactéria <i>Xenorhabdus</i> spp..... | 07          |
| 2.2.2 - Fatores ambientais que afetam os nematóides.....                                                                       | 09          |
| 2.2.3 - Mecanismos de defesa dos insetos: tipos e modo de ação.....                                                            | 13          |
| 2.2.4 - Hospedeiros.....                                                                                                       | 15          |
| 2.2.5 - Controle de Moscas-das-frutas com nematóides.....                                                                      | 16          |
| <b>3 - OBJETIVOS.....</b>                                                                                                      | <b>18</b>   |
| <b>4 - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                             | <b>19</b>   |
| 4.1 - Local de desenvolvimento dos experimentos.....                                                                           | 19          |

|                                                                                                                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2 - Criação de <i>Anastrepha fraterculus</i> em laboratório.....                                                                                                             | 19        |
| 4.3 - Criação de <i>Galleria mellonella</i> em laboratório.....                                                                                                                | 21        |
| 4.4 - Produção “in vivo” de <i>Steinernema carpocapsae</i> e <i>S. glaseri</i> em lagartas de <i>G. mellonella</i> . Coleta, estoque e preparo das dosagens de nematóides..... | 22        |
| 4.5 - Mecanismos de defesa de <i>A. fraterculus</i> contra o parasitismo de <i>S. carpocapsae</i> e <i>S. glaseri</i> .....                                                    | 24        |
| 4.6 - Controle de <i>A. fraterculus</i> inoculadas com diferentes dosagens de <i>S. carpocapsae</i> e <i>S. glaseri</i> .....                                                  | 25        |
| 4.7 - Controle de <i>A. fraterculus</i> com <i>S. carpocapsae</i> em diferentes temperaturas.....                                                                              | 25        |
| 4.8 - Controle de <i>A. fraterculus</i> com aplicação de <i>S. carpocapsae</i> em solo textura barro-argilosa.....                                                             | 26        |
| 4.9 - Análise estatística.....                                                                                                                                                 | 26        |
| <b>5 - RESULTADOS.....</b>                                                                                                                                                     | <b>28</b> |
| 5.1 - Mecanismos de defesa de <i>A. fraterculus</i> contra o parasitismo de <i>S. carpocapsae</i> e <i>S. glaseri</i> .....                                                    | 28        |
| 5.2 - Controle de <i>A. fraterculus</i> inoculadas com diferentes dosagens de <i>S. carpocapsae</i> e <i>S. glaseri</i> .....                                                  | 34        |
| 5.3 - Controle de <i>A. fraterculus</i> com <i>S. carpocapsae</i> em diferentes temperaturas.....                                                                              | 42        |
| 5.4 - Controle de <i>A. fraterculus</i> com aplicação de <i>S. carpocapsae</i> em solo textura barro-argilosa.....                                                             | 46        |
| <b>6 - DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                                                                      | <b>48</b> |
| <b>7 - CONCLUSÕES.....</b>                                                                                                                                                     | <b>55</b> |
| <b>Bibliografia citada.....</b>                                                                                                                                                | <b>58</b> |
| <b>Apêndices.....</b>                                                                                                                                                          | <b>69</b> |

## Lista de tabelas

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Porcentagem de mortalidade de <i>A. fraterculus</i> inoculadas com nematóides entomopatogênicos, na dose de 316 infectivos/larva.....                              | 28 |
| Tabela 2 - Porcentagem de encapsulamento e melanização de larvas e pupas de <i>A. fraterculus</i> parasitadas por <i>S. carpocapsae</i> e <i>S. glaseri</i> .....             | 32 |
| Tabela 3 - Porcentagem de mortalidade de <i>A. fraterculus</i> inoculadas com diferentes dosagens de <i>S. carpocapsae</i> e <i>S. glaseri</i> .....                          | 35 |
| Tabela 4 - Porcentagem de formação de pupas de <i>A. fraterculus</i> , submetidas a <i>S. carpocapsae</i> e <i>S. glaseri</i> .....                                           | 36 |
| Tabela 5 - $DL_{50}$ de larvas inoculadas com seis contrações de <i>S. carpocapsae</i> e <i>S. glaseri</i> .....                                                              | 36 |
| Tabela 6 - Número médio de <i>S. carpocapsae</i> e <i>S. glaseri</i> que penetrou nas larvas de <i>A. fraterculus</i> em cinco dosagens.....                                  | 40 |
| Tabela 7 - Comparação de médias do percentual de mortalidade de <i>A. fraterculus</i> , inoculadas com diferentes dosagens de <i>S. carpocapsae</i> e <i>S. glaseri</i> ..... | 41 |
| Tabela 8 - Comparação de médias do percentual de mortalidade de <i>A. fraterculus</i> inoculadas com <i>S. carpocapsae</i> e <i>S. glaseri</i> .....                          | 41 |
| Tabela 9 - Porcentagem de mortalidade de larvas de <i>A. fraterculus</i> , inoculadas com <i>S. carpocapsae</i> em diferentes temperaturas e dosagens.....                    | 43 |
| Tabela 10 - Comparação de médias do percentual de mortalidade de <i>A. fraterculus</i> , inoculadas com <i>S. carpocapsae</i> em diferentes dosagens.....                     | 44 |

|                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 11 - Comparação de médias de mortalidade de <i>A. fraterculus</i> , inoculadas com <i>S. carpocapsae</i> em diferentes temperaturas.....                                                          | 44 |
| Tabela 12 - Porcentagem média do efeito de diferentes dosagens na formação de pupas sadias e parasitadas de <i>A. fraterculus</i> , inoculadas com <i>S. carpocapsae</i> em diferentes temperaturas..... | 45 |
| Tabela 13 - Porcentagem média de formação de pupas de <i>A. fraterculus</i> , das quatro temperaturas, expostas a <i>S. carpocapsae</i> em diferentes dosagens.....                                      | 45 |
| Tabela 14 - Porcentagem de pupas e larvas de <i>A. fraterculus</i> sadias e parasitadas por <i>S. carpocapsae</i> , aplicados em solo textura barro argilosa.....                                        | 46 |
| Tabela 15 - Comparação de médias do porcentual de mortalidade de <i>A. fraterculus</i> expostas à diferentes doses de <i>S. carpocapsae</i> em solo textura barro-argilosa.....                          | 47 |
| Tabela 16 - DL <sub>50</sub> das larvas de <i>A. fraterculus</i> parasitadas por <i>S. carpocapsae</i> em solo.....                                                                                      | 47 |

## Lista de figuras

- Figura 1 - Propagação de nematóides entomopatogênicos em lagartas de *Galleria mellonella*. **A** - Lagartas inoculadas com *S. carpocapsae* em placas de Petri; **B** - Liberação de infectivos de *S. glaseri* em lagartas de *G. mellonella* (aumento 12X); **C** - Armadilha de White.....27
- Figura 2 - Porcentagem de mortalidade de *A. fraterculus* submetidas a nematóides entomopatogênicos, na dose de 316 infectivos/larva.....29
- Figura 3 - Processo de encapsulamento em larvas de *A. fraterculus* parasitadas por nematóides. **A** - Fêmea de *S. carpocapsae* encapsulada na parte anterior da pupa (aparelho bucal), com grande formação de grânulos cristalinos (aumento 12X); **B** - Grânulos cristalinos na hemolinfa de uma larva parasitada por *S. carpocapsae* (aumento 16X); **C**- Grânulos cristalinos aderido em todo tegumento de uma larva parasitada por *S. glaseri* (aumento 13X).....30
- Figura 4 - Processo de melanização em larvas de *A. fraterculus* parasitadas por *S. glaseri*.  
**A** - Manchas melanóticas formadas 24 horas após a penetração do nematóide (aumento 13X); **B** - Manchas melanóticas formadas 48 horas após a penetração do nematóide (aumento 12X); **C** - Melanização da pupa, em todo tegumento (aumento 12X).....31
- Figura 5 - Porcentagem de desenvolvimento de *S. carpocapsae* em larvas de *A. fraterculus* com reações de encapsulamento, nove dias após a mortalidade.....33
- Figura 6 - Percentual de desenvolvimento de *S. glaseri* em larvas de *A. fraterculus* com reações de encapsulamento e melanização, nove dias após a mortalidade.....33
- Figura 7 - Porcentagem de mortalidade de *A. fraterculus* inoculadas com diferentes dosagens de *S. carpocapsae* e *S. glaseri*.....35

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 8 - Porcentagem de mortalidade de larvas, e larvas (pupas) de <i>A. fraterculus</i> parasitadas por <i>S. carpocapsae</i> e <i>S. glaseri</i> e continuaram o processo de formação de pupas.....                                                                                        | 36 |
| Figura 9 - Desenvolvimento de <i>S. carpocapsae</i> em larvas de <i>A. fraterculus</i> (aumento 12X).<br>A - Adultos de primeira geração; B - Adultos e juvenis de segunda geração, C - infectivos de terceira geração.....                                                                    | 38 |
| Figura 10 - Liberação de nematóides infectivos (L <sub>3</sub> ) e adultos ao meio (aumento 12X).<br>A - liberação de L <sub>3</sub> de <i>S. carpocapsae</i> ; B - liberação de L <sub>3</sub> de <i>S. glaseri</i> , C - Liberação de adultos de primeira geração de <i>S. glaseri</i> ..... | 39 |
| Figura 11 - Porcentagem de mortalidade de larvas de <i>A. fraterculus</i> , expostas a <i>S. carpocapsae</i> em diferentes temperaturas e dosagens.....                                                                                                                                        | 43 |
| Figura 12 - Porcentagem de larvas e pupas de <i>A. fraterculus</i> sadias e parasitadas por <i>S. carpocapsae</i> em solo textura barro argilosa.....                                                                                                                                          | 47 |

## Resumo

Este trabalho teve como objetivo estudar os mecanismos de defesa e o controle de larvas de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae), quando inoculadas com nematóides entomopatogênicos *Steinernema carpocapsae* “strain” All (Weiser, 1955) e *S. glaseri* “strain” Alcídia (Steiner, 1929) (Rhabditida: Steinernematidae).

Nas observações para análise dos mecanismos de defesa (encapsulamento e melanização), foram usados 316 nematóides/larva, e foi observado que as larvas de *A. fraterculus* são capazes de encapsular *S. carpocapsae* e *S. glaseri*. A melanização ocorreu somente em larvas parasitadas por *S. glaseri*, resultando em maior mortalidade desta espécie dentro das larvas devido a anóxia.

A espécie *S. carpocapsae* foi tão efetiva quanto *S. glaseri*, ocorrendo interação significativa entre as diferentes doses e espécies. Nas doses de 5 e 316 nematóides/larva, a mortalidade causada por *S. carpocapsae* foi de 25,33 a 85,33 %. Nas mesmas dosagens, *S. glaseri* proporcionou 14,67 a 86,67 % de mortalidade. A DL<sub>50</sub> para larvas expostas à *S. carpocapsae* foi de 32,35 nematóides/larva e para *S. glaseri* foi de 41,26 nematóides/larva..

*S. carpocapsae* produziu 10.592 infectivos (L<sub>3</sub>) de terceira geração/larva, e *S. glaseri* produziu 1.056 infectivos de segunda geração/larva.

Observando o parasitismo de *S. carpocapsae* em diferentes temperaturas (15, 20, 25 e 30 °C), foi observado que a maior mortalidade de larvas de *A. fraterculus* ocorreu a 25°C (91,76%) do que em 15°C (21,62%), 20°C (82,43%) e 30°C (79,17%), na dosagem de 5 a 316 nematóides/larva. Houve diferença significativa entre as diferentes doses ( $p < 0,05$ ).

Em solo, quando foi usado 188, 531 e 1497 *S. carpocapsae*/cm<sup>2</sup> a mortalidade das larvas de *A. fraterculus* foi de 31,51 %, 61,64 % e 91,74 %, respectivamente. A DL<sub>50</sub> das larvas de *A. fraterculus*, foi de 343,57 nematóides/cm<sup>2</sup> de solo textura barro-argilosa.

## SUMMARY

The objective of this research was to study the defense mechanisms and the control of the late third instars of *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae), when exposed to entomogenous nematodes *Steinernema carpocapsae* All (Weiser, 1955) and *S. glaseri* Alcídia (Steiner, 1929) (Rhabditida: Steinernematidae).

To study the defense mechanisms (encapsulation and melanization) were used 316 nematodes/larvae and was found that larvae of *A. fraterculus* are able to encapsulate *S. carpocapsae* e *S. glaseri*. The melanization occur only in *S. glaseri* resulting greater mortality of this specie inside of larvae, due to anoxia.

*S. carpocapsae* was as effective as *S. glaseri* demonstrating significant correlation between doses and species. The mortality due to *S. carpocapsae* with 5 and 316 nematodes/larvae was 25,33 and 85,33%. In the same dose, *S. glaseri* achieve 14,67 and 86,67% of mortality. The DL<sub>50</sub> value for *S. carpocapsae* was found to be 32,35 nematodes/larvae and DL<sub>50</sub> value for *S. glaseri* was 41,26 nematodes/larvae.

*S. carpocapsae* produced 10.592 infectives juveniles (L<sub>3</sub>) of third generation/larvae and *S. glaseri* 1.056 infectives of second generation/larvae.

The greater mortality of *A. fraterculus* due to parasitism of *S. carpocapsae* at different temperatures (15, 20, 25 e 30°C) was found at 25°C (91,76%) compared with 15°C (21,62%), 20°C (82,43%) e 30°C (79,17%) with 316 nematodes/larvae.

In soil, when was applied 188, 531 and 1497 *S. carpocapsae*/cm<sup>2</sup>, *A. fraterculus* mortality was found to be 31,51%, 61,64% and 91,74% respectively. The DL<sub>50</sub> for *A. fraterculus* larvae was 343,57 nematodes/cm<sup>2</sup> of soil with clay-loam texture.

## 1 - INTRODUÇÃO

A espécie *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae), conhecida como mosca das frutas sulamericana, encontra-se distribuída pela América Latina (Christenson & Foote, 1960), causando inúmeros danos à fruticultura brasileira. Causa danos diretos devido a alimentação das larvas inutilizando as frutas para o consumo, e indiretos devido a barreiras quarentenárias de outros países, que visam impedir a introdução de espécies exóticas de moscas-das-frutas em seus territórios.

A estimativa de perdas econômicas em decorrência dos danos provocados pelo ataque das moscas-das-frutas não é disponível para a maioria das culturas.

Foram estimados em 11,6% os danos de *A. fraterculus* em 21 pomares comerciais de maçã que tinham recebido de três a seis tratamentos com inseticidas em cobertura total (Kovaleski *et al.*, 1984).

Orlando & Sampaio (1973), também citam que no estado de São Paulo, se não houver controle das moscas-das-frutas, ocorre a destruição total da produção de pêssego, goiaba e uvaia.

De acordo com Koller (no prelo), no estado de Santa Catarina, as perdas na produção de citros devido ao ataque das moscas-das-frutas chegam a 50%, de acordo com as regiões e com as diferentes cultivares.

Nora (1994) afirma que em algumas áreas onde não são utilizados métodos de controle, as perdas dos pomares podem ser totais.

No Brasil, até o momento, o controle dos tefritídeos se restringe ao controle químico, porém, os países importadores de frutas “in natura” estão cada vez mais exigentes quanto a qualidade do produto e especialmente quanto a ausência de resíduos de defensivos

agrícolas (Nascimento & Carvalho, 1996). Desta forma, existe a necessidade de buscar alternativas para o controle das moscas-das-frutas, visando a utilização de produtos seletivos, e também o uso do manejo integrado. O controle biológico, considerado um componente essencial e viável do manejo integrado, além de reduzir efetivamente a utilização de produtos químicos e a contaminação do meio ambiente, poderá também controlar populações infestantes, em culturas sem importância comercial, mas que contribuem para o aumento populacional de moscas que irão infestar os pomares comerciais.

Os nematóides entomopatogênicos do gênero *Steinernema* Travassos, 1927 são agentes com grande potencial para o controle biológico de vários insetos pragas. A temperatura e os mecanismos de defesa dos insetos são fatores limitantes para sua eficiência, pois o primeiro afeta a mobilidade, sobrevivência, desenvolvimento e reprodução do nematóide, e o segundo, afeta principalmente a reprodução do parasito quando este é aprisionado em cápsulas, ou a parede do hospedeiro é melanizada, ocorrendo algumas vezes a morte do invasor por anóxia.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o controle biológico de larvas de *Anastrepha fraterculus* em fase de pré-pupa inoculadas com *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) e *S. glaseri* (Steiner, 1929) (Rhabditida: Steinernematidae).

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 - Moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* Schiner, 1868

#### 2.1.1 - Distribuição geográfica e hospedeiros

As espécies do gênero *Anastrepha* Schiner, 1868 (Diptera: Tephritidae), estão restritas a condições climáticas tropicais e subtropicais, encontradas nas Ilhas do Caribe e nos estados do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. O gênero apresenta 184 espécies descritas, porém a maioria é pouco conhecida quanto a sua biologia e hospedeiros. As sete espécies mais citadas, devido à sua importância econômica, são as seguintes: *A. fraterculus* (Wiedemann), *A. grandis* (Macquart), *A. ludens* (Loew), *A. obliqua* (Macquart), *A. serpentina* (Wiedemann), *A. striata* Schiner e *A. suspensa* (Loew) (Aluja, 1994).

De acordo com Zucchi (1988) no Brasil ocorrem 78 espécies deste gênero, sendo oito as de maior ocorrência: *A. bistrigata* Bezzi, *A. distincta* Greene, *A. fraterculus*, *A. grandis*, *A. obliqua*, *A. pseudoparallela* (Loew), *A. serpentina*, *A. sororcula* Zucchi. O gênero *Anastrepha* foi constatado em 55 hospedeiros (18 famílias botânicas, 29 gêneros), com 34 plantas nativas da América do Sul e 21 introduzidas da Europa, África e Ásia (Gomes, 1973; Malavasi *et al.*, 1980).

A espécie *A. fraterculus*, originalmente descrita no Brasil, é conhecida como mosca das frutas sulamericana, e possui considerável importância econômica do México até a Argentina. Tem sido encontrada em pelo menos 22 hospedeiros, incluindo culturas importantes como maçã, pêssego, laranja, manga, café, caqui, e por último em frutos de quivi. Possui hospedeiros com ampla distribuição geográfica, como goiaba, pitanga e

manga, sendo encontradas praticamente em todo o território nacional. O grau de preferência entre os hospedeiros é variável. Frutos silvestres como uvaia, pitanga e guabiroba, apresentam alto índice de infestação, funcionando como repositórios naturais (Christenson & Foote, 1960; Malavasi & Morgante, 1980; Nascimento *et al.*, 1982; Bressan & Telles, 1991; Hickel & Schuck, 1993).

### 2.1.2 - Aspectos biológicos de *A. fraterculus*

*Anastrepha* é constituído por espécies multivoltinas (mais de uma geração anual e sem diapausa aparente), distribuindo-se em regiões tropicais e subtropicais. Caracterizam-se por sua habilidade colonizadora, são polífagas, dispersam-se amplamente, e se reproduzem com rapidez, explorando o ambiente de forma a deixar o maior número possível de descendentes (Bateman, 1972).

*A. fraterculus* ovipositam nos frutos. O número total de ovos colocados por fêmea varia grandemente e o período de incubação também varia de acordo com a espécie. De acordo com Lopes (1986) e Martins (1986), *A. fraterculus* em testes de laboratório com temperatura de 25 °C, fotofase de 12 a 14 horas e umidade relativa de  $80 \pm 10 \%$ , produzem em média 312 a 394,2 ovos viáveis, os quais levam em média três dias para eclodir. A eclosão da larva ocorre no interior do fruto. Após a eclosão, a larva começa a se alimentar da polpa do fruto, passando por três instares. Quando completamente desenvolvidas, as larvas abandonam o fruto para empupar no solo, a cerca de 1 cm da superfície. De acordo com as variações climáticas e com as regiões geográficas, o período larval dura de 8 a 25 dias, e o período pupal de 10 a 25 dias. O ciclo do ovo a adulto varia de 21 a 50 dias. As fêmeas, após a emergência, passam por um período de pré-oviposição de 9 a 30 dias, e ovipositam em média ao longo de 80 dias. A longevidade da fêmea é de 69

a 87,8 dias, e a do macho é de 156,65 dias (Christenson & Foote, 1960; Gonzalez *et al.*, 1971; Baliu & Malavasi, 1985; Lopes, 1986; Martins, 1986).

### **2.1.3 - Fatores abióticos que afetam *A. fraterculus*: temperatura, umidade relativa e fotoperíodo**

As maiores infestações de *A. fraterculus* ocorrem em temperaturas entre 25 - 26°C, com 70 - 75% de umidade relativa do ar. A temperatura onde estas moscas possuem maior atividade está entre 22 a 26°C; em temperaturas abaixo de 18°C e acima de 27°C as moscas permanecem em repouso (Herrera & Viñas, 1977; Malavasi, 1984). Salles *et al.* (1995) avaliando a emergência deste inseto em diferentes temperaturas e umidade relativa, constatou que abaixo de 10°C e acima de 35°C não ocorre emergência, sendo 25°C a temperatura ideal, pois as moscas emergiram em menor tempo (14,5 a 15,5 dias) e em maior percentual (89,52%).

Christenson & Foote (1960) concluem que o fotoperíodo deve ser significativo para os tefritídeos, pois os adultos são inativos à noite e durante períodos de chuva. Para Martins (1986) o fotoperíodo onde *A. fraterculus* teve o melhor desempenho foi fotofase: escotofase 14:10. Entretanto Salles (1993), trabalhando com fotofase de seis, 10, 14, 18 e 24 horas concluiu que não houve influência significativa do fotoperíodo sobre a oviposição, fecundidade, emergência e longevidade dos insetos, sugerindo que esta espécie pode adaptar-se muito bem em regiões com fotofase longa ou curta. De acordo com Burg (1991), a maioria das espécies do gênero *Anastrepha* mostram maior atividade sexual em uma parte restrita do dia. *A. fraterculus* tem maior atividade entre sete e nove horas da manhã, em contraste com *A. ludens*, que é das seis às oito horas da noite (Malavasi *et al.*, 1983).

#### **2.1.4 - Técnicas de controle**

No Brasil o controle das moscas-das-frutas se limita ao controle químico com fosforados e organofosforados ou o controle mecânico com o ensacamento dos frutos. O controle químico é recomendado através de pulverização em cobertura total da árvores para matar ovos e/ou larvas no interior dos frutos, e aplicação de iscas atrativas tóxicas, visando o controle de adultos. As pulverizações em cobertura total são realizadas através de tratamentos contínuos, que se repetem seis a oito vezes em função da região, ano e cultura. A aplicação de iscas atrativas tóxicas se repete por até 12 vezes em culturas como pêssago e maçã, e até 20 vezes em certos cultivares de citros (Carvalho, 1988).

O manejo integrado de pragas de frutíferas feito através do monitoramento com armadilhas e atraentes alimentares diminui o uso de inseticidas como também os danos da praga, devido a aplicação do inseticida no momento certo (Carvalho, 1988; Salles, 1991, 1995).

O controle biológico tem sido realizado em vários países com a utilização de Braconidae (Hymenoptera), principalmente da subfamília Opiinae devido a sua especificidade às moscas-das-frutas. Na América do Sul, estes parasitóides estão sendo utilizados apenas na Argentina. No Brasil foram assinaladas 13 espécies de parasitóides, com grande ocorrência de *Doryctobracon areolatos* (Szépligeti). Foi também introduzido da Argentina em 1994 *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead), com a qual estão sendo feitos estudos de adaptação. Até o momento não existem dados conclusivos da eficácia destes parasitóides no controle de moscas-das-frutas no Brasil (Zucchi & Canal D., 1996; Nascimento & Carvalho, 1996)

## **2.2 - Nematóides entomopatogênicos**

### **2.2.1 - Interação com o hospedeiro, reprodução do nematóide e associação simbiótica com a bactéria *Xenorhabdus* spp.**

Os nematóides são agentes de controle biológico promissores devido ao seu alto grau de eficiência para diversos insetos pragas, principalmente para o controle daqueles que passam pelo menos uma fase de seu ciclo de vida no solo (Akhurst, 1986).

Dentro da ordem Rhabditida as duas maiores famílias de nematóides entomopatogênicos são Heterorhabditidae e Steinernematidae (Poinar, 1990 b). Os gêneros *Steinernema* (Travassos) e *Heterorhabditis* Poinar entram nos insetos através dos orifícios naturais (boca, ânus e espiráculos), e penetram na hemolinfa. Os *Heterorhabditis* possuem dentes na parte dorsal que facilitam a sua penetração através da cutícula do inseto. Estes dois gêneros possuem uma bactéria específica do gênero *Xenorhabdus*, a qual, quando liberada na hemolinfa do inseto causa sua morte por septicemia em 24 horas. *Xenorhabdus* spp. pertencem à família Enterobacteriaceae, são anaeróbias facultativas, gram-negativas, não formam esporos ou formas de resistência. A relação entre o nematóide e a bactéria é simbiótica; assim, o nematóide não pode reproduzir-se dentro do inseto sem a bactéria, e a bactéria não pode entrar na hemolinfa para causar infecção sem o nematóide (Georgis, 1992).

As larvas infectivas, de vida livre, são formas jovens de terceiro instar (L<sub>3</sub>), as quais não se alimentam devido a transformações em seu aparelho digestivo que reduz seu metabolismo. Estas larvas carregam a bactéria simbiótica na porção anterior do intestino (Kaya, 1985; Molyneux, 1985). De acordo com Poinar (1990 a), a patogenicidade de

*Xenorhabdus* depende da habilidade deste em se multiplicar na hemocele do hospedeiro e suprimir os mecanismos de defesa do mesmo.

As larvas infectivas procuram ativamente os hospedeiros através de produtos excretados, níveis de dióxido de carbono e gradientes de temperatura. Ao localizar o hospedeiro, penetram-no através de suas aberturas naturais, e ao chegar na hemocele, liberam a bactéria simbiótica. A bactéria se multiplica, causando septicemia e morte do inseto entre 24 a 72 horas, criando ambiente favorável para a reprodução do nematóide, e inibindo o desenvolvimento de outros microrganismos (Akhurst, 1982).

Os nematóides se alimentam da “sopa bacteriana” e de tecidos do hospedeiro, e se reproduzem. Os nematóides de primeira geração de Steinernematidae se desenvolvem em machos e fêmeas dentro do inseto, e copulam para produzir a segunda geração e, algumas vezes, a terceira geração de machos e fêmeas. Os nematóides de primeira geração de Heterorhabditidae se desenvolvem em hermafroditos e, a progênie destes hermafroditos se desenvolvem em machos e fêmeas. Nas duas famílias, os nematóides podem passar por várias gerações dentro do hospedeiro, até produzir os infectivos. Quando o alimento for escasso ou, em consequência de alta densidade populacional de nematóides, os estágios infectivos, carregando a bactéria em seu intestino, abandonam o cadáver do inseto hospedeiro e migram para o solo a procura de novos hospedeiros (Popiel *et al.*, 1989).

Entre temperaturas de 18 a 28°C, o ciclo de vida é completado em seis a 18 dias, dependendo do inseto hospedeiro e da espécie do nematóide (Georgis, 1992; Kaya & Gaugler, 1993). Woodring e Kaya (1988) utilizando uma média de 20 infectivos de *S. carpocapsae*/*G. mellonella* (8º instar), colocados a 23°C por cinco a sete dias, produziram 30 a 50 mil infectivos/lagarta, que começaram a ser liberados no nono dia. Pela técnica de Dutry, produziu-se até 200 mil infectivos/*G. mellonella*. As lagartas foram expostas a

50 infectivos/lagarta, e acondicionadas a 24°C, em aproximadamente oito a 15 dias os infectivos foram liberados (Dutry *et al.*, 1964). A produção de nematóides está ligada também ao tamanho do nematóide, ao tamanho e estágio do hospedeiro e a eficiência da bactéria simbiótica. A DL<sub>50</sub> para insetos suscetíveis é menor do que 50 células bacterianas por inseto, e maior do que 500 células para os menos suscetíveis. O número de células bacterianas carregadas por formas infectivas de *S. carpocapsae* varia entre 20 a 250 (Poinar, 1975, 1990 a, 1990 b; Akhurst & Boemari, 1990).

### **2.2.2 - Fatores ambientais que afetam os nematóides**

O conhecimento da sobrevivência e comportamento das espécies de *Steinernema* e *Heterorhabditis* nos solos é essencial para o desenvolvimento e uso eficiente destes inseticidas biológicos.

Existem vários fatores que afetam os nematóides entomopatogênicos no solo incluindo a textura, porosidade, teor de umidade, aeração, temperatura e componentes químicos dos solos. Além destes fatores, organismos nematófagos do solo devem também destruir um número significativo de nematóides, restringindo o seu uso no controle biológico (Kaya, 1990).

**Solos:** O tipo de solo tem grande influência na sobrevivência e dispersão dos nematóides. A textura do solo afeta a habilidade de infectar o hospedeiro, como também a sua habilidade de dispersão vertical e horizontal. Kung e Gaugler (1990), testando a sobrevivência e a patogenicidade de *S. carpocapsae* e *S. glaseri*, durante 16 semanas, em quatro solos com textura diferente (arenoso, barro-arenoso, barro-argiloso e argiloso), observaram que ocorreram diferenças significativas entre os nematóides em todos os tipos

de solos. *S. carpocapsae* sobreviveu melhor em solo barro-arenoso (44,9%) e *S. glaseri* em solo arenoso (30,1%). A sobrevivência de *S. glaseri* foi menor do que *S. carpocapsae* em todos os tipos de solos. A patogenicidade dos nematóides também se manteve por mais tempo em solos arenoso e barro-arenoso. Em arenoso a patogenicidade se manteve semelhante para as duas espécies, sendo que durante 10 semanas 50% dos nematóides mantiveram a sua patogenicidade.

**Aeração:** As interações do tipo de solo, umidade e aeração afetam os movimentos dos nematóides e o seu consumo de energia. Solos com textura barro-argilosa e argilosa possuem poros pequenos e alto potencial para reter umidade (18 a 28%), resultando em pouca aeração. Os nematóides expostos a aeração ineficiente não utilizam suas reservas de carboidratos de maneira eficaz. Os solos arenosos e barro-arenosos tem maior aeração, pois possuem poros maiores, e baixo potencial de retenção de umidade (10-12%), desta forma os nematóides podem usar suas reservas com eficiência, resultando em maior sobrevivência nesses tipos de solos (Wallace, 1971 e Crole & Matthews, 1977 in *aprid* Kung & Gaugler, 1990).

**Umidade:** A umidade relativa do solo é também um fator importante para a sobrevivência dos nematóides. Simons & Poinar (1973), observaram que *S. carpocapsae* tem boa sobrevivência em solos secos, pois, quando expostos durante 12 dias a umidade relativa de 79,5% e temperatura de 20°C, ocorreu sobrevivência de 90%. Em umidade relativa de 48,4% durante quatro dias, correspondendo a umidade de solo muito seco, ocorreu sobrevivência de 80%. Kung *et al.* (1991), observaram que esteirne nematóides tornam-se inativos e sobrevivem melhor em solos com umidade entre 2 a 4%, sugerindo que

eles podem entrar em estado de anidrobiose. Quando o solo foi reidratado para 16% de umidade, os nematóides continuaram patogênicos.

**Temperatura:** A temperatura é um importante fator a ser considerado, pois pode afetar a mobilidade, sobrevivência, desenvolvimento e a reprodução dos nematóides entomopatogênicos. As temperaturas baixas ou altas podem afetar a patogenicidade dos steinernematídeos e heterorabditídeos, influenciando na atividade do nematóide, ou da bactéria simbiótica, ou de ambos (Kaya, 1990).

Para Steinernematidae, existem diferentes respostas às temperaturas entre várias espécies, entre isolados da mesma espécie de regiões geográficas distintas, e entre isolados da mesma região geográfica (Molyneux, 1986). As diferenças no comportamento às diferentes temperaturas podem estar relacionadas ao clima da localidade em que o nematóide foi originalmente isolado. Entretanto, as espécies ou isolados (“strain”) coletados na mesma latitude podem não apresentar o mesmo comportamento (Fan, 1989).

A sobrevivência e a patogenicidade de *S. carpocapsae* são significativamente maiores em temperaturas entre 5 e 25°C do que em 35°C, ao contrário de *S. glaseri*, onde a sobrevivência e a patogenicidade são maiores em temperaturas entre 15 e 35°C, do que em baixas temperaturas (5°C) (Kung *et al.*, 1991).

Kaya (1977), observando o desenvolvimento de *Neoplectana carpocapsae* (= *S. carpocapsae*) “in vivo” e “in vitro” em diferentes temperaturas, constatou que não ocorreu desenvolvimento nas temperaturas de 10 e acima de 33°C. Em 15, 20 e 25°C ocorreu o desenvolvimento, sendo 25°C a melhor temperatura. A 30°C os nematóides tornaram-se adultos, porém não se reproduziram. Nas culturas “in vivo”, ocorreu liberação de infectivos apenas em temperaturas de 20 e 25°C.

Schmitt (1993) concluiu que *S. carpocapsae* “strains” BM e FC, coletados no Brasil, tem um intervalo de temperatura ótimo para infecção, desenvolvimento e reprodução. *S. carpocapsae* BM é favorecido em temperaturas entre 20 e 30°C, enquanto *S. carpocapsae* FC prefere temperaturas entre 20 e 25°C.

Lagartas de *Galleria mellonella* expostas a diferentes dosagens de *Heterorhabditis heliothidis* Poinar e *S. glaseri* em diferentes temperaturas apresentaram interação significativa entre as temperaturas e os níveis das dosagens. A 5 e 10°C não emergiram os infectivos, sendo 25°C a temperatura em que os nematóides desenvolveram-se mais rápido. A 30°C e na dose de 500 nematóides/lagarta, não ocorreu liberação de infectivos de *H. heliothidis*. A produção de nematóides/inseto foi melhor a 20 e 25°C nas dosagens de 5 a 50 nematóides/inseto (Zervos *et al.*, 1990).

**pH:** Kung *et al.* (1990) mostrou que o pH do solo parece ter pequeno efeito na sobrevivência e patogenicidade de duas espécies de Steinernematidae (*S. carpocapsae* e *S. glaseri*). Eles observaram que por 16 semanas os nematóides sobreviveram melhor em pH oito, seguido pelo pH seis e quatro (porém, não ocorreu diferença significativa entre eles). *S. glaseri* sobreviveu melhor do que *S. carpocapsae* em pH oito. Já em pH 10, após uma semana ocorreu alta mortalidade para as duas espécies, porém, a sobrevivência de *S. carpocapsae* foi significativamente maior do que *S. glaseri*. Quanto a patogenicidade, *S. carpocapsae* diferiu significativamente de *S. glaseri* nos quatro níveis de pH. Duas semanas após, *S. carpocapsae* foi menos patogênico que o *S. glaseri* em pH quatro e seis. Em pH oito a patogenicidade de *S. carpocapsae* caiu drasticamente depois de quatro e oito semanas, sendo menos patogênico do que *S. glaseri* durante todo o experimento. Nenhuma espécie foi patogênica em pH 10, quando testados em lagartas de *G. mellonella*.

**Inimigos naturais:** Os fatores bióticos devem ser considerados na avaliação da persistência de nematóides no campo. Parasitas e predadores nematófagos tendem a diminuir a eficiência de nematóides entomopatogênicos nos solos, reduzindo sua sobrevivência. Fungos, ácaros, colêmbolas e nematóides predadores provavelmente têm impacto negativo na população de nematóides entomopatogênicos. Em estimativas de  $DL_{50}$  com o uso de nematóides entomopatogênicos, houve diferença significativa na mortalidade de insetos quando havia presença de ácaros nematófagos (Epsky *et al.*, 1988).

Fungos nematófagos também são citados, sendo que as espécies *Macrosporium ellipso sporum* e *Arthrobotrys oligospora* capturam, causam infecção e digestão do nematóide num período de 72 horas (Poinar & Jansson, 1986 a). Na presença do fungo *Hirsutella rhossiliensis* o nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis bacteriophora* foi mais eficiente do que Steinernematidae (Timper & Kaya, 1992). Em testes laboratoriais, o fungo *Drechmeria coniospora* ocasionalmente captura infectivos juvenis, porém não consegue penetrá-los, parasitando apenas adultos e estágios pré-infectivos (Poinar & Jansson, 1986 b).

Lagartas de *G. mellonella* parasitadas por *S. glaseri* infectados por protozoários microsporídeos produziram pouco infectivos (1000 por lagarta), com muitos nematóides hialinos, menores do que o normal e outros deformados (Poinar, 1988).

### **2.2.3 - Mecanismos de defesa dos insetos: Tipos e modo de ação**

O encapsulamento e a melanização são mecanismos de defesa dos insetos, que ocorrem quando estes são invadidos por nematóides entomopatogênicos. Parasitos metazoários e grandes partículas inertes são envolvidos em cápsulas. Pequenas doses de bactérias, vírus ou protozoários são fagocitados, e altas doses normalmente são agregadas

em nódulos. O encapsulamento ocorre normalmente em parasitos não específicos. Nos específicos ela pode ou não ocorrer (Poinar *et al.*, 1968, Woodring, 1985).

No encapsulamento ocorre agregação e desintegração de células (geralmente hemócitos) do hospedeiro ao redor do parasito, resultando na deposição de melanina e formação da cápsula (Poinar *et al.*, 1968).

Alguns insetos parasitóides ou parasitas, como certos himenópteros livram-se do encapsulamento com fortes movimentos, dípteros da família Tachinidae conectam um funil no sistema traqueal do inseto para respiração. A maioria dos Hymenoptera parasitas específicos, podem inibir as reações de defesa do hospedeiro ou produzir substâncias químicas atrativas dos hemócitos (Salt, 1970 e Nappi, 1974 *In apriid* Chapman, 1982; Chapman, 1982).

Em insetos onde existe pouca circulação de hemócitos, o encapsulamento deve ocorrer sem a direta participação destas células; neste caso, a deposição de melanina e da matriz capsular são de natureza não celular, precipitando-se sobre a superfície externa do nematóide (Poinar & Leutenegger, 1971). O encapsulamento humoral (não celular) envolve apenas proteínas do plasma, ocorrendo somente em Diptera com baixa contagem total de hemócitos (THC), quando parasitados por fungos ou nematóides patogênicos (Woodring, 1985).

Götz & Vey (1974) sugerem que as cápsulas formadas são resultantes da ativação das fenoloxidasas da hemolinfa. A composição final da cápsula é um complexo de proteína-polifenol, que isola fisicamente o patógeno (Christensen *et al.*, 1984, 1989).

Existe um grande número de trabalhos sobre encapsulamento e melanização de nematóides por larvas de dípteros, principalmente Culicidae. Welch & Bronskill (1962) citam que muitos, senão todos os Culicidae, são capazes de encapsular *S. carpocapsae*. O

encapsulamento que ocorre em larvas de *Aedes aegypti* (L.) deve ser semelhante ao que ocorre em *Musca domestica* L. e *Orthellia caesarion* (Muscidae) (Nappi & Stoffolano, 1971, 1972a, 1972b; Andreadis & Hall, 1976).

Ghally *et al.* (1988) trabalhando com larvas de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Tephritidae) parasitadas por *S. carpocapsae*, observaram que de 4 a 18 horas após a infecção ocorreu um aumento no total de proteínas e um decréscimo nos lipídios da hemolinfa, quando comparados com insetos não infectados. O aumento de proteínas deveria ser atribuído como reação de defesa contra o parasitismo.

A encapsulação normalmente ocorre dentro de 24 horas após a penetração do parasita, podendo este morrer quando a parede é melanizada (Woodring, 1985).

#### 2.2.4 - Hospedeiros

Em testes de laboratório mais de 250 espécies de insetos foram suscetíveis aos nematóides entomopatogênicos (Poinar, 1975; Morris, 1985), porém, em campo são poucos os trabalhos que relatam o controle com nematóides (Georgis, 1992). Akhurst (1986) afirma que mais de 90% dos insetos que passam uma fase de seu ciclo de vida no solo (larva e/ou pupa), podem ser considerados ótimos candidatos para o controle com nematóides.

Na América Latina e Caribe são citadas 97 espécies de insetos pertencentes a 11 ordens (Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Odonata, Dictyoptera, Isoptera, Orthoptera, Heteroptera, Homoptera e Neuroptera), suscetíveis a linhagens nativas de *S. carpocapsae* (Wassink & Poinar, 1984). A espécie *S. carpocapsae*, “strains” Mexicano e Argentino, e outras espécies nativas do gênero *Steinernema* e *Heterorhabditis* são aplicados

em solos ou em casas de vegetação para o controle de insetos na Argentina, México, Brasil, Uruguai e Cuba (Georgis & Hom, 1992).

No Brasil até o momento os trabalhos tem se restringido a constatações de ocorrência, produção “in vivo”, e experimentos de campo utilizando inóculo produzido comercialmente nos Estados Unidos (Schmitt, 1993; Aguillera, 1996).

### **2.2.5 - Controle de moscas-das-frutas com nematóides**

A primeira ocorrência de nematóides parasitando mosca-das-frutas foi descrita por Poinar *et al.* (1977), quando investigava ocorrências naturais de patógenos em adultos, pupas e larvas de *Rhagoletis pomonella* (Walsh). Neste levantamento foram encontrado larvas e pupas parasitadas por fungos e bactérias, e também duas pupas parasitadas por nematóides entomopatogênicos do gênero *Neoaplectana* sp. (= *Steinernema*).

Poinar & Hislop (1981), observaram em laboratório que adultos de *Ceratitis capitata* quando inoculados em placas de Petri com *S. carpocapsae* causou 75% de mortalidade e com *Heterorhabditis heliothidis* causou 85 % de mortalidade 72 horas após a inoculação.

Beavers & Calkins (1984), trabalhando em laboratório com *Anastrepha suspensa*, parasitada por nematóides entomopatogênicos, observaram uma mortalidade de 58,1 a 93,4% em larvas de quatro a cinco dias de idade; em pupas com oito a dez dias foi constatado 0,4 a 1,1%, e em adultos de dois a cinco dias 58,1 a 93,4%, dependendo da espécie e “strain” do nematóide utilizado.

A aplicação de diferentes doses de nematóides para o controle de larvas no final do terceiro ínstar de *C. capitata*, *Dacus dorsalis* (Hendel) e *D. cucurbitae* (Coquillett) resultaram na mortalidade de 9 e 92% para *C. capitata*, 9 e 85% para *D. dorsalis* e 0 e

86% para *D. cucurbitae*, respectivamente para a menor e maior dose (50 e 5000 nematóides/larva) (Lindegren & Vail, 1986).

Ghally (1988) utilizando imagos de *C. capitata* expostos a 50, 100 e 1.000 nematóides de *S. feltiae* por inseto, obteve após 24 horas uma mortalidade de 61,9%, 45,6% e 100%, respectivamente e após 48 horas, a mortalidade subiu para 100% nas três dosagens utilizadas. De acordo com Lindegren *et al.* (1990) larvas de *C. capitata* em condições de campo mostraram mortalidade significativa, quando expostas a *S. feltiae*, estimando-se a CL<sub>50</sub> de 38 nematóides/cm<sup>2</sup> de solo.

### 3 - OBJETIVOS

Os experimentos foram conduzidos em laboratório, com os seguintes objetivos:

- Avaliar os mecanismos de defesa de larvas de *A. fraterculus* contra o parasitismo de *S. carpocapsae* e *S. glaseri*, analisando a formação de cápsulas e melanização em larvas parasitadas.
- Determinar a mortalidade de larvas de *A. fraterculus* expostas a *S. carpocapsae* e *S. glaseri*, e o desenvolvimento dos nematóides no interior das larvas, em diferentes dosagens.
- Determinar a eficiência de *S. carpocapsae* no controle de larvas de *A. fraterculus* em diferentes temperaturas.
- Avaliar o controle de *A. fraterculus* com a aplicação de *S. carpocapsae* em solo de textura barro-argilosa.

## **4 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 - Local de desenvolvimento dos experimentos**

Os experimentos foram desenvolvidos na Empresa de Pesquisa Agropecuária e Difusão de Tecnologia de Santa Catarina S. A. (EPAGRI/EEI), de Itajaí - SC, e Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em Curitiba - PR.

### **4.2 - Criação de *Anastrepha fraterculus* em laboratório**

A criação de *A. fraterculus* foi iniciada com pupas enviadas pelo Dr. Luis A. B. Salles da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) em Pelotas - RS.

Para a criação de *A. fraterculus*, foi utilizado o método de oviposição natural. Neste método, é difícil obter o número exato de ovos ou larvas por fruto. Entretanto, é o método ideal para pequenas escalas de criação.

Para criação dos adultos foram utilizadas gaiolas com armação de alumínio, com dimensões de 46 x 46 x 92 cm. Duas laterais da gaiola foram revestidas com plástico transparente, e as outras duas laterais e a parte superior com tecido filó. Uma das laterais com tecido filó, continha duas mangas para manipulação dos insetos. As gaiolas foram mantidas em condições de laboratório com temperatura de  $25 \pm 5$  °C, fotofase 12 horas e UR  $75 \pm 10\%$ .

As moscas foram alimentadas com uma pasta contendo 20% de hidrolisado de levedura e 80% de açúcar mascavo, onde foi acrescentada água destilada até formar uma pasta. A dieta líquida foi composta de solução de mel a 10% em água destilada (Raga, 1990; Salles, 1992). A dieta sólida era passada em vários pontos das laterais de plásticos,

em camadas de 1 a 2 mm de espessura. A dieta líquida foi colocada sobre algodão dentro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro. As placas de Petri contendo o algodão embebido na dieta líquida, foram colocadas na parte superior das gaiolas (pelo lado de fora e invertidas) e dentro da gaiola, na parte inferior. A dieta líquida foi trocada a cada 2-3 dias, e a sólida uma vez por semana, quando geralmente as moscas já haviam consumido quase toda esta dieta.

Em cada gaiola foram colocadas aproximadamente 3000 mil pupas em caixas gerbox com areia úmida esterilizada, com uma média final de sobrevivência de 900 casais. Após 10 a 15 dias da emergência dos adultos (período de pré-oviposição), foram colocados 5 a 6 frutos de mamão papaia por gaiola para a postura, ficando estes expostos durante 4 horas (8:00-12:00h.) segundo a metodologia de Faria & Suplicy Filho, 1989. Após este período os frutos eram retirados das gaiolas e colocados dentro de escorredor de macarrão de plástico com uma caixa gerbox em baixo para captação do líquido dos mamões, e desta maneira acondicionados em estufas com temperatura de  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , fotofase 12 horas e UR  $75 \pm 10\%$ . No nono dia após a postura, os frutos que já tinham perdido quase todo o líquido foram embrulhados em jornal esterilizado, e colocados em bandejas de plástico, sobre areia esterilizada. Onze a 12 dias após a postura, as larvas estavam em fase de pré-pupa e deixavam os mamões, quando então eram utilizadas para a condução dos experimentos. De cada mamão foram retirados em média 200-300 larvas de coloração amarelo gema-de-ovo. Os mamões não usados nos experimentos eram colocados sobre areia úmida esterilizada, onde as larvas enterravam-se para empupar, dando continuidade a criação dos insetos.

Os adultos com aproximadamente 75 dias de idade eram descartados, pois segundo Lopes (1986), o período mais produtivo da fêmea está compreendido entre a 3<sup>a</sup> até a 12<sup>a</sup> semana de vida.

#### **4.3 - Criação de *Galleria mellonella* em laboratório**

Para haver um contínuo estoque de nematóides entomopatogênicos, foi necessário propagá-los em lagartas de *G. mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae). Exemplares desta espécie são frequentemente usados em vários países como hospedeiros de nematóides, pois são facilmente encontradas, fáceis de serem criadas, são muito suscetíveis e são excelentes hospedeiros para a reprodução dos nematóides.

A criação de *G. mellonella* foi iniciada com favos contaminados por esta espécie, cedidos pelo Prof. Ademar Pegoraro do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em Curitiba, PR.

As pupas foram mantidas em vidros de 20 cm de altura e 15 cm de diâmetro tampados com tecido filó. A tampa de filó possuía aberturas onde foram colocadas folhas de papel, tipo cartolina, de cor preta dobradas em gaita para a postura. Em cada vidro foram colocadas 50 pupas de *G. mellonella*. Após 10 dias emergiam as mariposas. Os adultos foram descartados com 30 dias de idade.

Os ovos foram retirados a cada 2 a 3 dias sendo colocados sobre favos de abelha (previamente desinfetados a 48°C por 80 minutos) e conservados em geladeira até o uso. Para a criação massal de *G. mellonella*, os favos contendo os ovos foram retirados da geladeira e colocados dentro de marmitas de alumínio de 7 cm de altura e 16,5 cm de diâmetro, com perfurações na parte central da tampa para ventilação. As marmitas foram colocadas em estufas em temperatura de  $25 \pm 5^\circ\text{C}$ . Após 8 a 10 dias eclodiam as lagartas que foram alimentadas com dieta natural durante todo o seu desenvolvimento. Em torno de 30 a 50 dias as lagartas atingiam o último ínstar (8º). De acordo com a necessidade de lagartas para produção de nematóides foram utilizadas temperaturas mais altas ou mais baixas para acelerar ou diminuir o crescimento e desenvolvimento das lagartas.

As lagartas de 7<sup>o</sup> e 8<sup>o</sup> ínstar que não teriam uso imediato passavam por um tratamento para não empuparem. Eram colocadas em água a 56°C por 15 segundos e em seguida em água fria por mais 30 segundos. Na sequência, as lagartas foram colocadas sobre papel toalha para secarem, e posteriormente armazenadas a 15°C por até 15 dias (Woodring & Kaya, 1988).

#### **4.4 - Produção “in vivo” de *Steinernema carpocapsae* e *S. glaseri* em lagartas de *G. mellonella*. Coleta, estoque e preparo das dosagens de nematóides**

Os nematóides *S. carpocapsae* (Biosys, Inc., Palo Alto, Califórnia) foram cedidos pela Dra. Áurea T. Schmitt da EPAGRI/EEI (Itajaí - SC) e Dra. Marineide M. Aguilera da Universidade Federal de São Carlos (Araras - SP) e *S. glaseri* pela última pesquisadora.

Para produção dos nematóides foram utilizadas lagartas de *G. mellonella* que estavam nos dois últimos ínstar (7<sup>o</sup> e 8<sup>o</sup>), usando-se material esterilizado em todas as etapas. As lagartas geralmente tinham passado pelo tratamento para não empuparem, citado no item 4.3. Para a espécie *S. glaseri*, normalmente usava-se lagartas não tratadas, pois estas produziam melhor.

As suspensões dos nematóides *S. glaseri* e *S. carpocapsae* foram preparadas através de contagens do número de nematóides por mililitro (ml). Para estimar este número, homogeneizava-se a suspensão armazenada, retirando-se em seguida 1 ml, diluindo-o em água destilada para facilitar a contagem. Retirava-se então 1 ml desta nova suspensão que era passada para placa de Petri de 5 cm de diâmetro, dividida em quadrados de 2 mm de lado, fazendo-se as contagens com o auxílio de um microscópio estereoscópio. Repetia-se este procedimento por três a cinco vezes, sendo considerado o valor médio destas contagens como a referência para o número de nematóides/ml de suspensão.

Em tampas de placas de Petri de 9 cm de diâmetro foi colocado um disco de papel filtro por placa, e sobre este 1 ml de suspensão de nematóides, na dosagem de 400 a 600 nematóides por placa ou 40 a 60 nematóides por lagarta. Em seguida foram colocadas 10 lagartas por placa (Figura 1A). As placas foram fechadas com filme plástico e colocadas em estufa a 25°C, UR 75  $\pm$  10%, sem fotofase. Sete a nove dias após, as lagartas foram transferidas para armadilha de White, que consistia de uma placa de Petri de 15 cm de diâmetro com aproximadamente 15 ml de água destilada, contendo um vidro relógio de 9 cm de diâmetro com a parte côncava para cima. Sobre o vidro relógio foi colocado um disco de papel filtro, onde eram depositadas 20 a 30 lagartas para liberação dos infectivos (Figuras 1B e 1C) (White, 1927).

Os nematóides infectivos foram coletados diariamente por 6 a 7 dias, passados em peneira de 20 micrômetros de abertura de malha, onde ficavam retidos os nematóides e restos de lagarta. Em seguida eram lavados com água destilada e colocados sobre uma máscara (de tecido poroso, para uso sobre o nariz e boca, destinada a reter poeiras e partículas sólidas, da marca 3M), com o objetivo de reter os nematóides mortos, adultos e também restos de lagartas que contaminavam a suspensão. A máscara era colocada dentro de pote plástico de 250 gramas contendo água destilada. Os infectivos filtrados através da máscara, foram coletados e colocados novamente na peneira, onde foram lavados. Após este processo, os infectivos foram colocados em potes de plástico com 4,5 cm de altura e 14 cm de diâmetro, contendo 30 ml de suspensão de infectivos em água destilada. A população máxima para armazenar foi de 3000 a 5000 nematóides/ml para *S. carpocapsae* e 500 a 3000/ml para *S. glaseri*.

Os potes foram armazenados em estufas com  $9 \pm 1$  °C, onde permaneciam por um período de no máximo 30 dias, sendo agitados diariamente por um minuto para oxigenação da suspensão (Woodring & Kaya, 1988; Williams, 1991; Schmitt, 1993).

Para preparar as dosagens usadas nos experimentos utilizava-se os nematóides armazenados, fazendo-se as contagens e diluições necessárias para se chegar ao número de nematóides desejado em cada tratamento.

#### **4.5 - Mecanismos de defesa de *A. fraterculus* contra o parasitismo de *S. carpocapsae* All e *S. glaseri* Alcídia**

O experimento foi desenvolvido para observar os mecanismos de defesa de *A. fraterculus* quando expostas a *S. carpocapsae* e *S. glaseri*, nas dosagens de 0 e 316 nematóides/larva. Para cada espécie de nematóide e para cada dosagem testada foram utilizadas 14 repetições contendo 15 larvas em fase de pré-pupa de *A. fraterculus* por repetição.

Em placas de Petri contendo papel filtro, foi pipetado 1,0 ml da solução de nematóide, diluída em água destilada. Logo após foram colocadas em cada placa 15 larvas de *A. fraterculus*. Para a testemunha, foi pipetado 1,0 ml da água destilada. Após a inoculação dos nematóides e colocação das larvas, as placas foram fechadas com filme plástico e mantidas em incubadora a 25 °C, sem fotofase. A mortalidade das larvas foi avaliada a 24, 48 e 72 horas após a inoculação dos nematóides. As larvas e pupas que não foram parasitadas até 72 horas após a inoculação foram eliminadas.

Os processos de encapsulamento e melanização das larvas parasitadas por *S. carpocapsae* foram avaliados nove dias após a inoculação, e as larvas parasitadas por *S. glaseri* foram analisadas sete dias após. Cinco larvas e duas pupas de cada repetição foram dissecadas e observadas em microscópio estereoscópio, para determinação do percentual de encapsulamento e melanização. Foi observado um total de 70 larvas e 28 pupas parasitadas por *S. carpocapsae*, e 70 larvas e 28 pupas parasitadas por *S. glaseri*. O experimento foi repetido uma vez.

#### **4.6 - Controle de *A. fraterculus* inoculadas com diferentes dosagens de *S. carpocapsae* e *S. glaseri***

O experimento foi conduzido para observar a mortalidade, número de nematóides que penetrou nos insetos e o desenvolvimento dos nematóides no interior das larvas em diferentes dosagens.

Foram utilizados infectivos de *S. carpocapsae* e *S. glaseri*, com seis dosagens: 0 (testemunha), 5, 15, 40, 112 e 316 nematóides/larva. Para cada espécie de nematóide testada, e para cada dose foram usadas 5 repetições contendo 15 larvas de *A. fraterculus* por repetição. As placas foram mantidas à temperatura de 25°C, sem fotofase. A mortalidade foi avaliada 72 horas após a inoculação das larvas. As larvas e pupas que não foram parasitadas até 72 horas após a inoculação foram eliminadas.

O número de nematóides que penetrou nas larvas foi avaliado 48 horas após a mortalidade das larvas, sendo dissecadas duas larvas de cada repetição (10 larvas/tratamento) e analisadas em microscópio estereoscópio, perfazendo um total de 50 larvas inoculadas com *S. carpocapsae* e 50 larvas inoculadas com *S. glaseri*.

O desenvolvimento de *S. carpocapsae* no interior das larvas foi avaliado 216 horas após a mortalidade dos insetos, e o desenvolvimento de *S. glaseri* foi avaliado 120 horas após a mortalidade do inseto. Três larvas de cada repetição foram dissecadas e analisadas em microscópio estereoscópio, num total de 15 larvas por tratamento. Foram analisadas 75 larvas inoculadas com *S. carpocapsae* e 75 larvas inoculadas com *S. glaseri*. O experimento foi repetido uma vez.

#### **4.7 - Controle de *A. fraterculus* com *S. carpocapsae* em diferentes temperaturas**

Com o objetivo de avaliar a influência da temperatura no controle de *A. fraterculus* com a aplicação de *S. carpocapsae* o experimento foi realizado utilizando-se seis dosagens: 0, 5, 15, 40, 112 e 316 nematóides/larva em quatro diferentes temperaturas: 15, 20, 25 e 30°C.

Para cada dose foram usadas cinco repetições com 15 larvas de *A. fraterculus* por repetição. A mortalidade foi avaliada 72 horas após a exposição das larvas aos nematóides. As pupas encontradas em todos os tratamentos foram lavadas e colocadas em placas de Petri limpas e acondicionadas a 25°C. Após 48 horas foi confirmada a mortalidade. O referido procedimento foi necessário uma vez que os tratamentos que estavam nas temperaturas de 15 e 20°C necessitavam de mais tempo para desenvolver os sintomas característicos (pupas com cor marrom-claro homogêneo). O experimento foi repetido uma vez.

#### **4.8 - Controle de *A. fraterculus* com aplicação de *S. carpocapsae* em solo textura barro-argilosa**

Para avaliar o controle de *A. fraterculus* com a aplicação de *S. carpocapsae* em solo, foram utilizadas quatro dosagens: 0, 890, 2510 e 7074 nematóides/larva ou 188, 531 e 1497 nematóides/cm<sup>2</sup> de solo. Para cada dose foram usadas 5 repetições com 15 larvas de *A. fraterculus* por repetição.

Para este experimento foram utilizados potes plástico de 250 g, com 10 cm. de diâmetro e 6 cm de altura, contendo 70 g de solo esterilizado, com textura barro-argilosa e pH 4,8 (Apêndices 1 e 2). Sobre o solo foi gotejado 19 ml de água destilada. Após 24 horas foram aplicados 5 ml. de suspensão de nematóides em cada pote, ficando por mais 24 horas para ocorrer a dispersão dos nematóides no solo. Logo após foram colocadas em cada pote 15 larvas. Os potes foram tampados e incubados a 25°C, sem fotofase. A mortalidade foi avaliada 144 horas após a exposição das larvas aos nematóides. O experimento foi repetido uma vez.

#### **4.9 - Análise estatística**

Os experimentos foram analisados com o auxílio do programa SANEST e STATISTICA, e as DL<sub>50</sub> através da análise de Próbit do programa POLO-PC. A mortalidade foi corrigida pela fórmula de Abbott.

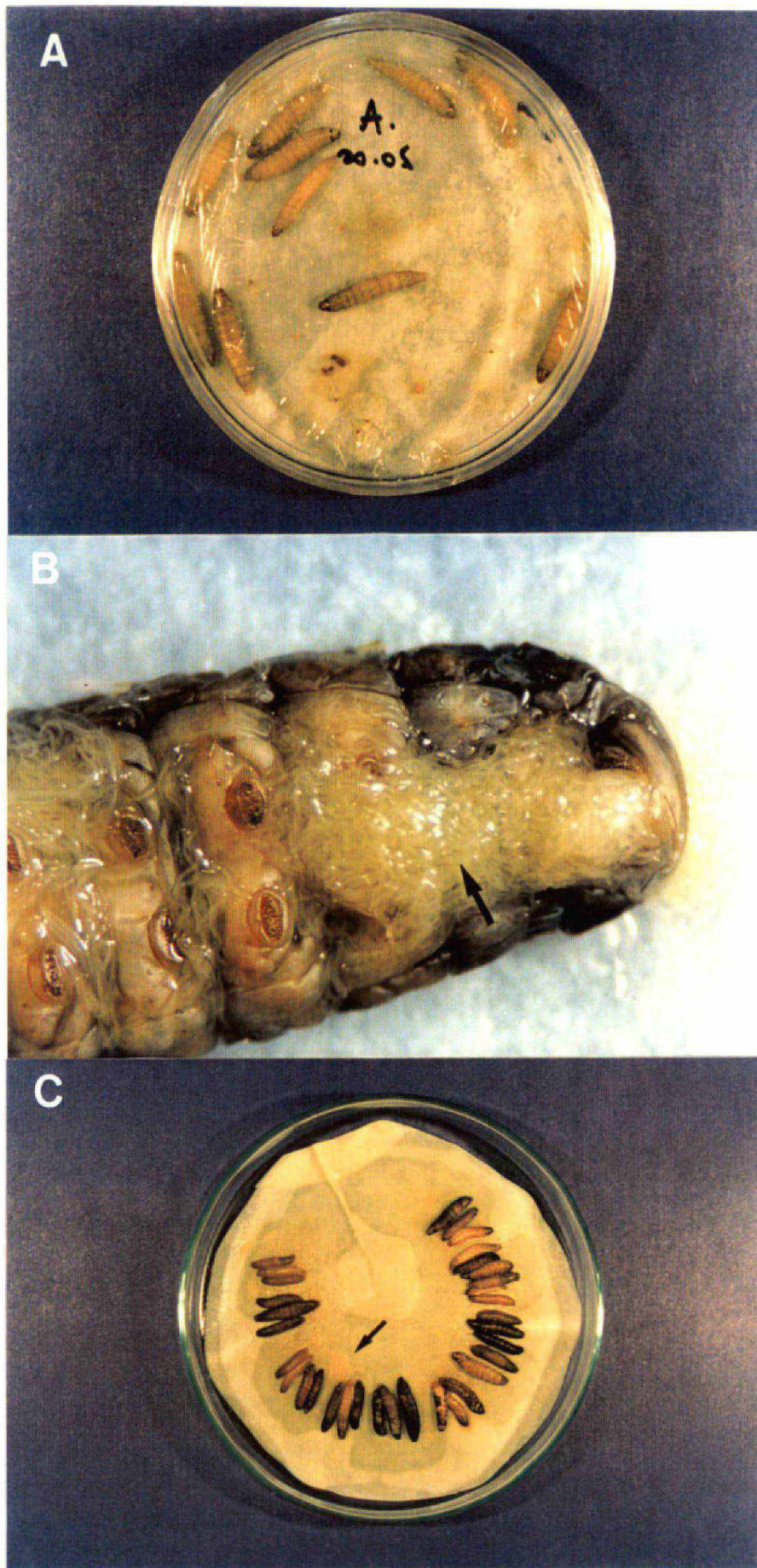


Figura 1 - Propagação de nematóides entomopatogênicos em lagartas de *G. mellonella*. A - Lagartas inoculadas com *S. carpocapsae* em placas de Petri; B - Liberação de infectivos de *S. glaseri* em lagartas de *G. mellonella* (aumento 12X); C - Armadilha de White.

## 5 - RESULTADOS

### 5.1 - Mecanismos de defesa de *A. fraterculus* contra o parasitismo de *S. carpocapsae* e *S. glaseri*

#### Mortalidade

Os resultados mostram que 90% da mortalidade das larvas parasitadas por *S. carpocapsae* foi alcançada 48 horas após a inoculação dos nematóides. Em contraste, as larvas parasitadas por *S. glaseri* apresentaram 85% de mortalidade após 72 horas. A ocorrência de larvas não parasitadas, podem estar relacionadas a rápida formação de pupas antes da penetração dos nematóides (Tabela 1 e Figura 2). Em contagem de laboratório, foi observado que em larvas parasitadas por *S. carpocapsae* penetraram uma média de 77,28 nematóides/larva, e nas parasitadas por *S. glaseri* foi observado uma média de 54,87 nematóides/larva (Tabela 6).

Quanto ao aspecto exterior, foi observado que as larvas e pupas de *A. fraterculus*, parasitadas por *S. carpocapsae*, apresentaram uma coloração marrom-claro homogênea, e as parasitadas por *S. glaseri* apresentaram coloração marrom-escuro, com manchas melanóticas por todo o tegumento do inseto.

Tabela 1 - Porcentagem de mortalidade de *A. fraterculus* inoculadas com nematóides entomopatogênicos, na dose de 316 infectivos/larva

| Tempo (h.)            | 24    | 48    | 72    | Mc (*) |
|-----------------------|-------|-------|-------|--------|
| Tratamentos           |       |       |       |        |
| Testemunha            | 0     | 0     | 0,95  | -      |
| <i>S. carpocapsae</i> | 18,67 | 90,00 | 90,00 | 89,90  |
| <i>S. glaseri</i>     | 2,67  | 73,33 | 85,00 | 84,85  |

(\*) Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott.

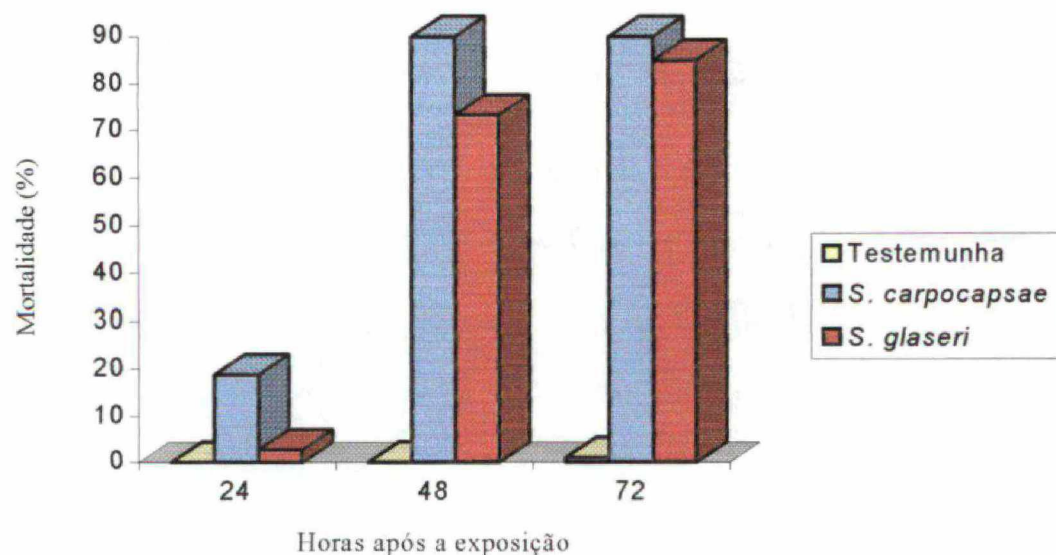


Figura 2 - Porcentagem de mortalidade de *A. fraterculus* submetidas a nematóides entomopatogênicos, na dose de 316 infectivos/larva

### Encapsulamento e melanização

Nas avaliações de encapsulamento e melanização de *A. fraterculus*, foi observado que a formação de grânulos de aspecto cristalino no interior das larvas parasitadas por *S. carpocapsae* (nove dias após a mortalidade das larvas) foi de 100 % e nas larvas parasitadas por *S. glaseri* (sete dias após a mortalidade das larvas) foi de 92,85 %. A ocorrência de encapsulamento em pupas foi de 89,28% para *S. carpocapsae* e 85,71 % para *S. glaseri* (Tabela 2, Figura 2). A ocorrência de melanização não foi observado em larvas e pupas parasitadas por *S. carpocapsae* ao contrário de *S. glaseri* que apresentou 100% de melanização em larvas e pupas de *A. fraterculus* (Tabela 2). As reações de encapsulamento e melanização em larvas de *A. fraterculus* são mostradas nas Figuras três e quatro.

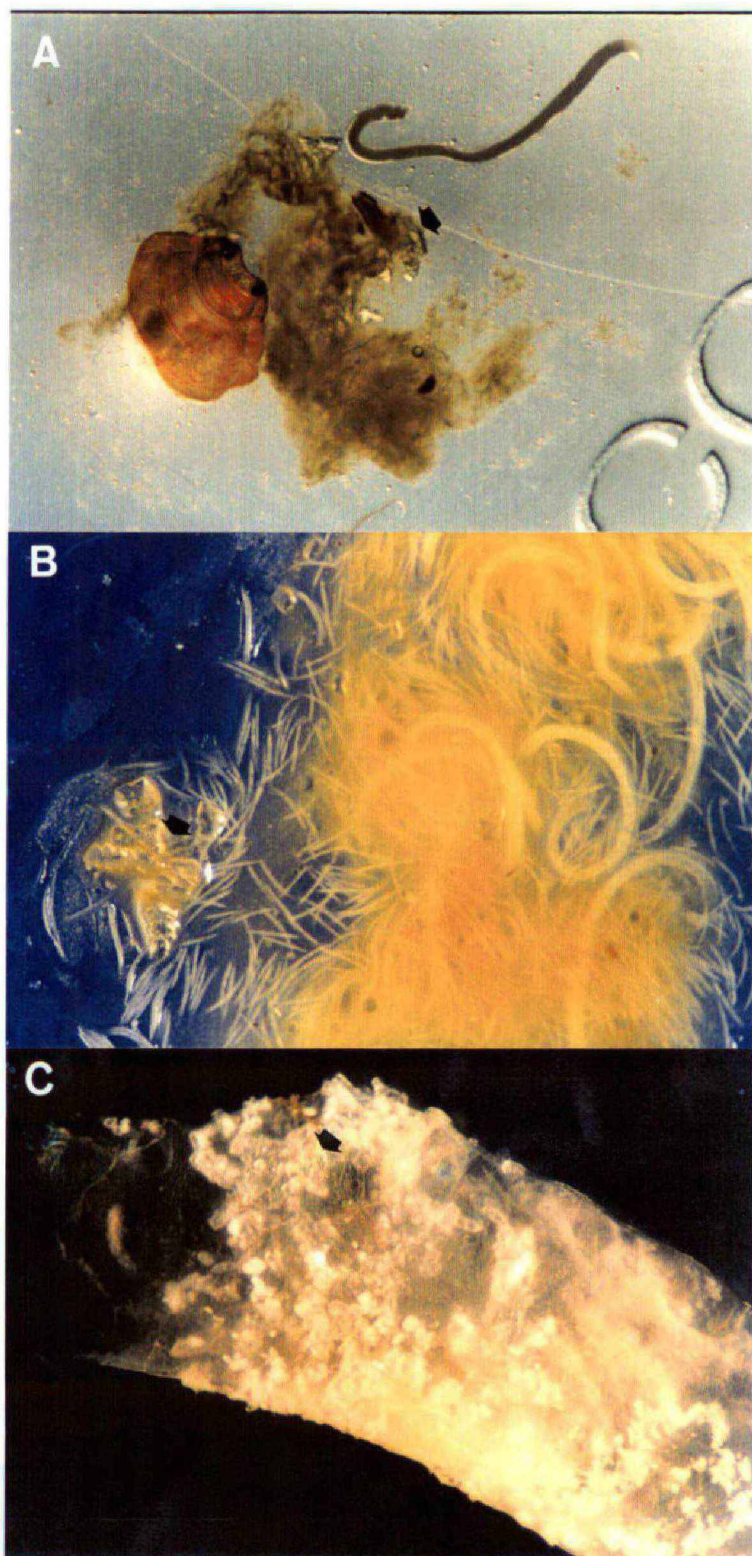


Figura 3 - Processo de encapsulamento em larvas de *A. fraterculus* parasitadas por nematóides. **A** - Fêmea de *S. carpocapsae* encapsulada na parte anterior da pupa (aparelho bucal), com grande formação de grânulos cristalinos (aumento 12X); **B** - Grânulos cristalinos na hemolinfa de uma larva parasitada por *S. carpocapsae* (aumento 16X); **C**- Grânulos cristalinos aderido em todo tegumento de uma larva parasitada por *S. glaseri* (aumento 13X).

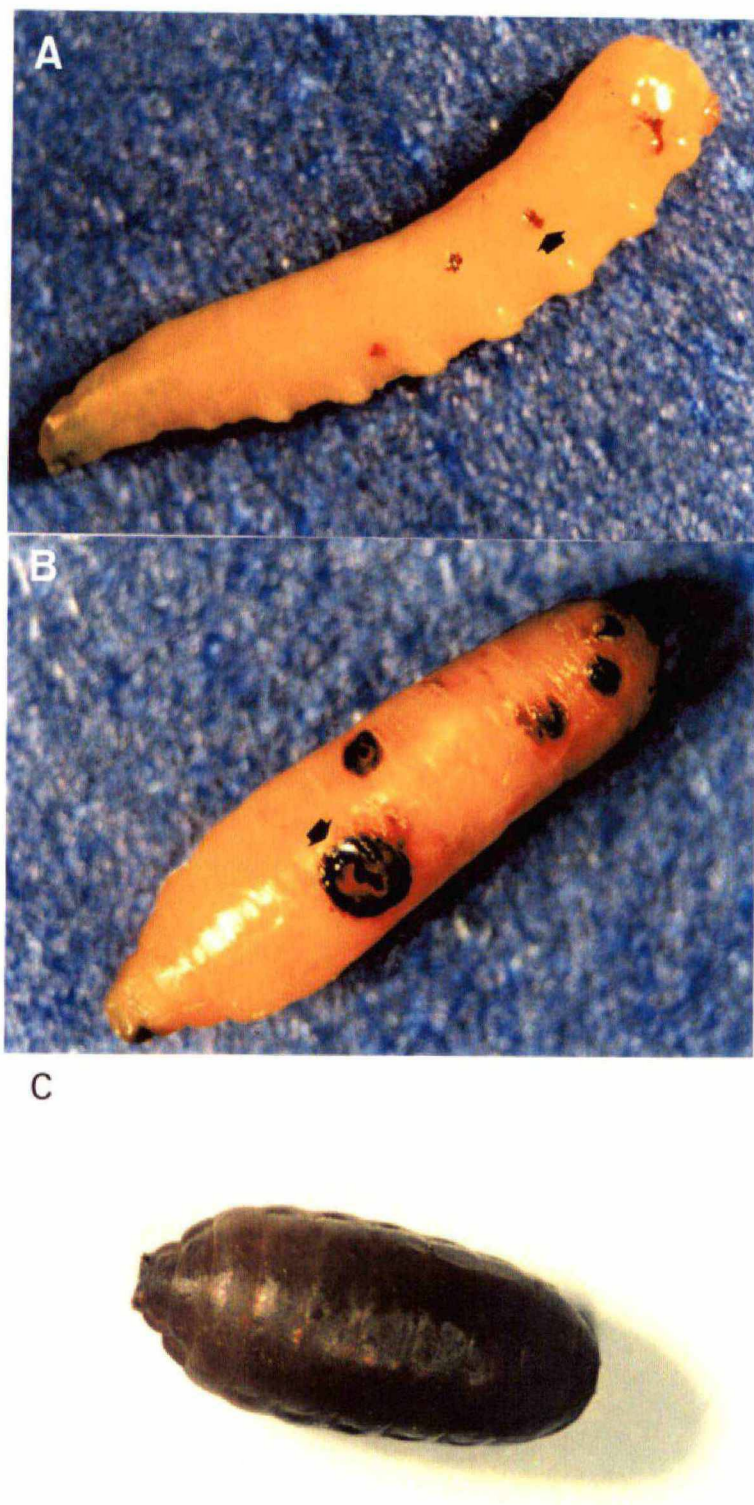


Figura 4 - Processo de melanização em larvas de *A. fraterculus* parasitadas por *S. glaseri*. **A** - Manchas melanóticas formadas 24 horas após a penetração do nematóide (aumento 13X); **B** - Manchas melanóticas formadas 48 horas após a penetração do nematóide (aumento 12X); **C** - Melanização da pupa, em todo tegumento (aumento 12X).

Tabela 2 - Porcentagem de encapsulamento e melanização de larvas e pupas de *A. fraterculus* parasitadas por *S. carpocapsae* e *S. glaseri*

| Nematóides<br><i>A. fraterculus</i> | <i>S. carpocapsae</i> |       | <i>S. glaseri</i> |       |
|-------------------------------------|-----------------------|-------|-------------------|-------|
|                                     | Larvas                | Pupas | Larvas            | Pupas |
| Encapsulamento (%)                  | 100                   | 89,28 | 92,85             | 85,71 |
| Melanização (%)                     | 0                     | 0     | 100               | 100   |

#### Mecanismos de defesa das larvas afetando a reprodução dos nematóides

Nas larvas de *A. fraterculus* parasitadas por *S. carpocapsae* foram observados o desenvolvimento e a reprodução dos nematóides com a liberação de infectivos e adultos de 2ª geração. Em 17,14% das larvas ocorreu somente a emergência de infectivos (L<sub>3</sub>). No interior de 77,86 % das larvas foi observado a ocorrência de adultos imaturos e maduros de 2ª geração e em somente 5% houve a liberação de adultos de 2ª geração. (Figura 5).

Nas larvas parasitadas por *S. glaseri* foi observado que em 83,56 % dos casos, houve liberação de adultos de 1ª geração. Em 9,28 % das larvas foi constatada a presença de L<sub>3</sub> de 2ª geração e, em somente 7,16% das larvas foi observada a emergência de L<sub>3</sub> de 2ª geração. Não foi observada a liberação de infectivos de 3ª geração. (Figura 6).

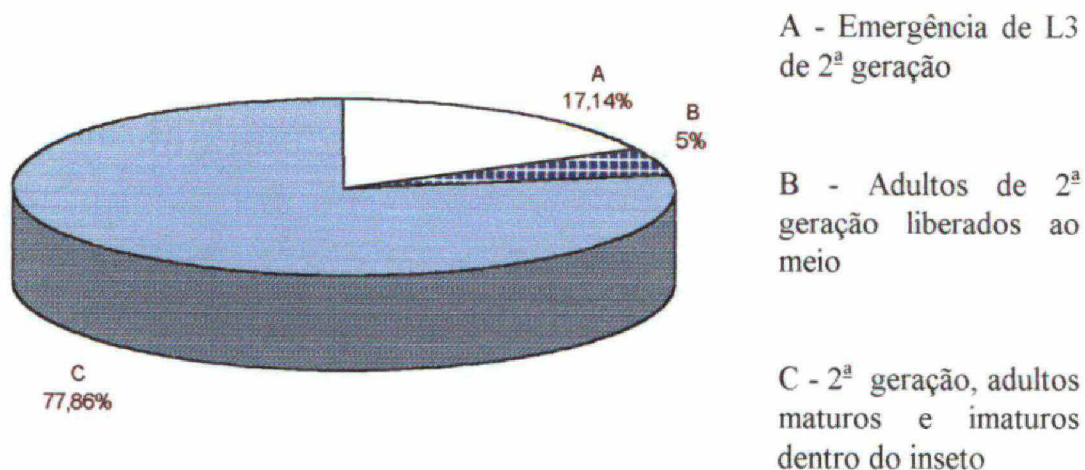


Figura 5 - Porcentagem de desenvolvimento de *S. carpocapsae* em larvas de *A. fraterculus* com reações de encapsulamento, nove dias após a mortalidade

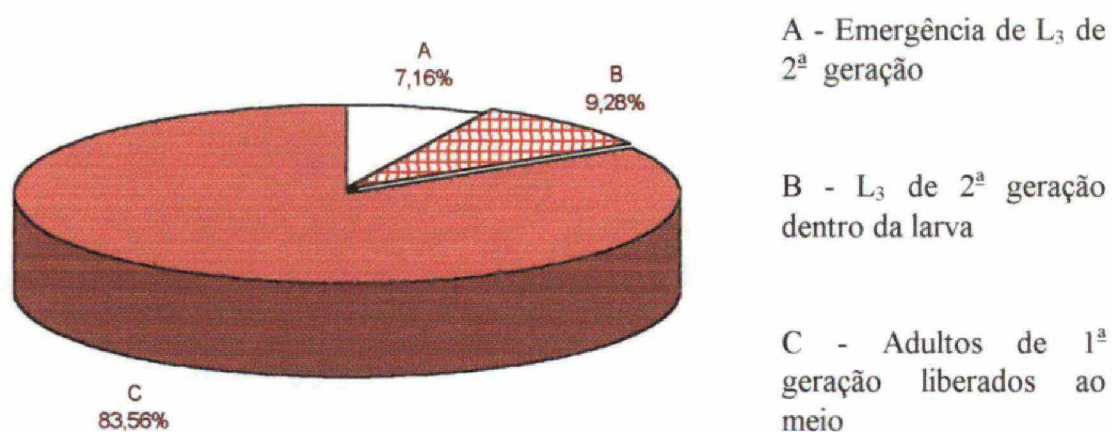


Figura 6 - Percentual de desenvolvimento de *S. glaseri* em larvas de *A. fraterculus* com reações de encapsulamento e melanização, sete dias após a mortalidade

## 5.2 - Controle de *A. fraterculus* inoculadas com diferentes dosagens de *S. carpocapsae* e *S. glaseri*

### Mortalidade

Para as duas espécies de nematóides, a dosagem mais eficiente foi a de 316 nematóides/larva, com um intervalo de confiança de 77 a 94% de mortalidade para *A. fraterculus* inoculadas com *S. carpocapsae* e de 78 a 95% para as larvas inoculadas com *S. glaseri*. A mortalidade foi proporcional ao aumento do número de nematóides/larva. Apesar da dose de 316 nematóides/larva ser a mais eficiente, ela acrescenta um pequeno aumento no percentual de mortalidade das larvas de *A. fraterculus*, comparado com a dose de 112 nematóides/larva (Tabela 3, Figura 7 e Apêndice 7).

Na média geral das diferentes doses, as larvas inoculadas com *S. glaseri* apresentaram uma menor formação de pupas, comparadas com as larvas inoculadas com *S. carpocapsae* (Tabela 4, Figura 8).

Das larvas de *A. fraterculus* inoculadas com *S. carpocapsae* 55,75% empuparam, e deste total 10,67% foram parasitadas. Em larvas inoculadas com *S. glaseri* foi observado que em 32,81% houve a formação de pupas e destas, somente 6,4% foram parasitadas pelo nematóide (Tabela 4).

A  $DL_{50}$  de *S. carpocapsae* foi calculada em 32,35 nematóides/larva, com limites de 6,87 a 104,82. Para *S. glaseri* a  $DL_{50}$  41,26 nematóides/larva (Tabela 5).

Tabela 3 - Porcentagem de mortalidade de *A. fraterculus* inoculadas com diferentes dosagens de *S. carpocapsae* e *S. glaseri*

| Nematóides/larva          | 0    | 5     | 14    | 40    | 112   | 316   |
|---------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Nematóides                |      |       |       |       |       |       |
| <i>S. carpocapsae</i>     | 1,33 | 25,33 | 45,33 | 54,67 | 56    | 85,33 |
| <i>S. carpocapsae</i> (*) | -    | 24,32 | 44,59 | 54,06 | 55,41 | 85,13 |
| <i>S. glaseri</i>         | 1,33 | 14,67 | 25,33 | 53,33 | 72    | 86,64 |
| <i>S. glaseri</i> (*)     | -    | 13,52 | 24,32 | 52,70 | 71,62 | 86,46 |

(\*) Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott.

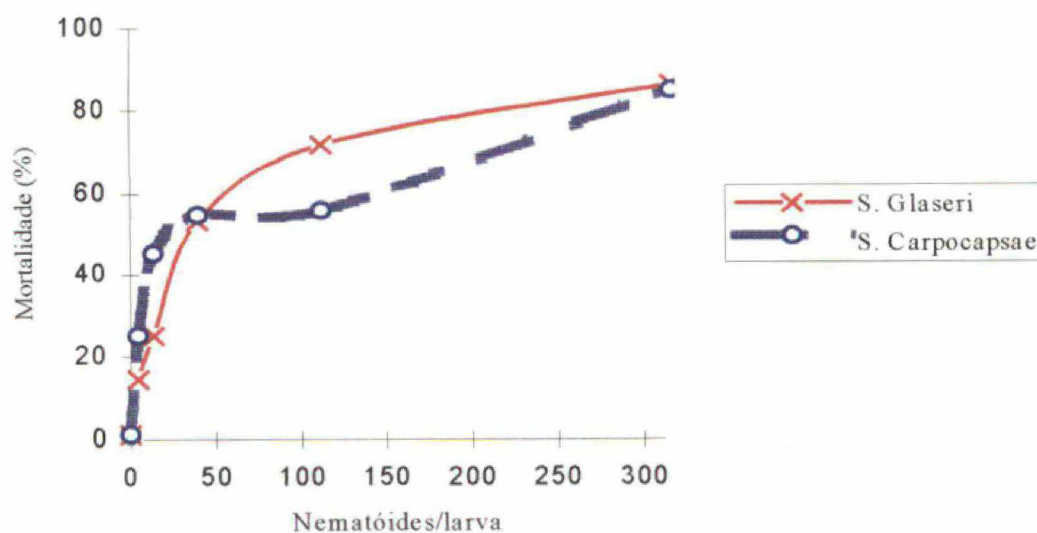


Figura 7 - Porcentagem de mortalidade de *A. fraterculus* inoculadas com diferentes dosagens de *S. carpocapsae* e *S. glaseri*

Tabela 4 - Porcentagem de formação de pupas de *A. fraterculus*, submetidas a *S. carpocapsae* e *S. glaseri*

| Nematóides   | <i>S. glaseri</i> | <i>S. carpocapsae</i> |
|--------------|-------------------|-----------------------|
| <b>Pupas</b> |                   |                       |
| Sadias       | 26,41             | 45,08                 |
| Parasitadas  | 6,4               | 10,67                 |
| Total        | 32,81             | 55,75                 |

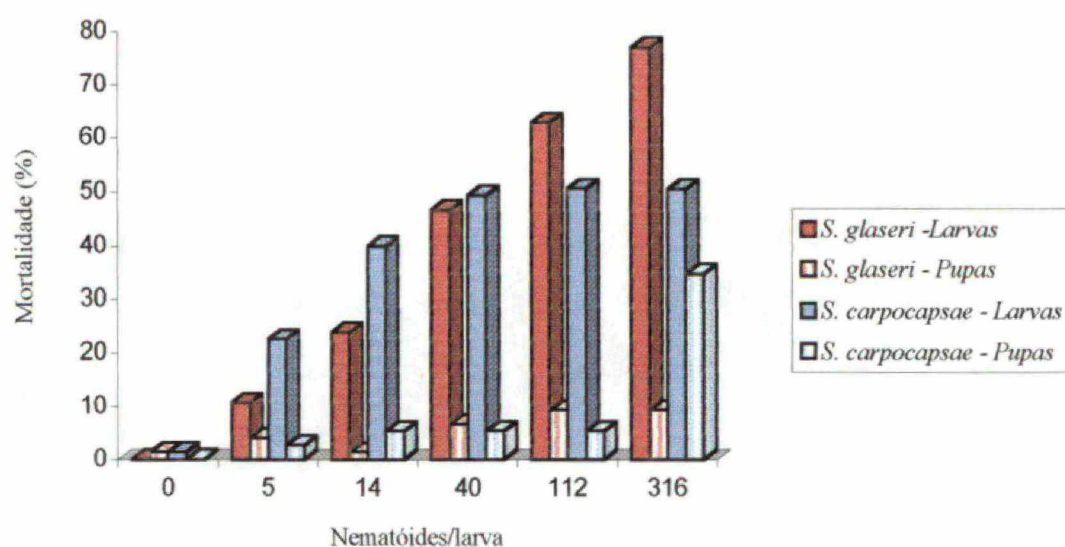


Figura 8 - Porcentagem de mortalidade de larvas, e larvas (pupas) de *A. fraterculus* parasitadas por *S. carpocapsae* e *S. glaseri* e continuaram o processo de formação de pupas

Tabela 5 -  $DL_{50}$  de larvas inoculadas com seis contrações de *S. carpocapsae* e *S. glaseri*

| Nematóides            | $DL_{50}$              | Limites       |
|-----------------------|------------------------|---------------|
| <i>S. glaseri</i>     | 41,26 nematóides/larva | 30,86 a 54,75 |
| <i>S. carpocapsae</i> | 32,35 nematóides/larva | 6,87 a 104,82 |

### **Desenvolvimento dos nematóides nas larvas de *A. fraterculus*, e liberação de infectivos de *S. carpocapsae* e *S. glaseri***

Os resultados obtidos demonstraram que as duas espécies de nematóides foram capazes de se desenvolver e reproduzir em larvas de *A. fraterculus*.

***S. carpocapsae*:** Foi observado que o desenvolvimento da primeira à terceira geração de nematóides no interior das larvas de *A. fraterculus* ocorreu num período de nove a 15 dias (Figura 9 A, B e C).

De um total de 75 larvas de *Anastrepha* examinadas, foi observado que em 45% os infectivos (L<sub>3</sub>) que deixaram o cadáver ao nono dia, eram de segunda geração. Entretanto, foi observado que no interior das larvas existiam também adultos de segunda geração, indicando a possível formação de infectivos de terceira geração. No restante das larvas dissecadas (55 %), foi observada a presença de adultos de 2ª geração e também juvenis de 3ª geração. Nas larvas inoculadas com as doses de 40 e 112 nematóides/larva, e que não foram dissecadas, ocorreu a emergência de infectivos (L3) de terceira geração. Os infectivos de *S. carpocapsae* começaram a deixar o cadáver 10 a 15 dias após a morte do inseto e produziram em média 10.592 nematóides por larva (Figura 10A).

Na dosagem de 5 e 14 nematóides/larva, penetraram em média 3,13 e 5,00 nematóides/inseto. Em 62,5 % das larvas (de um total de 30) os nematóides ainda estavam aprisionados dentro do inseto, sendo eles de 1ª e 2ª geração. Nas dosagens de 40 e 112 nematóides/larva, foi encontrado uma média de 8,8 e 12,25 nematóides/larva, sendo observado que nestas dosagens ocorreu um melhor desenvolvimento dos nematóides no interior das larvas. Em 100 % das larvas dissecadas (30), os nematóides estavam na segunda geração.

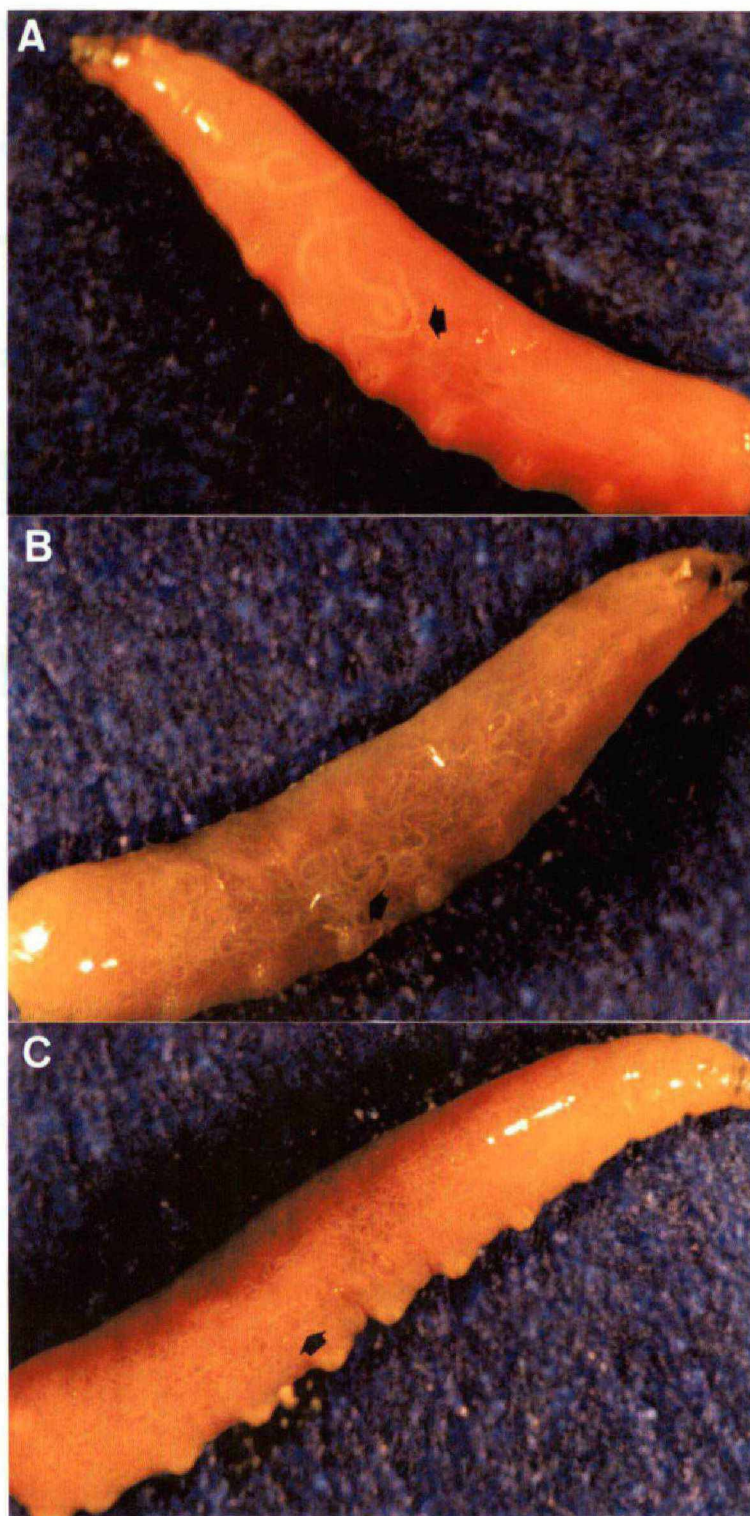


Figura 9 - Desenvolvimento de *S. carpocapsae* em larvas de *A. fraterculus* (aumento 12X): **A** - Adultos de primeira geração; **B** - Adultos e juvenis de segunda geração, **C** - infectivos de terceira geração.

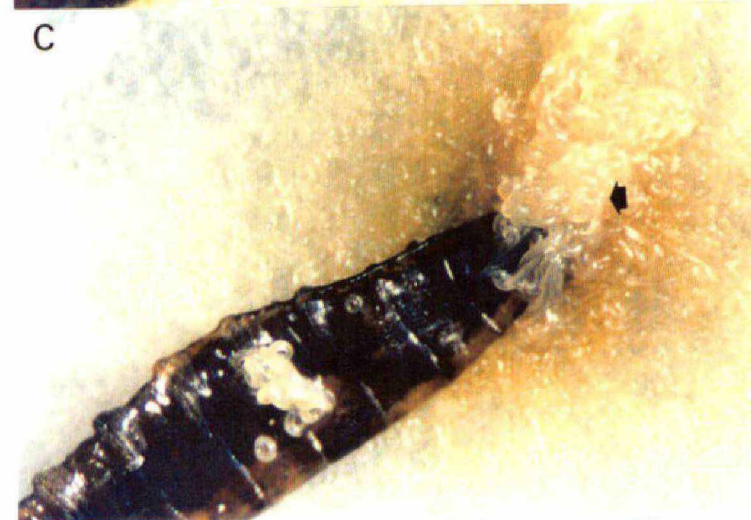


Figura 10 - Liberação de nematóides infectivos (L<sub>3</sub>) e adultos ao meio (aumento 12X): **A** - liberação de L<sub>3</sub> de *S. carpocapsae*; **B** - liberação de L<sub>3</sub> de *S. glaseri*, **C** - Liberação de adultos de primeira geração de *S. glaseri*

Na dose de 316 nematóides/larva, foi constatado uma média de 77,28 nematóides/larva . Em 25% de 15 larvas dissecadas, ocorreu liberação de L3, juntamente com adultos e juvenis de segunda geração (Tabela 6).

*S. glaseri*: Nas larvas infectadas por *S. glaseri*, desenvolveram-se apenas duas gerações de nematóides, ocorrendo a emergência de infectivos de segunda geração. Os infectivos de *S. glaseri* começaram a deixar o cadáver seis a oito dias após a morte do inseto, produzindo um total de 1086 infectivos/larva (Figura 10B).

Na dosagem de 5 e 14 nematóides/larva, penetraram em média 3,33 e 6,00 nematóides/larva. Foi observado que em 62,5 % das 30 larvas dissecadas ocorreu a morte dos nematóides no interior das larvas, e em 37,5 % houve liberação de juvenis de 4ª instar (L<sub>4</sub>) e adultos de primeira geração. Nas dosagens de 40 e 112 nematóides/larva, penetraram 10,6 e 20,8 nematóides/larva respectivamente. Em 75 % de um total de 30 larvas, ocorreu a liberação de L<sub>3</sub> de segunda geração, no restante das larvas, aconteceu a morte dos nematóides.

Na dose de 316 nematóides/larva, penetraram 54,87 nematóides/larva. Em 53,33 % do total de 15 larvas houve liberação de adultos de primeira geração, e em 46,67% das larvas os nematóides morreram no seu interior. O maior número de nematóides foi encontrado na dosagem de 316 nematóides/larva (Tabela 6, Figura 10C).

Tabela 6 - Número médio de *S. carpocapsae* e *S. glaseri* que penetrou nas larvas de *A. fraterculus* em cinco dosagens

| Dosagens<br>(Nem./larva) | 5                 | 14                | 40                 | 112                 | 316                   |
|--------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|
| Nematóides               |                   |                   |                    |                     |                       |
| <i>S. carpocapsae</i>    | 3,13<br>(1,0-4,0) | 5,00<br>(1,0-7,0) | 8,80<br>(3,0-10,0) | 12,25<br>(8,0-40,0) | 77,28<br>(43,0-112,0) |
| <i>S. glaseri</i>        | 3,33<br>(1,0-5,0) | 6,00<br>(2,0-5,0) | 10,6<br>(3,0-12,0) | 20,8<br>(12,0-25,0) | 54,87<br>(21,0-87,0)  |

Observou-se interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias de mortalidade de *A. fraterculus* nas diferentes dosagens e nas diferentes espécies de nematóides, porém só ocorreu diferença significativa entre as diferentes dosagens de nematóides (Tabela 7 e 8, Apêndice 3).

Nas doses de 40 e 316 nematóides/larva não ocorreu diferença significativa na comparação de médias de mortalidade de *A. fraterculus* inoculadas com *S. carpocapsae* e *S. glaseri* (Tabela 7). Comparando-se a média geral de mortalidade ocasionada em todas as doses, não ocorreu diferença significativa entre as espécies de *S. carpocapsae* e *S. glaseri*, mostrando que os nematóides possuem eficiência semelhante (Tabela 8).

**Tabela 7 - Comparação de médias do porcentual de mortalidade de *A. fraterculus*, inoculadas com diferentes dosagens de *S. carpocapsae* e *S. glaseri*.**

| Dosagens | Repetições | Médias    |   |           |
|----------|------------|-----------|---|-----------|
| 0        | 10         | 1,334000  | a | dms=12,66 |
| 5        | 10         | 20,000000 | b |           |
| 14       | 10         | 35,334000 | c |           |
| 40       | 10         | 53,999000 | d |           |
| 112      | 10         | 64,001000 | d |           |
| 316      | 10         | 85,986000 | e |           |

Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferenças significativas ao nível de 5%, segundo o teste de Tukey.

**Tabela 8 - Comparação de médias do porcentual de mortalidade de *A. fraterculus* inoculadas com *S. carpocapsae* e *S. glaseri***

| Nematóides            | Repetições | Médias    |   |          |
|-----------------------|------------|-----------|---|----------|
| <i>S. glaseri</i>     | 30         | 42,217667 | a | dms=5,14 |
| <i>S. carpocapsae</i> | 30         | 44,667000 | a |          |

Médias seguidas por letras iguais não apresentam diferenças significativas ao nível de 5%, segundo o teste de Tukey.

### **5.3 - Controle de *A. fraterculus* com *S. carpocapsae* em diferentes temperaturas**

Os resultados indicam que a mortalidade de *A. fraterculus* aumentou com o aumento da temperaturas e com o aumento das dosagens. Ocorreu interação significativa entre as temperatura e as doses (  $p = 0.0000$  ), desta forma, a proporção de larvas mortas foi influenciada pela combinação dos dois fatores (Apêndice 4).

A menor mortalidade de larvas, nas diferentes dosagens de nematóides, foi observada em temperatura de 15°C. A mortalidade foi significativa apenas para os resultados obtidos na temperatura de 20°C e, quando a dosagem foi aumentada de 112 para 316 nematóides/larva. Nestas condições, foi observado uma mortalidade de 59,46 e 82,43% respectivamente. A maior porcentagem de mortalidade foi observada em temperatura de 25°C. Entretanto, a mortalidade nesta temperatura, praticamente foi a mesma nas dosagens de 112 e 316 nematóides/larva onde ocorreu 91,76 e 90,38% respectivamente. Na temperatura de 30°C não foi observado diferença significativa entre as dosagens de 112 e 316 nematóides/larva (Tabela 9). A maior mortalidade foi encontrada em larvas de *A. fraterculus* expostas a 112 nematóides/larva e que foram mantidas a 25°C (Tabelas 9, 10 e 11, Figura 11 e Apêndice 8).

Existe diferença significativa entre todas as dosagens utilizadas. Porém a maior mortalidade obtida com a dose de 316 nematóides/larva, não justifica o uso desta dose, pois o aumento de 112 para 316 nematóides/larva, proporciona um acréscimo de 182% no número de nematóides/larva, e apenas um aumento 7,33% na mortalidade de *A. fraterculus* (Tabela 10).

Tabela 9 - Porcentagem de mortalidade de larvas de *A. fraterculus*, inoculadas com *S. carpocapsae* em diferentes temperaturas e dosagens

| <div> <div>Dosagens<br/>(nem./larva)</div> <div>Temp. (°C)</div> </div> | 0    | 5     | 14    | 40    | 112   | 316   |
|-------------------------------------------------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 15                                                                      | 1,33 | 6,67  | 12    | 18,67 | 20    | 22,67 |
| 15 *                                                                    |      | 5,41  | 10,81 | 17,57 | 18,92 | 21,62 |
| 20                                                                      | 1,33 | 13,33 | 16    | 40    | 60    | 82,67 |
| 20 *                                                                    |      | 12,16 | 14,86 | 39,19 | 59,46 | 82,43 |
| 25                                                                      | 2,67 | 26,67 | 41,33 | 60    | 91,98 | 90,64 |
| 25 *                                                                    |      | 24,66 | 39,72 | 58,90 | 91,76 | 90,38 |
| 30                                                                      | 4    | 21,33 | 49,33 | 61,33 | 74,67 | 80    |
| 30 *                                                                    |      | 18,05 | 47,22 | 59,72 | 73,61 | 79,17 |

(\*) Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott.

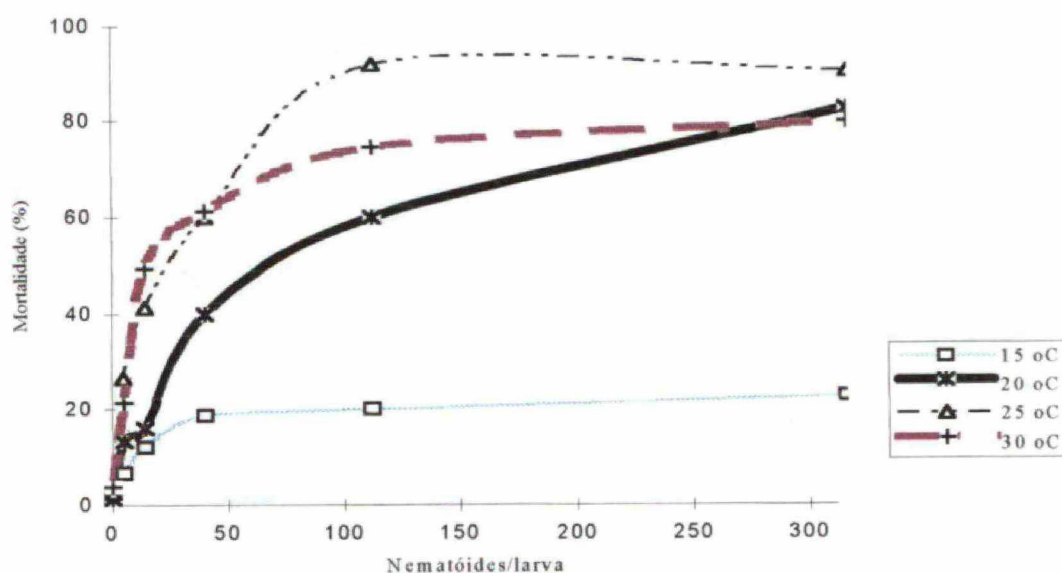


Figura 11 - Porcentagem de mortalidade de larvas de *A. fraterculus*, expostas a *S. carpocapsae* em diferentes temperaturas e dosagens

Tabela 10 - Comparação de médias do porcentual de mortalidade de *A. fraterculus*, inoculadas com *S. carpocapsae* em diferentes dosagens

| Dosagens | Repetições | Médias    |   |          |
|----------|------------|-----------|---|----------|
| 0        | 20         | 2,334000  | a |          |
| 5        | 20         | 17,000500 | b | dms=5,92 |
| 14       | 20         | 29,666500 | c |          |
| 40       | 20         | 45,000000 | d |          |
| 112      | 20         | 61,661000 | e |          |
| 316      | 20         | 68,995000 | f |          |

Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferenças significativas ao nível de 5%, segundo o teste de Tukey.

Tabela 11 - Comparação de médias de mortalidade de *A. fraterculus*, inoculadas com *S. carpocapsae* em diferentes temperaturas

| Temp. (°C) | Repetições | Médias    |   |          |
|------------|------------|-----------|---|----------|
| 15         | 30         | 13,555667 | a |          |
| 20         | 30         | 35,555667 | b | dms=4,35 |
| 25         | 30         | 52,215333 | c |          |
| 30         | 30         | 48,444667 | c |          |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5%, segundo o teste de Tukey.

A proporção média de mortalidade das larvas foram iguais para as temperaturas de 25 - 30°C e diferentes para as demais temperaturas.

Os resultados demonstram que não ocorreu interação significativa entre as dosagens e temperaturas, na porcentagem de formação de pupas. Desta forma, os fatores afetaram a formação de pupas de forma independente (Apêndice 5). Ocorreu maior formação de pupas na temperatura de 15°C, seguido por 20 e 25°C, e por último 30 °C. Nas temperaturas de 20 e 25°C, também aconteceu maior parasitismo das pupas, demonstrando que as larvas foram infectadas e continuaram o processo normal de formação de pupas. Nas doses de 112 e 316

nematóides/larva, formou-se mais pupas como também ocorreu maior parasitismo, comparando-se com as demais dosagens (Tabelas 12 e 13). A maior ocorrência de pupas, como também o maior número de pupas parasitadas foi observado nas doses de 112 e 316 nematóides/larva.

Tabela 12 - Porcentagem média do efeito de diferentes dosagens na formação de pupas sadias e parasitadas de *A. fraterculus*, inoculadas com *S. carpocapsae* em diferentes temperaturas

| <b>Temp. (°C)</b><br><b>Pupas</b> | <b>15</b> | <b>20</b> | <b>25</b> | <b>30</b> |
|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Sadias</b>                     | 48,43     | 30        | 27,77     | 22,66     |
| <b>Parasitadas</b>                | 10,45     | 18,67     | 18,9      | 8,67      |

Tabela 13 - Porcentagem média de formação de pupas de *A. fraterculus*, das quatro temperaturas, expostas a *S. carpocapsae* em diferentes dosagens

| <b>Dosagens</b><br><b>Pupas</b> | <b>0</b> | <b>5</b> | <b>14</b> | <b>40</b> | <b>112</b> | <b>316</b> |
|---------------------------------|----------|----------|-----------|-----------|------------|------------|
| <b>Sadias</b>                   | 35,34    | 43,66    | 36        | 30        | 27,66      | 20,33      |
| <b>Parasitadas</b>              | 0,66     | 6,67     | 7,67      | 13,33     | 26,01      | 31         |

#### 5.4 - Controle de *A. fraterculus* com aplicação de *S. carpocapsae* em solo textura barro-argilosa

##### Mortalidade

Os resultados alcançados demonstram que existe diferença significativa entre as diferentes dosagens de nematóides aplicadas em solo para o controle de *A. fraterculus* ( $p=0,0000$ ) (Apêndice 6). Na dosagem de 188 nematóides/cm<sup>2</sup> de solo não foram observadas larvas parasitadas; entretanto, 33,33% de pupas foram encontradas parasitadas por nematóides. Na dose de 531 nematóides/cm<sup>2</sup> de solo foi observado uma mortalidade de 61,34% de pupas e de 1,33% de larvas. A maior mortalidade (91,64%) foi obtida com a dose de 1497 nematóides/cm<sup>2</sup> de solo. Os resultados mostraram que quanto maior a dose, maior a mortalidade das larvas, ocorrendo diferença significativa entre todas as doses ( $p<0,05$ ) (Tabela 14 e15, Figura 12).

A DL<sub>50</sub> calculada para *S. carpocapsae* foi de 343,57 nematóides/cm<sup>2</sup> de solo, com um limite de 261,53 a 429,00 nematóides (Tabela 16).

Tabela 14 - Porcentagem de pupas e larvas de *A. fraterculus* sadias e parasitadas por *S. carpocapsae*, aplicados em solo textura barro argilosa.

| Nematóide/cm <sup>2</sup> de solo | 0     | 188   | 531   | 1497  |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Fase                              |       |       |       |       |
| Pupas sadias                      | 97,33 | 66,67 | 37,33 | 8,04  |
| Pupas parasitadas                 | 2,67  | 33,33 | 61,34 | 90,63 |
| Larvas parasitadas                | 0     | 0     | 1,33  | 1,33  |
| Mortalidade (*)                   | -     | 31,51 | 61,64 | 91,74 |

(\*) Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott.

Tabela 15 - Comparação de médias do porcentual de mortalidade de *A. fraterculus* expostas à diferentes doses de *S. carpocapsae* em solo textura barro-argilosa

| Dosagem | Repetições | Médias    |   |             |
|---------|------------|-----------|---|-------------|
| 0       | 5          | 2,668000  | a | dms=18,3846 |
| 890     | 5          | 33,334000 | b |             |
| 2510    | 5          | 62,666000 | c |             |
| 7074    | 5          | 91,960000 | d |             |

Médias seguidas por letras diferentes, diferem significativamente ao nível de 5%, segundo o teste de Tukey.

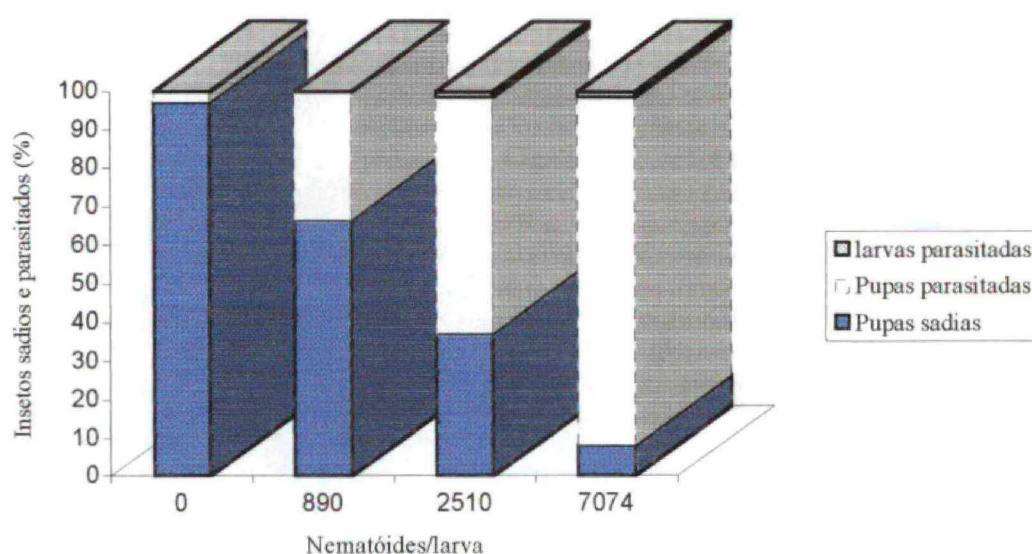


Figura 12 - Porcentagem de larvas e pupas de *A. fraterculus* saudáveis e parasitadas por *S. carpocapsae* em solo textura barro argilosa

Tabela 16 - DL<sub>50</sub> das larvas de *A. fraterculus* parasitadas por *S. carpocapsae* em solo

| Nematóides            | DL <sub>50</sub>                       | Limites         |
|-----------------------|----------------------------------------|-----------------|
| <i>S. carpocapsae</i> | 343,57 nematóides/cm <sup>2</sup> solo | 261,53 - 429,00 |

## 6 - DISCUSSÃO

Os resultados de laboratório mostraram que as larvas de *A. fraterculus* são suscetíveis aos nematóides entomopatogênicos.

Na observações realizadas em laboratório foi constatado que ocorreu a formação de grânulos de aspecto cristalino no interior das larvas e pupas de *A. fraterculus* parasitadas por *S. carpocapsae* e *S. glaseri*. A formação de melanina nas capsulas só foi observada em larvas e pupas parasitadas por *S. glaseri*. Estes mecanismos de defesa avaliados em larvas de *A. fraterculus* são citados também para os dípteros *Aedes aegypti*, *Musca domestica* e *Orithelia caesarium* quando parasitadas por nematóides, ocorrendo o encapsulamento em várias regiões do corpo (Nappi & Stoffolano, 1971, 1972a, 1972b; Andreadis & Hall, 1976; Beresky & Hall, 1977). As cápsulas provavelmente são resultados da ativação das fenoloxidasas da hemolinfa, com a composição final de proteína-polifenol, que isola fisicamente o patógeno (Gotz & Vey, 1974; Christensen *et al.*, 1984, 1989). Segundo Beresky & Hall (1977), é possível que a formação de fenoloxidasas possa causar um acúmulo de substâncias tóxicas as quais podem causar a morte dos parasitos. É provável que algumas proteínas sejam liberadas pelo hospedeiro ou pelo parasita em resposta ao parasitismo. Até o momento, a função desta proteína é desconhecida. Entretanto, segundo os mesmos autores, ela pode ser um importante mecanismo de defesa dos hospedeiros.

Novas estratégias de controle são necessárias para reduzir a população de *A. fraterculus*. Nos resultados obtidos em laboratório, foi evidenciado que a mortalidade das larvas de *A. fraterculus*, mostrou diferenças significativas entre as espécies e doses de

nematóides. Entretanto, observou-se que *S. carpocapsae* e *S. glaseri*, possuem eficiência semelhante na média geral de mortalidade.

Em larvas de *A. fraterculus* quando foi usada a dose de 40 nematóides/larva, não ocorreu diferença significativa entre a mortalidade causada por *S. carpocapsae* “strain” All (54,06%) e *S. glaseri* “strain” Alcídia (52,70%). Estes resultados diferem dos dados obtidos por Beavers e Calkins (1984), quando utilizaram esta mesma dose, para avaliar a mortalidade de larvas de 4 a 5 dias de *A. suspensa*, inoculadas com *S. feltiae* “strain” All e *S. glaseri* “strain” México. Os dados obtidos, apresentaram maior mortalidade das larvas de *A. suspensa* inoculadas *S. carpocapsae* “strain” All, com 90,7 % de mortalidade, comparado com *S. glaseri* “strain” México, que causou apenas 15,7% de mortalidade nas larvas. Segundo os autores, a baixa mortalidade causada por *S. glaseri* pode ser devido ao maior tamanho desta espécie. Este fato pode também ser explicado por Fan (1989) e Molyneux (1986), que citam que isolados de nematóides entomopatogênicos da mesma espécie, porém de regiões geográficas diferentes, apresentam comportamento distinto.

Em larvas de *A. fraterculus*, tanto *S. carpocapsae* como *S. glaseri*, desenvolveram-se melhor quando foram usadas as dosagens de 40 e 112 nematóides/larva, penetrando em média 8,8 e 12,25 *S. carpocapsae*/larva e 10,6 e 20,8 *S. glaseri*/larva. A necessidade de doses altas para um bom desenvolvimento dos nematóides, possivelmente esteja ligada as reações de defesa da larva, que aprisiona em cápsulas alguns nematóides, e causa a mortalidade de outros, quando ocorre a melanização (Rodrigues-Trentini & Schmitt, 1996).

Em todas as doses, ocorreu menor formação de pupas em larvas parasitadas por *S. glaseri* (32,81%), comparando com as larvas inoculadas com *S. carpocapsae* (55,75%). A razão para a menor formação de pupas das larvas inoculadas com *S. glaseri*, pode, provavelmente, estar relacionada com maior desgaste das reservas de carboidratos e

proteínas para atuar na defesa do inseto, pois somente quando parasitadas por este nematóide, ocorreu o encapsulamento e a melanização.

Em larvas de *A. fraterculus* inoculadas com *S. carpocapsae* na dose de 316 nematóides/larva, penetrou em média 77,28 infectivos/larva, e nas parasitadas por *S. glaseri* 54,87 infectivos/larva. Esta alta densidade de nematóides dentro das larvas gerou uma competição por espaço e alimento, ocorrendo a morte e liberação de nematóides juvenis e adultos para o meio externo. Este fato pode ser também observado em outras espécies de insetos (Zervos et al, 1991). Entretanto, a dose ideal para o controle de *A. fraterculus*, deveria ser estudada com mais detalhes, pois segundo os resultados obtidos neste trabalho a dose ideal estaria provavelmente entre 100 e 150 nematóides/larva. Segundo Fan (1989), o número de nematóides que penetram no inseto pode ser afetado pela temperatura e pelo tempo de exposição do inseto aos nematóides. Em geral, quanto maior o tempo em que o inseto está em contato com o nematóide, maior será o número de nematóides que irão penetrá-lo.

A produção de *S. carpocapsae* em larvas de *A. fraterculus*, quando foram usadas as doses de 40 e 112 nematóides/larva, foi de 10.592 nematóides/larva. As larvas pesaram em média 17,35 mg, produzindo 610,49 nematóides/miligrama. Esta produção foi superior a obtida em lagartas de *G. mellonella*, que produziram 60.000 nematóides/lagarta, e pesaram em média 114,50 miligrama, produzindo 524 nematóides/mg, sendo semelhante a produção citada por Woodring e Kaya (1988), que é de 30 a 50 mil nematóides por *G. mellonella*. Com as mesmas doses (40 e 112 nematóides/larva) *S. glaseri* produziu 1.056 nematóides/larva ou 60,68 nematóides/miligrama. Esta menor produção provavelmente se deve ao fato deste nematóide possuir pelo menos o dobro do tamanho de *S. carpocapsae*,

necessitando assim mais espaço e alimento, podendo estar relacionada também com o tamanho do hospedeiro.

Nas diferentes temperaturas e dosagens observou-se interação significativa entre os fatores doses e temperatura, sendo que com o aumento das dosagens e das temperaturas até 25 °C, houve um aumento da mortalidade das larvas, não ocorrendo diferença significativa para as temperaturas de 25 e 30 °C. *S. carpocapsae* foi mais efetivo nas temperaturas de 25 e 30°C do que em 15 e 20 °C. Estes dados coincidem com Zervos *et al.* (1990), que trabalhando com larvas de *G. mellonella* com diferentes dosagens de nematóides e temperaturas, obteve interação significativa entre as temperaturas e dosagens, sendo 25 °C a melhor temperatura para a mortalidade, desenvolvimento e reprodução do nematóide.

As larvas de *A. fraterculus* parasitadas por *S. carpocapsae* nas temperaturas de 15 a 30°C, 72 h após a inoculação, foram transferidas para incubadoras com temperatura de 25°C, observando-se que em todos os casos, ocorreu liberação de infectivos 10 a 15 dias após a inoculação. Entretanto, Kaya (1977), inoculando larvas de *G. mellonella* com *S. carpocapsae* “strain” All, observou que na temperatura de 30 °C, os nematóides tornaram-se adultos, mas não se reproduziram. Também Zervos *et al.* (1990), não observou a liberação de infectivos de *H. heliothidis* em temperatura de 30 °C. Este fato pode sugerir que *S. carpocapsae* “strain” All suporte períodos com temperaturas altas (30°C), e com a queda da temperatura ocorra a produção dos infectivos.

No presente trabalho, na temperatura de 25°C, quando foi usado *S. carpocapsae* na dose de 40 nematóides/larva, em *A. fraterculus* com 8 dias (larva), obteve-se 60 % de mortalidade. Beavers e Calkins (1984), trabalhando com larvas, pupas e adultos de *A. suspensa*, utilizando 40 nematóides/inseto (*S. feltiae*= *S. carpocapsae*), com o “strain”

México obteve 90,7 % de mortalidade em larvas de quatro a cinco dias (início do terceiro instar), e com o “strain” All 88,1 %. Devido a diferença na idade das larvas utilizadas nos experimentos acima, podemos sugerir que a mortalidade foi semelhante, pois larvas mais jovens são mais suscetíveis ao parasitismo, como foi observado em laboratório.

A aplicação de *S. carpocapsae* em solo textura barro-argilosa nas dosagens de 890, 2510 e 7074 nematóides/larva (ou 188, 531 e 1497 nematóides/cm<sup>2</sup> de solo) ocasionou uma mortalidade de 31,51; 61,34 e 91,74 % para as referidas dosagens. Estes dados foram semelhantes aos encontrados por Lindegren e Vail (1986) quando inocularam *S. feltiae* México em vermiculita para o controle *C. capitata*, *Dacus dorsalis* e *D. cucurbitae*, e obtiveram mortalidade de 9 a 92 %, 9 a 85 % e 0 a 86 % de mortalidade respectivamente, com as doses de 50 a 5000 nematóides/larva. Na dose de 5000 nematóides/larva, os referidos autores obtiveram 85 a 92 %, sugerindo que a mortalidade de 91,74% para *A. fraterculus* com a dose de 7074 nematóides/larva, possa ser obtida com uma menor dose.

Lindegren *et al.* (1990) em experimentos de campo também com *S. feltiae* para o controle de larvas de *C. capitata* durante três anos consecutivos, usando 150, 500, 1500 e 5000 nematóides/cm<sup>2</sup> de solo, obteve mortalidade de 18,0 a 80,6%, 52,0 a 96,5%, 70,0 a 98,7% e 92,0 a 99,6 % respectivamente, sendo a maior mortalidade obtida no terceiro ano. Se compararmos estes dados, com os resultados obtidos para *A. fraterculus*, pode-se concluir que os mesmos sejam semelhantes, sugerindo que as espécies *A. fraterculus* e *C. capitata* possuem suscetibilidade semelhante a *S. carpocapsae*, assim como as espécies *D. dorsalis* e *D. cucurbitae*.

Lindegren *et al.* (1990) sugere que 500 nematóides/cm<sup>2</sup> de solo pode ser uma dose efetiva para suprimir *C. capitata*, com mortalidade de 52%, no primeiro ano e 96,5 % no

terceiro ano, ocorrendo maior eficiência do bioinseticida em solo, do que em vermiculita. Em *A. fraterculus*, com dose semelhante, ocorreu mortalidade de 61,64 % em solo barro-argiloso e a  $DL_{50}$  foi calculada em 343,57 n./cm<sup>2</sup> de solo, podendo ser observado que os dados de mortalidade de *C. capitata* e *A. fraterculus* são equivalentes, para o primeiro ano.

Em solo 99,33 % das larvas utilizadas nos experimentos empuparam, já em placa de Petri, com a mesma temperatura, apenas 46,67 % das larvas conseguiram empupar, mostrando que apesar de não terem sido expostas a fotofase, a ausência de solo ou substrato para a larva se enterrar interferiu na formação das pupas. Desta forma, em solos a larva muitas vezes empupa antes da penetração dos nematóides. Beavers e Calkins (1984), citam que nos solos, quando a larva empupa antes do parasitismo, os nematóides ficam em volta da pupa, podendo infestar o imago no momento da emergência. Outros autores que trabalharam com pupas, imagos e adultos de mosca-das-frutas, em placas de Petri, observaram alta mortalidade em imagos (45,6 a 100 %) (Ghally, 1988) e em adultos (75 a 93,4%) (Poinar & Hislop, 1981), e baixa mortalidade em pupas (0,4 a 1,1 %) (Beavers & Calkins, 1984). Este fato foi observado também em solo com pupas de *A. fraterculus*, onde ocorreu concentração de grande quantidade de infectivos em volta das pupas, sugerindo em consequência, o parasitismo dos adultos, no momento da emergência.

A aplicação de *S. carpocapsae* e *S. glaseri* causou mortalidade de larvas de *A. fraterculus*. Isto indica que as duas espécies são agentes potenciais para o controle biológico de *A. fraterculus* podendo esta prática ser implementada para um futuro uso no controle biológico ou integrado de moscas-das-frutas. Entretanto, são necessárias pesquisas adicionais com o desenvolvimento de diferentes técnicas de aplicação a fim de obter um melhor controle e, o conhecimento das melhores dosagens e época de aplicação

para obter um controle economicamente viável. São também necessárias maiores pesquisas para *demonstrar as possíveis causas e os efeitos das reações produzidas durante o processo de encapsulamento e melanização em larvas e pupas de *A. fraterculus*.*

## **7 - CONCLUSÕES**

As larvas de *A. fraterculus* são capazes de encapsular *S. carpocapsae* e *S. glaseri*, porém só ocorre melanização nas larvas parasitadas por *S. glaseri*.

*S. carpocapsae* é tão efetivo quanto *S. glaseri*, no controle de larvas de *A. fraterculus*.

*S. carpocapsae* e *S. glaseri* apresentam maior produção e melhor desenvolvimento nas dosagens de 40 e 112 nematóides/larva.

Os infectivos de *S. carpocapsae* produzidos em larvas de *A. fraterculus* são de terceira geração, e os infectivos de *S. glaseri* de segunda geração.

A produção de *S. carpocapsae* foi dez vezes maior (10592 nematóides/larva) que a produção de *S. glaseri* (1056 nematóides/larva) em larvas de *A. fraterculus*.

Ocorre maior formação de pupas, nas larvas inoculadas por *S. carpocapsae* (55,75 %) do que nas inoculadas por *S. glaseri* (32,81 %), com uma percentagem semelhante de pupas parasitadas para as duas espécies de nematóides.

O melhor controle de larvas de *A. fraterculus* é obtido com a aplicação de *S. carpocapsae* na dosagem de 112 nematóides/larva e na temperatura de 25 °C (91,76% de mortalidade).

Na temperatura de 15°C ocorre maior formação de pupas (58,88 %), e também menor parasitismo das larvas pelos nematóides (5,41 a 21,62 %).

Na temperatura de 30°C ocorre menor formação de pupas (31,33%), e alto parasitismo das larvas pelos nematóides (18,05 a 79,17%).

Nas quatro temperaturas, nas doses de 112 e 316 nematóides/larva 48,46 e 60,39 % do total de pupas formadas, estão parasitadas, mostrando maior pressão dos nematóides sobre as larvas, que foram infestadas e continuaram a empupar.

Em solo, a aplicação de 1497 nematóides/cm<sup>2</sup> obteve melhor controle (91,74%) das larvas de *A. fraterculus*.

Em solo a 25°C, 99,33 % das larvas utilizadas nos experimentos empuparam, já em placa de Petri, com a mesma temperatura, apenas 46,67 % das larvas conseguiram empupar.

Para a aplicação a campo dos nematóides entomopatogênicos, no controle biológico de *A. fraterculus*, existe a necessidade de mais trabalhos, possibilitando calcular as doses, custos, melhor época e metodologia para aplicação, nas condições naturais.

## Bibliografia Citada

- AGUILLERA, M. M. 1996. Tecnologia para produção e formulação comercial de nematóides entomopatogênicos p. 192-198. *In: V Simpósio de Controle Biológico*, Foz do Iguaçu, PR.
- AKHURST, R. J. 1982. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp. , bacteria symbiotically with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *J. Gen. Micro.* 128: 3061-3065.
- AKHURST, R. J. 1986. Controlling insects in soil with entomopathogenic nematodes p. 265-267. *In: SAMSON, R. A., VLAK, J. M., PETERS, D. (Eds.). Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology*. Wageningen: Foundation of the Fourth International Colloquium od Invertebrate Pathology.
- AKHURST, R. J. & BOEMARE, M. E. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus* p. 75-89. *In: GAUGLER, R., KAYA, H. K. (eds.) 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press. Boca Raton, FL.
- ALUJA, M. 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 155-178.
- ANDREADIS, T. G. & HALL, D. W. 1976. *Neoaplectana carpocapsae*: encapsulation in *Aedes aegypti* and changes in host hemocytes and hemolymph proteins, *Exp. Parasitol.* 39: 252-261.
- BALIÚ, M. B. & MALAVASI, A. 1985. Oviposição de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) em laboratório p. 728. *In: 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência*, Brasília.
- BATEMAN, M. A. 1972. The ecology of fruit flies. *Annu. Rev. Entomol.* 17: 493-519.

- BEAVERS, B. J. & CALKINS, C. O. 1984. Susceptibility of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) to Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes in Laboratory Studies. **Environ. Entomol.** 13: 137-139.
- BERESKY, M. A. & HALL, D. W. 1977. The influence of phenylthiourea on encapsulation, melanization, and survival in larvae of the mosquito *Aedes aegypti* paratized by the nematode *Neoaplectana carpocapsae*. **J. Invertebr. Pathol.** 29: 74-80.
- BRESSAN, S. & TELES, M. C. 1991. Lista de hospedeiros e índices de infestação de algumas espécies do gênero *Anastrepha* Schiner, 1868 (Diptera: Tephritidae) na região de Ribeirão Preto - SP. **An. Soc. Entomol. Brasil** 20: 5-15.
- BURG, T. 1991. Sex in lecks: an overview of sexual behavior in *Anastrepha* fruit flies p. 171-183. *In*: KAWASAKI, K., IWAKASHI, I., KAMESHIRO, K.Y. (eds) **Proceedings of the International Symposium on the Biology and Control of Fruit Flies**. Ginowan, Okinawa, Japan.
- CARVALHO, R. P. L. 1988. Alternativas de controle: Métodos culturais, atraentes, resistência vegetal e controle biológico p. 86-107. *In*: SOUZA, H. M. L. (coord.) **Moscas-das-frutas no Brasil - Anais**. Fundação Cargill. Campinas, SP.
- CHAPMAN, R. F. 1982. The haemolymph p. 796-817. *In*: CHAPMAN, R. F. (ed.). **The insects - Structure and function**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- CHRISTENSEN, B. M., HUFF, B. M., MIRANPARI, G. S., HARRIS K. L. & CHRISTENSEN, L. 1989. Hemocyte population changes during the immune response of *Aedes aegypti* to inoculated microfilariae of *Dirofilaria immitis*. **J. Parasitol.** 75: 119-123

- CHRISTENSEN, B. M., SUTHERLAND, D. R. & GLEASON, L. N. 1984. Defense reactions of mosquitoes to filarial worms: comparative studies on the response of three different mosquitoes to inoculated *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* microfilariae. **J. Invertebr. Pathol.** 44: 267-272.
- CHRISTENSON, L. D. & FOOTE, R. H. 1960. Biology of fruit flies. **Annu. Rev. Entomol.** 5: 171-192.
- DUTRY, S. R., THOMPSON, J. V. & CANTWELL, G. E. 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. **J. Insect Pathol.** 6: 417-422.
- EPSKY, N. D., WALTER, D. E. & CAPINERA, J. L. 1988. Potential role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). **J. Econ. Entomol.** 81: 821-825.
- FAN, X. 1989. **Biomonics of British strains of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae)**. Imperial College of London University. (tese de doutorado).
- FARIA, J. T. & SUPPLY FILHO, N. 1989. As possibilidades de criação de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830), em frutos de mamões papaia, p. 513. In: **Anais do 12º Congresso Brasileiro de Entomologia**, Belo Horizonte - MG.
- GEORGIS, R. 1992. Present and future prospects for entomopathogenic nematode products. **Bioc. Sci. Technol.** 2: 83-89.
- GEORGIS, R. & HOM, A. 1992. Introduction of entomopathogenic nematode products into Latin America and the Caribbean. **Nematropica** 22: 81-98.
- GHALLY, S. 1988. Pathogenicity of the nematode *Steinernema feltiae* Filipjev in relation to different insect hosts. **J. Egypt. Soc. Parasitol.** 18: 297-304.

- GHALLY, S. E., EL-DIN, O. S. E. S. & AMIN, M. A. 1988. Effects of the parasitic nematodes on total proteins and total lipids of *Ceratitis capitata* Wied (Diptera, Trypetidae). **J. Egypt. Soc. Parasitol.** 18: 619-627.
- GOMES, P. 1973. **Fruticultura brasileira**. Livraria Nobel, São Paulo. 446 p.
- GONZALEZ, J. G., VARGAS, C. V. & JARAP, B. 1971. Estudios sobre la aplicación de la técnica de machos estériles en el control de la mosca sudamericana de la fruta *Anastrepha fraterculus* (Wied.). **Rev. Peru. Entomol.** 14: 66-85.
- GÖTZ, P. & VEY, A. 1974. Humoral encapsulation in Diptera (Insecta): defense reactions of *Chironomus* larvae against fungi. **Parasitol.** 68: 193-205.
- HERRERA, J. & VIÑAS, L. E. 1977. "Moscas-de-fruta" (Diptera: Tephritidae) em mangoes de Chulucanas, Piura. **Rev. Peru. Entomol.** 20: 107-114.
- HICKEL, E. R. & SCHUCK, E. 1993. Ocorrência de mosca-das-frutas, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) em frutos de Quivi p. 178. **In: XIV Congresso Brasileiro de Entomologia**, Piracicaba, SP.
- KAYA, H. K. 1977. Development of the DD-136 strain of *Neoaplectana carpocapsae* at constant temperatures. **J. Nematol.** 9: 346-349.
- KAYA, H. K. 1985. Entomogenous nematodes for insect control in IPM systems p. 283-302. **In: HOY, M. A., HERZOG, D. C. (eds). Biological control in agricultural IPM systems**. Academic Press. New York, NY.
- KAYA, H. K. 1990. Soil ecology p. 93-115. **In: GAUGLER, R., KAYA, H. K. (eds.) 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control**. CRC Press. Boca Raton, FL.

- KAYA, H. K. & GAUGLER, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. **Annu. Rev. Entomol.** 38: 181-206.
- KOVALESKI, A., CARVALHO, R. P. L. & SALLES, L. A. B. 1984. Avaliação de danos em frutos de macieira p. 292. *In: IX Congresso Brasileiro de Entomologia*, Londrina, PR.
- KOLLER, O. L. **Cadeia produtiva de citrus**. EPAGRI (no prelo).
- KUNG, S.-P. & GAUGLER, R. 1990. Soil type and entomopathogenic nematode persistence. **J. Invertebr. Pathol.** 55: 401-406.
- KUNG, S.-P., GAUGLER, R. & KAYA, H. K. 1990. Influence of soil pH and oxygen on persistence of *Steinernema* spp. **J. Nematol.** 22: 440-445.
- KUNG, S.-P., GAUGLER, R. & KAYA, H. K. 1991. Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. **J. Invertebr. Pathol.** 57: 242-249.
- LINDEGREN, J. E. & VAIL, P. V. 1986. Susceptibility of mediterranean fruit fly, melon fly, and oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* in laboratory tests. **Environ. Entomol.** 15: 465-468.
- LINDEGREN, J. E., WONG, T. T. & McINNIS, D. O. 1990. Response of mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* in field tests in Hawaii. **Environ. Entomol.** 19: 383-386.
- LOPES, R. M. 1986. **Desenvolvimento ovariano e aspectos reprodutivos de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae)**. USP, São Paulo. 96 p. (Tese de mestrado).

- MALAVASI, A. 1984. Estudos de duas espécies crípticas do gênero *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). Instituto de Biociências da USP, São Paulo. 189 p. (Tese de Livre-Docência).
- MALAVASI, A. & MORGANTE, J. S. 1980. Biologia de “moscas-das-frutas” (Diptera: Tephritidae). II: índices de infestação em diferentes hospedeiros e localidades. *Rev. Brasil. Biol.* 40: 17-24.
- MALAVASI, A., MORGANTE, J. S. & PROKOPY, R.J. 1983. Distribution and activities of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) flies on host and nonhost trees. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 76: 286-292.
- MALAVASI, A., MORGANTE, J. S. & ZUCCHI, R. A. 1980. Biologia de “moscas-das-frutas” (Diptera: Tephritidae). I: Lista de hospedeiros e ocorrência. *Rev. Brasil. Biol.* 40: 9-16.
- MARTINS, J. C. 1986. Aspectos biológicos de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera, Tephritidae) em dieta artificial sob diferentes condições de laboratório. ESALQ/USP, Piracicaba. 79 p. (Tese de mestrado).
- MOLYNEUX, A. S. 1985. The biology and ecology of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae) and *Steinernema* spp. (Steinernematidae). *J. Aust. Ent. Soc.* 24: 86.
- MOLYNEUX, A. S. 1986. *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp. (= *Neoplectana* spp.): temperature and aspects of behaviour and infectivity. *Exp. Parasitol.* 62: 169-180.
- MORRIS, O. N. 1985. Susceptibility of 31 species of agricultural insect pests to the entomogenous nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Can. Entomol.* 117: 401-407.

- NAPPI, A. J. & STOFFOLANO, Jr., J. G. 1971. *Heterotylenchus autumnalis*: hemocytic reactions and capsule formation in the host, *Musca domestica*. **Exp. Parasitol.** 116-125.
- NAPPI, A. J. & STOFFOLANO, Jr., J. G. 1972(a). Distribution of hemocytes in larvae of *Musca domestica* and *Musca autumnalis* possible chemotaxis during parasitization. **J. Insect Physiol.** 18: 169-179.
- NAPPI, A. J. & STOFFOLANO, Jr., J. G. 1972(b). Haemocytic changes associated with the immune reaction of nematodes infected larvae of *Orthellia caesarion*. **Parasitol.** 65: 295-302.
- NASCIMENTO, A. S. & CARVALHO, R. S. 1996. Controle biológico de moscas-das-frutas neotropicais com parasitóides no Brasil p. 97-104. *In*: V Simpósio de Controle Biológico, Foz do Iguaçu, PR.
- NASCIMENTO, A. S., ZUCCHI, R. A., MORGANTE, J. S. & MALAVASI, A. 1982. Dinâmica populacional das moscas das frutas do gênero *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) no recôncavo baiano. II - Flutuação populacional. **Pesp. agropec. bras.** 17: 969-980.
- NORA, I. 1994. Mosca-das-frutas. **Agrop. Catarinense** v.7, nº 4:12.
- ORLANDO, A. & SAMPAIO, A. S. 1973. Moscas-das-frutas. Notas sobre o reconhecimento e combate. **O Biológico**, São Paulo 39: 143-150.
- POINAR Jr., G. O. 1975. **Entomogenous nematodes - A manual and host list of insect - Nematode associations**. Brill, Leiden, 317 p.
- POINAR Jr., G. O. 1988. A microsporidian parasite of *Neoapectana glaseri* (Steinernematidae: Rhabditida). **Revue Nématol.** 11: 359-361.

- POINAR Jr., G. O. 1990 (a). Non-insect hosts for the entomogenous rhabditoid nematodes *Neoaplectana* (Steinernematidae) and *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae). **Revue Nématol.** 12: 423-428.
- POINAR Jr., G. O. 1990 (b). Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae p. 23-61. *In*: GAUGLER, R., KAYA, H. K. (eds.). **Entomopathogenic nematodes in biological control.** CRC Press. Boca Raton, FL.
- POINAR Jr. G. O. & HISLOP, R. G. 1981. Mortality of mediterranean fruit fly adults (*Ceratitis capitata*) from parasitic nematodes (*Neoaplectana* and *Heterorhabditis* spp.). **IRCS Med. Sci.** 9: 641.
- POINAR Jr., G. O. & JANSSON, H.-B 1986 (a). Infection of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* (Rhabditida: Nematoda) with the predatory fungi, *Monacrosporium ellipso sporum* and *Arthrobotrys oligospora* (Moniliales: Deuteromycetes). **Revue Nématol.** 9: 241-244.
- POINAR Jr., G. O. & JANSSON, H.-B. 1986 (b). Susceptibility of *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis heliothidis* to the endoparasitic fungus *Drechmeria coniospora*. **J. Nematol.** 18: 225-230.
- POINAR Jr., G. O. & LEUTENEGGER, R. 1971. Ultrastructural investigation of the melanization process in *Culex pipiens* (Culicidae) in response to a nematode. **J. Ultrastruct. Res.** 36: 149-158.
- POINAR Jr., G. O., LEUTENEGGER, R. & GÖTZ, P. 1968. Ultrastructure of the formation of a melanotic capsule in *Diabrotica* (Coleoptera) in respocta to parasitic nematode (Mermithidae). **J. Ultrastruct. Res.** 25: 293-306.
- POINAR Jr., G. O., THOMAS, G. & PROKOPY, R. J. 1977. Microorganisms associated with *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) in Massachusetts. **Proc. Entomol. Soc. Ont.** 108: 19-22.

POPIEL, I., GROVE, D. L. & FRIEDMAN, M. J. 1989. Infective juvenile formation in the insect parasitic nematode *Steinernema feltiae*. **Parasitol.** 99: 77-81.

RAGA, A. 1990. Uso de radiação gama na desinfestação de mangas destinadas à exportação em relação à *Ceratitidis capitata* (Wied., 1824), *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) e *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) (Diptera, Tephritidae). ESALQ/ USP, Piracicaba. 134 p. (Tese de mestrado).

RODRIGUES - TRENTINI, R.F. & SCHMITT, A. T. 1996. Mecanismos de defesa de *Anastrepha fraterculus* (Wiedmann, 1830) contra o parasitismo de nematóides entomopatogênicos p. 375. In: V Simpósio de Controle Biológico, Foz do Iguaçu, PR.

SALLES, L. A. B. 1991. Mosca das frutas (*Anastrepha* spp): bioecologia e controle. Documento 41. EMBRAPA. Pelotas, RS. 16 p.

SALLES, L. A. B. 1992. Metodologia de criação de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae) em dieta artificial em laboratório. **An. Soc. Entomol. Brasil** 21: 479-486.

SALLES, L. A. B. 1993. Influência do fotoperíodo no desenvolvimento de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae). **An. Soc. Entomol. Brasil** 22: 47-55.

SALLES, L. A. B. 1995. Isca tóxica para o controle de adultos de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae). **An. Soc. Entomol. Brasil** 24: 153-157.

SALLES, L. A. B., CARVALHO, F. L. C. & JUNIOR, C. R. 1995. Efeito da temperatura e umidade do solo sobre pupas de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830). **An. Soc. Entomol. Brasil** 24: 147-151.

SCHMITT, A. T. 1993. **Biological control of the banana weevil (*Cosmopolites sordidus* (Germar)) with entomopathogenic nematodes.** University of Reading, Department of Agriculture. 210 p. (Tese de doutorado).

- SIMONS, W. R. & POINAR Jr., G. O. 1973. The ability of *Neoaplectana carpocapsae* (Steinernematidae: Nematodea) to survive extended periods of desiccation. **J. Invertebr. Pathol.** 22: 228-230.
- TIMPER, P. & KAYA, H. K. 1992. Impact of a nematode-parasitic fungus on the effectiveness of entomopathogenic nematodes. **J. Nematol.** 24: 1-8.
- WASSINK, H. & POINAR Jr., G. O. 1984. Nematological reviews - Resenas nematologicas use of the entomogenous nematode, *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Steinernematidae: Rhabditida), in Latin America. **Nematropica** 14: 97-109.
- WELCH, H. E. & BRONSKILL, J. F. 1962. Parasitism of mosquito larvae by the nematode, DD-136 (Nematoda: Neoaplectanidae), **Can. J. Zool.** 40: 1263.
- WHITE, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larval from cultures. **Sci.** 66: 302.
- WILLIAMS, E. C. 1991. **Comparative investigation of two nematode (*Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis* sp.) biocontrol products.** University of London. Imperial College of Science, Technology & Medicine, Departament of Pure and Applied Biology, Silwood park, Ascot, Berdshire, SL5 7PY. 87 p. (Tese de mestrado).
- WOODRING, J. L. & KAYA, H. K. 1988. **Steinernematid and heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques.** Southern Cooperative Series Bulletin 331. Arkansas Agricultural Experiment Station Fayetteville, Arkansas. 30 p.
- WOODRING, J. P. 1985. Circulatory systems, p. 06-57. In: BLUM, M.S. (ed.). **Fundamentals of insect physiology**, A Wiley-Interscience Publication - John Wiley & Sons, 06-57.

ZERVOS, S. JOHNSON, S. C. & WEBSTER, J. M. 1991. Effect of temperature and inoculum size on reproduction and development of *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema glaseri* (Nematoda: Rhabditoidea) in *Galleria mellonella*. **Can. J. Zool.** 69: 1261-1264.

ZUCCHI, R. A. 1988. Moscas-das-frutas (Dip., Tephritidae) no Brasil: Taxonomia, distribuição geográfica e hospedeiros p. 1-10. *In*: SOUZA, H. M. L. (coord.) **Moscas-das-frutas no Brasil - Anais**. Fundação Cargill. Campinas, SP.

ZUCCHI, R. A. & CANAL D., N. A. 1996. Braconídeos parasitóides de moscas-das-frutas na América do Sul p. 89-95. *In*: **V Simpósio de Controle Biológico**, Foz do Iguaçu, PR.

## Apêndices

### Apêndice 1 - Laudo de análise química do solo

|                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                   |                                                                                                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO</b><br><b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ</b><br><b>SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS</b><br><b>DEPARTAMENTO DE SOLOS</b><br>Rua dos Funcionários, s/n - FONE 252-3422 - Cx. P. 672<br>80001 - Curitiba - Paraná |  | <b>LAUDO DE ANÁLISE QUÍMICA</b><br><b>CERTIFICADO Nº 9590/96</b><br>Total de amostras : 1<br>Data ENTRADA : 06/08/96<br>Data SAÍDA : 08/08/96 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

---

|                                                                                                                               |                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| SOLICITANTE : ROSITA RODRIGUES TRENTINI<br>COMUNIDADE :<br>ENDEREÇO (p/ Correspondência) : R: ANTONIO DOS REIS CAVALHEIRO, 91 | DENOM/INQVEL :<br>MUNICÍPIO : TERRA ORGANICA      ESTADO : PR |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|

---

| IDENTIFICAÇÃO | pH   | CaCl <sub>2</sub> | Al <sup>3+</sup> | H <sup>+</sup> Al | Ca <sup>2+</sup> + Mg <sup>2+</sup> | K <sup>+</sup> | T    | P    | C   | N    | V |
|---------------|------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------------------------|----------------|------|------|-----|------|---|
| 01            | 4.80 | 0.3               | 6.2              | 6.9               | 0.96                                | 14.1           | 80.0 | 29.6 | 3.7 | 55.9 |   |

Neste laudo NÃO constam recomendações de adubos e corretivos, e seu valor é restrito apenas a amostra analisada.

  
 Responsável Técnico  
 Prof. José Alvaro Dionísio  
Coord. em Ciência de Fertilidade do Solo  
CREA Nº 12068

  
 Chefe do Departamento  
 Prof. Valmiquir Costa Lima  
Eng.º Agr.º - CREA/PR Nº 17528

### Apêndice 2 - Laudo de análise física do solo

|                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO</b><br><b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ</b><br><b>SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS</b><br><b>DEPARTAMENTO DE SOLOS</b><br>Rua dos Funcionários, s/n - FONE 252-3422 - Cx. P. 672<br>80001 - Curitiba - Paraná | <b>LAUDO VETTORI Simples</b><br><b>CERTIFICADO Nº 9590/96</b><br>Total de amostras : 1<br>Data ENTRADA : 06/08/96<br>Data SAÍDA : 14/08/96 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

---

|                                                                                                                               |                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| SOLICITANTE : ROSITA RODRIGUES TRENTINI<br>COMUNIDADE :<br>ENDEREÇO (p/ Correspondência) : R: ANTONIO DOS REIS CAVALHEIRO, 91 | DENOM/INQVEL :<br>MUNICÍPIO : TERRA ORGANICA      ESTADO : PR |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|

---

| IDENTIFICAÇÃO | %     | %     | %      |
|---------------|-------|-------|--------|
| DA AMOSTRA    | AREIA | SILTE | ARGILA |
| 01            | 42.0  | 28.0  | 30.0   |

Selo Franco - argila

Uay - com

NOTA : A presente análise tem seu valor restrito as amostras entregues ao S.C.A.

  
 Responsável Técnico  
 Prof. Valmiquir Costa Lima  
Eng.º Agr.º - CREA/PR Nº 17528

  
 Chefe do Departamento  
 Prof. Valmiquir Costa Lima  
Eng.º Agr.º - CREA/PR Nº 17528

Apêndice 3 - Quadro da análise de variância: Controle de Mortalidade de *A. fraterculus* inoculadas com diferentes dosagens de *S. carpocapsae* e *S. glaseri*

| Coef. de variação | S.Q.      | G. L. | Q.M.      | Valor F | Prob.>F |
|-------------------|-----------|-------|-----------|---------|---------|
| <b>Fatores</b>    |           |       |           |         |         |
| A: Dosagens       | 47324.654 | 5     | 9464.9307 | 103.959 | .0000   |
| B: Nematóides     | 89.989    | 1     | 89.9885   | .988    | .3357   |
| <b>Interações</b> |           |       |           |         |         |
| AB                | 1843.0931 | 5     | 368.61862 | 4.049   | .0038   |
| <b>Resíduo</b>    | 4370.1413 | 48    | 91.04461  |         |         |
| <b>TOTAL</b>      | 53627.876 | 59    |           |         |         |

Apêndice 4: Quadro da análise de variância: Controle de *A. fraterculus* com *S. carpocapsae* em diferentes temperaturas

| Coef. de variação | S.Q.      | G. L. | Q.M.      | Valor F | Prob.>F |
|-------------------|-----------|-------|-----------|---------|---------|
| <b>Fatores</b>    |           |       |           |         |         |
| A: Dosagens       | 67003.202 | 5     | 13400.640 | 323.272 | .0000   |
| B: Temperatura    | 27402.757 | 3     | 9134.252  | 220.351 | .0000   |
| <b>Interações</b> |           |       |           |         |         |
| AB                | 13692.714 | 15    | 912.84759 | 22.021  | .0000   |
| <b>Resíduo</b>    | 3979.5001 | 96    | 41.453126 |         |         |
| <b>TOTAL</b>      | 112078.17 | 119   |           |         |         |

Apêndice 5 - Quadro da análise de variância da formação de pupas: Controle de *A.*

*fraterculus* com *S. carpocapsae* em diferentes temperaturas

| Coef. de variação | S.Q.      | G. L. | Q.M.      | Valor F | Prob.>F |
|-------------------|-----------|-------|-----------|---------|---------|
| <b>Fatores</b>    |           |       |           |         |         |
| A:CONCENTRAÇÃO    | 4352.799  | 5     | 870.5599  | 5.300   | .0002   |
| B:TEMPERATURA     | 11644.878 | 3     | 3881.6259 | 23.630  | .0000   |
| <b>Interações</b> |           |       |           |         |         |
| AB                | 3378.6512 | 15    | 225.2434  | 1.371   | .1774   |
| <b>Resíduo</b>    | 15769.432 | 96    | 164.26491 |         |         |
| <b>Total</b>      | 35145.760 | 119   |           |         |         |

Apêndice 6 - Quadro da análise de variância: Controle de *A. fraterculus* com aplicação de

*S. carpocapsae* em solo textura barro-argilosa

| Coef. de variação   | S.Q.      | G. L. | Q.M.      | Valor F | Prob.>F |
|---------------------|-----------|-------|-----------|---------|---------|
| Entre dosagens      | 22085.922 | 3     | 7361.9739 | 71.381  | .0000   |
| Dentro das dosagens | 1650.172  | 16    | 103.1358  |         |         |
| <b>Total</b>        | 23736.094 | 19    |           |         |         |

Apêndice 7 - Médias, desvio padrão e intervalo de confiança para os fatores doses e nematóide: Mortalidade de *A. fraterculus* expostas a *S. carpocapsae* e *S. glaseri*

| Nível                     | Parcelas | Médias    | desvio<br>padrão | Intervalo de<br>confiança (95%) |           |
|---------------------------|----------|-----------|------------------|---------------------------------|-----------|
| Média geral               | 60       | 43.442333 | 1.2318320        | 40.965002                       | 45.919664 |
| <b>DOSAGENS (A)</b>       |          |           |                  |                                 |           |
| 0                         | 10       | 1.334000  | 3.0173599        | -4.734197                       | 7.402197  |
| 5                         | 10       | 20.000000 | 3.0173599        | 13.931803                       | 26.068197 |
| 14                        | 10       | 35.334000 | 3.0173599        | 29.265803                       | 41.402197 |
| 40                        | 10       | 53.999000 | 3.0173599        | 47.930803                       | 60.067197 |
| 112                       | 10       | 64.001000 | 3.0173599        | 57.932803                       | 70.069197 |
| 316                       | 10       | 85.986000 | 3.0173599        | 79.917803                       | 92.054197 |
| <b>NEMATÓIDES (B)</b>     |          |           |                  |                                 |           |
| 1 - <i>S. glaseri</i>     | 30       | 42.217667 | 1.7420736        | 38.714191                       | 45.721142 |
| 2 - <i>S. carpocapsae</i> | 30       | 44.667000 | 1.7420736        | 41.163525                       | 48.170475 |
| <b>INTERAÇÕES AB</b>      |          |           |                  |                                 |           |
| 0 1                       | 5        | 1.334000  | 4.2671913        | -7.247727                       | 9.915727  |
| 0 2                       | 5        | 1.334000  | 4.2671913        | -7.247727                       | 9.915727  |
| 5 1                       | 5        | 14.666000 | 4.2671913        | 6.084273                        | 23.247727 |
| 5 2                       | 5        | 25.334000 | 4.2671913        | 16.752273                       | 33.915727 |
| 14 1                      | 5        | 25.334000 | 4.2671913        | 16.752273                       | 33.915727 |
| 14 2                      | 5        | 45.334000 | 4.2671913        | 36.752273                       | 53.915727 |
| 40 1                      | 5        | 53.332000 | 4.2671913        | 44.750273                       | 61.913727 |
| 40 2                      | 5        | 54.666000 | 4.2671913        | 46.084273                       | 63.247727 |
| 112 1                     | 5        | 72.000000 | 4.2671913        | 63.418273                       | 80.581727 |
| 112 2                     | 5        | 56.002000 | 4.2671913        | 47.420273                       | 64.583727 |
| 316 1                     | 5        | 86.640000 | 4.2671913        | 78.058273                       | 95.221727 |
| 316 2                     | 5        | 85.332000 | 4.2671913        | 76.750273                       | 93.913727 |

Apêndice 8 - Médias, desvio padrão e intervalo de confiança para os fatores doses e temperatura: Controle de *A. fraterculus* com *S. carpocapsae* em diferentes temperaturas

| Nível                 | Parcelas | Médias    | Desvio padrão | Intervalo de confiança (95%) |           |
|-----------------------|----------|-----------|---------------|------------------------------|-----------|
| Média geral           | 120      | 37.442833 | .5877438      | 36.275910                    | 38.609757 |
| <b>A: DOSAGENS</b>    |          |           |               |                              |           |
| 0                     | 20       | 2.334000  | 1.4396723     | -.524368                     | 5.192368  |
| 5                     | 20       | 17.000500 | 1.4396723     | 14.142132                    | 19.858868 |
| 14                    | 20       | 29.666500 | 1.4396723     | 26.808132                    | 32.524868 |
| 40                    | 20       | 45.000000 | 1.4396723     | 42.141632                    | 47.858368 |
| 112                   | 20       | 61.661000 | 1.4396723     | 58.802632                    | 64.519368 |
| 316                   | 20       | 68.995000 | 1.4396723     | 66.136632                    | 71.853368 |
| <b>B: TEMPERATURA</b> |          |           |               |                              |           |
| 15                    | 30       | 13.555667 | 1.1754875     | 11.221819                    | 15.889514 |
| 20                    | 30       | 35.555667 | 1.1754875     | 33.221819                    | 37.889514 |
| 25                    | 30       | 52.215333 | 1.1754875     | 49.881486                    | 54.549181 |
| 30                    | 30       | 48.444667 | 1.1754875     | 46.110819                    | 50.778514 |
| <b>INTERAÇÃO: AB</b>  |          |           |               |                              |           |
| 0 15                  | 5        | 1.334000  | 2.8793446     | -4.382736                    | 7.050736  |
| 0 20                  | 5        | 1.334000  | 2.8793446     | -4.382736                    | 7.050736  |
| 0 25                  | 5        | 2.668000  | 2.8793446     | -3.048736                    | 8.384736  |
| 0 30                  | 5        | 4.000000  | 2.8793446     | -1.716736                    | 9.716736  |
| 5 15                  | 5        | 6.668000  | 2.8793446     | .951264                      | 12.384736 |
| 5 20                  | 5        | 13.332000 | 2.8793446     | 7.615264                     | 19.048736 |
| 5 25                  | 5        | 26.668000 | 2.8793446     | 20.951264                    | 32.384736 |
| 5 30                  | 5        | 21.334000 | 2.8793446     | 15.617264                    | 27.050736 |
| 14 15                 | 5        | 11.998000 | 2.8793446     | 6.281264                     | 17.714736 |
| 14 20                 | 5        | 16.000000 | 2.8793446     | 10.283264                    | 21.716736 |
| 14 25                 | 5        | 41.334000 | 2.8793446     | 35.617264                    | 47.050736 |
| 14 30                 | 5        | 49.334000 | 2.8793446     | 43.617264                    | 55.050736 |
| 40 15                 | 5        | 18.666000 | 2.8793446     | 12.949264                    | 24.382736 |
| 40 20                 | 5        | 40.000000 | 2.8793446     | 34.283264                    | 45.716736 |
| 40 25                 | 5        | 60.000000 | 2.8793446     | 54.283264                    | 65.716736 |
| 40 30                 | 5        | 61.334000 | 2.8793446     | 55.617264                    | 67.050736 |
| 112 15                | 5        | 20.000000 | 2.8793446     | 14.283264                    | 25.716736 |
| 112 20                | 5        | 60.000000 | 2.8793446     | 54.283264                    | 65.716736 |
| 112 25                | 5        | 91.978000 | 2.8793446     | 86.261264                    | 97.694736 |
| 112 30                | 5        | 74.666000 | 2.8793446     | 68.949264                    | 80.382736 |
| 316 15                | 5        | 22.668000 | 2.8793446     | 16.951264                    | 28.384736 |
| 316 20                | 5        | 82.668000 | 2.8793446     | 76.951264                    | 88.384736 |
| 316 25                | 5        | 90.644000 | 2.8793446     | 84.927264                    | 96.360736 |
| 316 30                | 5        | 80.000000 | 2.8793446     | 74.283264                    | 85.716736 |