**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Produção em grande escala do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) em larvas hospedeiras de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) linhagem mutante *tsl*-Viena 8

Renata Morelli-de-Andrade

Tese apresentada para obtenção
do título de Doutora em Ciências.
Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2013**

Renata Morelli-de-Andrade
Engenheira Agrônoma

**Produção em grande escala do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata*
(Hymenoptera: Braconidae) em larvas hospedeiras de *Anastrepha fraterculus* e
Ceratitis capitata (Diptera: Tephritidae) linhagem mutante *tsl-Viena 8***

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ MAURÍCIO SIMÕES BENTO**

Tese apresentada para obtenção
do título de Doutora em Ciências.
Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Morelli-de-Andrade, Renata

Produção em grande escala do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) em larvas hospedeiras de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) linhagem mutante *tsl*-Viena 8 / Renata Morelli-de-Andrade.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.
94 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Produção de insetos 2. Controle biológico 3. Radioentomologia 4. Moscas-das-frutas I. Título

CDD 632.774
M842p

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que não me permitiram desistir

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Mamãe, Rosa Maria Morelli (*in memorian*), e à minha irmã, Glaucia Morelli, pelo amor, carinho e incentivo nessa e em todas as etapas de minha vida, as quais teriam sido vazias sem esse amor. Agradeço à minha irmã por estar comigo também nessa nova etapa de ter que reinventar a vida sem meu grande amor.

Ao meu marido, André, pelo amor, compreensão e apoio incondicionais.

Ao meu orientador de toda pós-graduação, José Maurício Bento, pelas oportunidades, compreensão, conselhos e pela infraestrutura disponibilizada.

Ao Dr. Julio Walder, pela parceria, incentivos e apoio.

Às amigas-orientadoras-companheiras de vida profissional- parceiras de trabalho Lia Costa e Beatriz Paranhos, por tudo o que fizeram por mim e por nós, tantas coisas que nem cabem aqui... Obrigada por tê-las ao meu lado.

Às amigas e amigos, Julia Lira, Luciane Tabs, Maria Fernanda Oris, Edson Di Piero, Renata Barbosa, Marina Piures, Rafael Garcia, Patricia Wyler, Luiz Ricardo Borba, por todo carinho, amizade e atenção.

Aos amigos(as) e companheiros(as) de pós-graduação e laboratório, Arodi Prado, Franciele Santos, André Signoreti, Maria Fernanda Peñaflor, Cristiane Nardi, Aline Kamiya, Luiza Zazycki, et al. (2007-2013), pela força, troca de informações, momentos divertidos e desabafos.

Às riquezas Patricia Sanches, Kenya Faggioni e Karen Costa pela contribuição científica e carinho.

Parece estranho, mas não posso deixar de agradecer à Keyla Soares Silva e ADAB (Agência de Defesa Agropecuária da Bahia), e ao Dr. Paulo Zarbin e sua equipe do Laboratório de Semioquímicos, pela parceria, infraestrutura, recursos e apoio técnico.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
Referências.....	16
2 PRODUÇÃO DO PARASITOIDE <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> EM LARVAS HOSPEDEIRAS DE <i>Ceratitis capitata</i> LINHAGEM <i>tsl</i> -Viena 8.....	19
Resumo.....	19
Abstract.....	19
2.1 Introdução.....	20
2.2 Desenvolvimento.....	22
2.2.1 Revisão bibliográfica.....	22
2.2.2 Material e Métodos.....	24
2.2.2.1 Criação de <i>D. longicaudata</i> em <i>C. capitata</i> <i>tsl</i> -Viena 8.....	24
2.2.2.2 Dose de radiação gama em larvas de <i>C. capitata</i> <i>tsl</i> -Viena 8 para não emergência dos adultos e respectivo efeito na emergência e razão sexual do parasitoide <i>D. longicaudata</i>	28
2.2.2.3 Avaliação de diferentes coletas de larvas de <i>C. capitata</i> <i>tsl</i> -Viena 8 na taxa de parasitismo, emergência e razão sexual do parasitoide <i>D. longicaudata</i>	28
2.2.2.4 Análise dos dados.....	29
2.2.3 Resultados.....	30
2.2.3.1 Dose de radiação gama em larvas de <i>C. capitata</i> <i>tsl</i> -Viena 8 para não emergência dos adultos e respectivo efeito na emergência e razão sexual do parasitoide <i>D. longicaudata</i>	30
2.2.3.2 Parâmetros de produção e qualidade de <i>D. longicaudata</i> criado em larvas de <i>C. capitata</i> <i>tsl</i> -Viena 8.....	31
2.2.3.3 Relação entre sexo do hospedeiro <i>C. capitata</i> <i>tsl</i> -Viena 8 e taxa de parasitismo, taxa de emergência e razão sexual do parasitoide <i>D. longicaudata</i>	34
2.2.3.4 Avaliação de diferentes coletas de larvas de <i>C. capitata</i> <i>tsl</i> -Viena 8 na taxa de parasitismo, emergência e razão sexual do parasitoide <i>D. longicaudata</i>	34
2.2.4 Discussão.....	35
2.3 Conclusões.....	39
Referências.....	39
3 CRIAÇÃO ARTIFICIAL DE <i>Anastrepha fraterculus</i> EM GRANDE ESCALA.....	45

Resumo.....	45
Abstract.....	45
3.1 Introdução.....	46
3.2 Desenvolvimento.....	47
3.2.1 Revisão bibliográfica.....	47
3.2.2 Material e Métodos.....	48
3.2.2.1 Domesticação de <i>A. fraterculus</i>	48
3.2.2.2 Criação artificial de <i>A. fraterculus</i>	49
3.2.2.3 Controle de Qualidade da criação.....	55
3.2.2.4 Redução do ágar na dieta de larvas.....	56
3.2.2.5 Substituição da fonte proteica na dieta de adultos.....	58
3.2.3 Resultados.....	59
3.2.3.1 Parâmetros de produção e qualidade de <i>A. fraterculus</i>	59
3.2.3.2 Redução do ágar na dieta de larvas.....	64
3.2.3.3 Substituição da fonte proteica na dieta de adultos.....	64
3.2.4 Discussão.....	66
3.3 Conclusões.....	69
Referências.....	69
4 PRODUÇÃO EM GRANDE ESCALA DO PARASITOIDE <i>Diachasmimorpha</i> <i>longicaudata</i> EM LARVAS HOSPEDEIRAS DE <i>Anastrepha fraterculus</i> EM COMPARAÇÃO COM <i>Ceratitis capitata</i>	75
Resumo.....	75
Abstract.....	75
4.1 Introdução.....	76
4.2 Desenvolvimento.....	77
4.2.1 Revisão bibliográfica.....	77
4.2.2 Material e métodos.....	79
4.2.2.1 Dose de radiação gama em larvas de <i>A. fraterculus</i> para não emergência dos adultos e respectivo efeito na emergência e razão sexual do parasitoide <i>D.</i> <i>longicaudata</i>	79
4.2.2.2 Criação do parasitoide <i>D. longicaudata</i> em larvas de <i>A. fraterculus</i>	79
4.2.2.3 Controle de qualidade rotineiro e periódico da criação.....	80
4.2.2.4 Análise dos dados.....	81
4.2.3 Resultados.....	82

4.2.3.1 Dose de radiação gama em larvas de <i>A. fraterculus</i> para não emergência dos adultos e respectivo efeito na emergência e razão sexual do parasitoide <i>D. longicaudata</i>	82
4.2.3.2 Parâmetros de produção e qualidade do parasitoide <i>D. longicaudata</i> criado em larvas de <i>A. fraterculus</i> em comparação à criação em <i>C. capitata</i> tsl-Viena 8...	83
4.2.4 Discussão.....	86
4.2.5 Conclusões.....	87
Referências.....	88
ANEXO.....	93

RESUMO

Produção em grande escala do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) em larvas hospedeiras de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) linhagem mutante *tsl*-Viena 8

No mundo todo, o manejo integrado de moscas-das-frutas é feito com associação do controle biológico aplicado e técnica do inseto estéril. Além da boa eficiência no campo, a associação dessas técnicas é também favorecida pelo fato de ambos os organismos, insetos estéreis e parasitoides, poderem ser produzidos massalmente na mesma fábrica com menor custo. Visando à produção massal do parasitoide de moscas-das-frutas *Diachasmimorpha longicaudata* e de insetos estéreis para atender a programas de manejo integrado de *Ceratitis capitata* e *Anastrepha fraterculus*, o presente trabalho foi desenvolvido no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo, entre os anos de 2006 a 2012. Durante esse período, metodologias de criação em laboratório foram implementadas e permitiram o desenvolvimento da tecnologia necessária para a produção desses insetos em grande escala no Brasil. Dados de 25 gerações do parasitoide produzido em grande escala em *C. capitata* *tsl*-Viena 8 e 51 gerações em *A. fraterculus*, bem como os efeitos e diferenças desses hospedeiros na qualidade do parasitoide foram analisados. É possível criar o parasitoide *D. longicaudata* em ambos os hospedeiros, *C. capitata* linhagem *tsl*-Viena 8 e *A. fraterculus*, entretanto essa linhagem de *C. capitata* não é indicada para produção massal do parasitoide, pois a emergência é muito baixa devido à debilidade do hospedeiro, possivelmente acarretada pelas manipulações genéticas que permitem a sexagem da mosca na fase embrionária. Caso essa seja a linhagem com melhor custo/ benefício disponível, recomenda-se o uso de larvas hospedeiras oriundas de ovos tratados termicamente para a produção do parasitoide. A criação em grande escala de *A. fraterculus* foi estabelecida com sucesso após o período de domesticação da espécie, obtendo-se larvas de boa qualidade com baixo custo, devido à dieta larval com baixa concentração de ágar e total uso de ingredientes nacionais nas dietas de adultos e larvas, por mais de 50 gerações. O uso de larvas irradiadas de *A. fraterculus* para a produção de *D. longicaudata* promove maior emergência do parasitoide, com maior quantidade e melhor qualidade de fêmeas que larvas de *C. capitata*.

Palavras-chave: Produção de insetos; Controle biológico; Radiação gama; Moscas-das-frutas

ABSTRACT

Large-scale production of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) using *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) tsl-Vienna 8 strain as hosts

The integrated management of fruit flies is worldwide done with the association of augmentative biological control with parasitoids and the sterile insect technique. Beyond the efficiency in the field, the joint of both techniques is also favored by the easy production of organisms, both parasitoids and sterile insects, in the same facility with low costs. Aiming for the mass production of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* and sterile insects to support integrated management programs for *Ceratitis capitata* and *Anastrepha fraterculus*, this work was developed at the Center of Nuclear Energy in Agriculture (CENA) of the University of São Paulo, between 2006 and 2012. Along this period, laboratory rearing methods were improved which allowed the development of the required technology for a large scale production of those insects in Brazil. Data of 25 generations of the parasitoid large scale production using *C. capitata* tsl-Vienna 8 strain and 51 generations using *A. fraterculus* as hosts are presented. Moreover, the effect and differences between hosts in parasitoid's quality were analyzed. The parasitoid *D. longicaudata* can be large scale produced using both *C. capitata* tsl-Vienna 8 or *A. fraterculus* as hosts, but this strain of *C. capitata* is not recommended for *D. longicaudata* mass production once the parasitoid emergency is very low due to the host weakness. If this strain is the best cost/benefit available, the use of host larvae originating from heat treated eggs might be considered to parasitoids production. The *A. fraterculus* large scale rearing was established successfully after the domestication period of the specie, producing a large amount of insects with excellent quality using local ingredients and little agar in the diet composition over 50 generations. *A. fraterculus* irradiated larvae as host for large scale producing *D. longicaudata* promotes greater parasitoid emergence with greater female biased sex ratio and better female quality than *C. capitata* larvae.

Keywords: Insect production; Biological control; Gamma radiation; Fruit flies

1 INTRODUÇÃO

As moscas-das-frutas são consideradas o maior problema mundial da fruticultura e o principal fator que impede o livre comércio de frutas, causando prejuízos que podem ultrapassar U\$ 2 bilhões (ZUCCHI et al., 2004). No Brasil, esse valor situa-se entre U\$120 e 200 milhões anuais, oriundos das perdas diretas, custo de controle e perdas de mercados de exportação (ZUCCHI et al., 2004). Na citricultura brasileira, as reduções na produção podem chegar a 30-50% (ZUCCHI et al., 2004).

No mundo, o controle biológico de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritide) baseia-se em liberações inundativas de parasitoides, produzidos em grande escala e liberados rotineiramente para prontamente agirem sobre a praga-alvo. Na prática, o Controle Biológico Aplicado (CBA) de moscas-das-frutas compõe uma das estratégias do Manejo Integrado de Pragas (MIP), e visa à produção de frutas de alta qualidade que atendam às exigências fitossanitárias e de segurança alimentar do comércio internacional.

Diachasmimorpha longicaudata (Ashmed) (Hymenoptera: Braconidae) é uma das mais importantes espécies utilizadas no controle biológico de moscas-das-frutas no mundo. Parasita larvas de segundo e terceiro ínstar de moscas-das-frutas da família Tephritidae e é originário do sudeste asiático (WHITE; ELSON-HARRIS, 1992; VAN NIEUWENHOVE; OVRUSKI, 2011). É liberado inundativamente em vários países para o controle biológico de moscas-das-frutas, especialmente do gênero *Anastrepha* spp (SIVINSKI et al., 1996).

Em um programa de MIP, todos os métodos de controle devem ser utilizados racionalmente, e uma proposta bastante interessante para moscas-das-frutas é o uso de inimigos naturais associado à Técnica do Inseto Estéril (TIE). Essa associação reduz os custos de produção desses organismos, uma vez que moscas e parasitoides podem ser produzidos massalmente na mesma biofábrica, utilizando as larvas das moscas como hospedeiros para a criação do parasitoide. A TIE é o principal componente de muitos programas de manejo integrado de moscas-das-frutas, e consiste na liberação sistemática de grande número de insetos estéreis nas áreas agrícolas, onde os machos estéreis copulam com as fêmeas selvagens evitando a reprodução da espécie no local.

Inicialmente, insetos selvagens eram coletados no campo e colonizados para sua produção massal e utilização na TIE. Entretanto, com o avanço de técnicas de

engenharia genética e biologia molecular, foram desenvolvidas linhagens de sexagem genética (*Genetic Sexing System* - GSS) para algumas espécies, que permitem a separação de machos e fêmeas antes da fase adulta (RÖSSLER, 1979; ROBINSON; van HEEMERT, 1982; KERREMANS; FRANZ, 1994).

No Brasil, as espécies de moscas-das-frutas de maior importância econômica são *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) e *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (MALAVASI; MORGANTE, 1980; ZUCCHI, 2000). A primeira, conhecida por mosca-sul-americana é nativa nas regiões sul e sudeste do Brasil, e ocorre do sul do Texas, Estados Unidos, ao norte da Argentina (ALUJA, 1999; MALAVASI; ZUCCHI; SUGAYAMA, 2000). A segunda, *C. capitata* conhecida como mosca-do-mediterrâneo, é nativa da região mediterrânea cujo primeiro relato no Brasil consta do início do século XX (IHERING, 1901).

Visando à produção massal dessas espécies de moscas-das-frutas e de seu parasitoide *D. longicaudata* para atender a programas de manejo integrado de moscas-das-frutas em áreas amplas, o presente trabalho foi desenvolvido no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo, entre os anos de 2006 a 2012. Durante esse período, metodologias de criação em laboratório foram implementadas e permitiram o desenvolvimento da tecnologia necessária para a produção desses insetos em grande escala no Brasil.

Os resultados estão organizados, cronologicamente, conforme a tecnologia foi sendo desenvolvida para as criações em grande escala. Primeiramente, é apresentada a produção do parasitoide *D. longicaudata* utilizando a linhagem GSS de *C. capitata*, *tsl*-Viena 8, como hospedeiro. Depois, a metodologia de criação de *A. fraterculus* para produção de insetos estéreis. E por fim, a metodologia de criação do parasitoide em *A. fraterculus* comparando-se os parâmetros de produção e qualidade com a produção em *C. capitata* *tsl*-Viena 8.

Referências

ALUJA, M. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) research in Latin America: myths, realities and dreams. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 28, p. 565-594, 1999.

IHERING, H.V. Laranjas bichadas. **Revista Agrícola**, São Paulo, v. 70, p. 179-181, 1901.

KERREMANS, P.H.; FRANZ, G. Cytogenetic analysis of chromosome 5 from Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. **Chromosoma**, Heidelberg, v. 103, p. 142–146, 1994.

MALAVASI, A.; MORGANTE, J.S. Biologia de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) II. Índice de infestação em diferentes hospedeiros e localidades. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, p.17-24, 1980.

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

ROBINSON, A.S.; VAN HEEMERT, C. *Ceratitidis capitata*: a suitable case for genetic sexing. **Genetica**, Dordrecht, v. 58, p. 229–237, 1982.

RÖSSLER, Y. The genetics of the Mediterranean fruit fly: a ‘white-pupa’ mutant. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 72, p. 583–590, 1979.

SIVINSKI, J.; CALKINS, C.O.; BARANOWSKI, R.; HARRIS, D.; BRAMBILA, J.; DIAZ, J.; BURNS, R.E.; HOLLER, T.; DODSON, G. Suppression of a Caribbean fruit by (*Anastrepha suspensa* (Loew), Diptera: Tephritidae) population through augmented releases of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, San Diego, v. 6, p. 177-185, 1996.

VAN NIEUWENHOVE, G.; OVRUSKI, S.M. Influence of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) larval instars on the production of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) progeny and their sex ratio. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 94, n. 4, p. 863-868, 2011.

WHITE, I.M.; ELSON-HARRIS, M.M. **Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics**. Wallingford: CAB International, 1992. 624 p.

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

ZUCCHI, R.A.; MALAVASI, A.; NASCIMENTO, A.S.; WALDER, J.M.M. Prejuízos das moscas-das-frutas na exportação de citros. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n.2, p. 72-77, 2004.

2 PRODUÇÃO DO PARASITOIDE *Diachasmimorpha longicaudata* EM LARVAS HOSPEDEIRAS DE *Ceratitis capitata* LINHAGEM MUTANTE *tsl*-Viena 8

Resumo

No mundo todo, o manejo integrado de moscas-das-frutas é feito com associação do controle biológico aplicado e técnica do inseto estéril. Além da boa eficiência no campo, a associação dessas técnicas é também favorecida pelo fato de ambos os organismos, insetos estéreis e parasitoides, poderem ser produzidos massalmente na mesma fábrica com menor custo. O presente trabalho foi desenvolvido para avaliar a produção e qualidade do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* em larvas da linhagem mutante para sexagem genética de *Ceratitis capitata* *tsl*-Viena 8. Dados de produção e qualidade de 25 gerações do parasitoides são apresentados, e mostram alta taxa de parasitismo e baixa emergência, ou seja, as larvas são parasitadas, mas o parasitoide não completa seu desenvolvimento em número satisfatório, possivelmente devido à própria debilidade do hospedeiro e/ou superparasitismo. A irradiação das larvas com 60 Gy de radiação gama antes do parasitismo favorece a emergência do parasitoide. Os dados mostram relação do sexo do hospedeiro (cor do pupário) com o parasitismo e emergência do parasitoide, sendo ambos maiores em machos (pupas marrons). O tratamento térmico dos ovos da linhagem *tsl*-Viena 8 (34°C/ 24 horas em banho-maria) antes da semeadura em dieta artificial favorece a produção de hospedeiros de melhor qualidade para o parasitoide, cuja produção consequentemente também melhora em qualidade e quantidade. É possível produzir o parasitoide *D. longicaudata* na linhagem mutante *tsl*-Viena 8 de *C. capitata* em grande escala, entretanto a emergência é baixa.

Palavras-chave: Produção de insetos; Irradiação; Controle biológico; Braconidae; Moscas-das-frutas

Abstract

The integrated management of fruit flies is worldwide done with the association of augmentative biological control with parasitoids and the sterile insect technique. Beyond the efficiency in the field, the joint of both techniques is also favored by the easy production of organisms, both parasitoids and sterile insects, in the same facility with low costs. The present work consisted in evaluating the production and quality parameters of the parasitoid *D. longicaudata* reared on *C. capitata* *tsl*-Vienna 8 larvae. Data of 25 consecutive generations of the parasitoid are presented and show high parasitism but low emergence rates, that is, the larvae are parasitized but the parasitoid don't complete its development in satisfactory number, possibly due to host weakness itself and/or superparasitism. Larvae irradiation with 60 Gy of gamma radiation before exposure to parasitism increases the emergency rate. The data also show a relationship between host sex (puparium's color) and parasitism and emergency rates, being both higher in males (brown pupae). The thermic treatment of the eggs (34°C/ 24 hours) of the *tsl*-Vienna 8 strain before inoculating in artificial diet favored production of higher quality hosts for the parasitoid, which in turn improved parasitoids production both in quality and quantity. It's possible to produce the parasitoid *D. longicaudata* on the host *C. capitata* *tsl*-Vienna 8 strain, in large scale, however the emergence rate is low.

Keywords: Insect production; Irradiation; Biological control; Braconidae; Fruit flies

2.1 Introdução

O controle biológico de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) baseia-se em liberações inundativas de parasitoides, produzidos em grande escala e liberados rotineiramente para agirem sobre a praga-alvo. Na prática, o Controle Biológico Aplicado (CBA) de moscas-das-frutas compõe uma das estratégias dos programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), e visa à produção de frutas de alta qualidade que atendam às exigências fitossanitárias e de segurança alimentar do comércio internacional.

Diachasmimorpha longicaudata (Ashmed) (Hymenoptera: Braconidae) é uma das mais importantes espécies utilizadas no controle biológico de moscas-das-frutas. Parasita larvas de terceiro ínstar da família Tephritidae e é originário do Sudeste Asiático (Indonésia, Filipinas e Malásia), onde ataca larvas de *Bactrocera* spp. (WHITE; ELSON-HARRIS, 1992). Nas Américas, esse parasitoide tornou-se importante inimigo natural do gênero *Anastrepha* (CANCINO et al., 2009a) sendo liberado massalmente em vários países para o controle biológico de moscas-das-frutas (SIVINSKI et al., 1996).

Vários programas de MIP de moscas-das-frutas no mundo fazem uso da liberação de inimigos naturais associado a 'Técnica do Inseto Estéril' (TIE) (MESSING et al., 1993). Dentre as vantagens inclui-se a redução de custos de produção desses organismos, uma vez que a biofábrica pode ser explorada para produzir massalmente as moscas estéreis e os parasitoides, utilizando as moscas como hospedeiros para a criação do parasitoide.

A TIE é a principal componente de muitos programas de manejo integrado de moscas-das-frutas (KLASSEN; CURTIS, 2005), e consiste na liberação sistemática de grande número de insetos estéreis nas áreas agrícolas, onde os machos estéreis copulam com as fêmeas selvagens evitando sua reprodução (KNIPLING, 1955). Inicialmente insetos selvagens eram coletados no campo e colonizados para sua produção massal e utilização na TIE. Entretanto, com o avanço de técnicas de engenharia genética e biologia molecular, novas estratégias foram desenvolvidas permitindo manipular certas características biológicas dos insetos para gerar

linhagens mais eficientes para a TIE. Neste contexto, a Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) desenvolveu as linhagens de mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitis capitata*, que permitem a separação de machos e fêmeas antes da fase adulta. São conhecidas como linhagens de sexagem genética, GSS (*Genetic Sexing System*) e baseiam-se em uma translocação recíproca entre o cromossomo sexual que determina o sexo masculino e o cromossomo somático que transporta o marcador ou a mutação utilizada para construir o sistema de sexagem (RÖSSLER, 1979; ROBINSON; van HEEMERT, 1982; KERREMANS; FRANZ, 1994).

A linhagem de sexagem genética para *C. capitata* possui duas mutações: a sensibilidade letal de fêmeas à temperatura, *tsl* (*temperature sensitive lethal*) (FRANZ; GENCHEVA; KERREMANS, 1994), e a cor branca do pupário de fêmeas, *wp* (*white pupae*) (RÖSSLER, 1979). Essa linhagem, a *tsl*-Viena-8, é utilizada em programas de manejo integrado de moscas-das-frutas em diferentes países que usam a TIE como principal estratégia para o controle de *C. capitata* (FISHER, 2000), e permite eliminar as fêmeas da criação ainda na fase de embrião por meio de tratamento térmico, de forma a produzir e liberar somente machos estéreis no campo, reduzindo custos de produção e liberação dos insetos estéreis.

Esta linhagem é utilizada em vários programas de manejo integrado de moscas-das-frutas com uso da TIE, inclusive no Brasil. Visando a associação da produção de insetos estéreis e parasitoides, torna-se necessário conhecer os parâmetros de qualidade do parasitoide *D. longicaudata* produzido neste hospedeiro, pois se trata de uma linhagem mutante e as implicações dessas mutações no parasitoide são desconhecidas.

Com a finalidade de implementar a produção do parasitoide *D. longicaudata* em larvas hospedeiras de *C. capitata* linhagem *tsl*-Viena 8, o presente trabalho teve como objetivos: i) analisar os dados de controle de qualidade da criação; ii) determinar a melhor dose de irradiação das larvas hospedeiras, a ser aplicada previamente ao parasitismo, para não emergência de adultos de moscas-das-frutas; e iii) comparar a taxa de parasitismo, emergência e a razão sexual do parasitoide *D. longicaudata* em larvas hospedeiras de diferentes coletas e de ovos tratados termicamente da linhagem *tsl*-Viena 8 com larvas da linhagem bissexual (não-mutante) de *C. capitata*.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Revisão Bibliográfica

O parasitoide *D. longicaudata* é um endoparasitoide de larvas de segundo e terceiro ínstar de várias espécies de Tephritidae (WHITE; ELSON-HARRIS, 1992; VAN NIEUWENHOVE; OVRUSKI, 2011). Parasita larvas em diferentes frutos hospedeiros e se desenvolve no interior do pupário da mosca (SIVINSKI; PIÑERO; ALUJA, 2000). A razão sexual da progênie é resultado de partenogênese arrenótoca e reprodução sexuada, sendo que ovos não-fecundados originam somente machos e os fecundados machos e fêmeas (GODFRAY, 1994).

Originário do Sudeste Asiático foi introduzido nos Estados Unidos primeiramente no Havaí (BESS; van der BOSCH; HARAMOTO, 1961), e, posteriormente, Florida e muitos outros países da América Latina para controle de *Anastrepha* spp., e *C. capitata*, entre os quais o Brasil, em 1994 (CARVALHO; NASCIMENTO; MATRANGOLO, 2000).

Técnicas de criação que resultem em baixo custo de produção e em parasitoides de alta qualidade são sempre importantes e devem ser estimuladas (SIVINSKI et al., 1996). A irradiação das larvas antes da exposição ao parasitismo pode simplificar o processo de criação e permitir transporte e liberação com segurança, pois não ocorre liberação de moscas (SIVINSKI; SMITTLE, 1990; HENDRICHES et al., 2009).

Outra técnica que reduziu o custo de programas de manejo integrado de moscas-das-frutas foi o desenvolvimento das linhagens mutantes GSS para produção de machos estéreis de *C. capitata*. O mapeamento genético determinou que a mutação *tsl* (*temperature sensitive lethal*) está localizada muito próxima da mutação *wp* (*white pupae*,) usada como marcador durante o processo de criação. Os machos carregam uma translocação entre o cromossomo Y e o autossomo de número 5 e são heterozigotos para estes marcadores, ao passo que as fêmeas são homozigotas para estas mutações. A separação dos sexos é realizada mediante a exposição dos ovos desta linhagem a uma temperatura de 34°C por 24h (CÁCERES; FISHER; RENDON, 2000; FISHER; CÁCERES, 2000). A princípio, foram selecionadas linhagens de sexagem genética com o ponto de quebra localizado perto das mutações usadas como marcador (*wp* e *tsl*), com o objetivo de manter uma porcentagem baixa de recombinação entre o ponto de quebra e a região

cromossômica que contém a mutação, o que confere um relativo grau de estabilidade quando as linhagens são criadas experimentalmente em larga escala (FRANZ; GENCHEVA; KERREMANS, 1994).

Em criações de laboratório, este tipo de linhagem é geneticamente estável e o mecanismo de sexagem preserva suas características (RÖSSLER, 1982a, 1982b). Mas quando a população dos insetos é ampliada em escala massal, onde milhões de insetos são produzidos, modificações no processo de criação devem ser adotadas para mitigar indivíduos recombinantes de forma a preservar as características da linhagem (RÖSSLER, 1985; FRANZ; GENCHEVA; KERREMANS, 1994; KERREMANS; FRANZ, 1995).

Para prevenir o acúmulo de genótipos não desejados que poderiam ocasionar a destruição do sistema de sexagem genética, foi proposto a utilização do sistema de filtro genético (*FRS*, *filter rearing system*) (FISHER, 1998, 2000; CÁCERES; FISHER; RENDON, 2000). Em princípio, o filtro genético se baseia na detecção e eliminação de indivíduos recombinantes em uma pequena colônia isolada da GSS.

Eventos de recombinação são percebidos nas fêmeas por meio de formação de pupário marrons e resistência à temperatura. Nos machos, a recombinação é percebida por machos emergindo de pupário brancos e/ou com sensibilidade à temperatura. Os indivíduos com recombinação na cor do pupário são fáceis de remover no sistema de filtragem se a emergência dos adultos for observada individualmente, inseto por inseto, de maneira que machos emergentes de pupas brancas e fêmeas emergentes de pupas marrons sejam descartados antes que uma nova geração seja estabelecida. Indivíduos recombinantes no gene de sensibilidade à temperatura não são eliminados no sistema de filtro. No entanto, este problema tem solução, pois as fêmeas *ts/* homozigotas também possuem a característica de manifestar desenvolvimento larval lento (FISHER; CÁCERES, 2000; CÁCERES, 2002). Isto significa, também, que machos recombinantes homozigotos para *ts/* desenvolvem-se mais lentamente que os insetos parentais, podendo ser eliminados no *FRS* de cada geração usando unicamente machos que emergem da primeira coleta. De maneira similar, as fêmeas recombinantes que são homozigotas para o gene *ts/* poderão ser excluídas se somente fêmeas que emergirem de pupário de cor branca provenientes das últimas coletas forem escolhidas. Desta maneira, a possibilidade de que recombinantes machos (homozigotos para *ts/*) ou fêmeas (heterozigotas para *ts/*) sejam incluídas no *FRS* é pouco provável.

A proporção de machos e fêmeas varia entre as coletas larvais. As fêmeas *tsl*/homozigotas duram de 2 a 4 dias a mais para completar seu desenvolvimento que os machos heterozigotos; as larvas coletadas durante os primeiros dois dias de coleta são, em sua maioria, machos. A coleta significativa de fêmeas inicia-se a partir do terceiro dia. A proporção de fêmeas aumenta progressivamente durante os dois dias seguintes de coleta larval (CÁCERES, 2002). Assim, das pupas de primeira coleta aproximadamente 100% são de cor marrom (machos), da segunda coleta 75% são marrons e 25% brancas (fêmeas), da terceira coleta 50% marrons e 50% brancas, da quarta coleta 75% brancas e 25% marrons e da quinta coleta aproximadamente 100% são brancas.

2.2.2 Material e métodos

O estabelecimento das criações de insetos, bem como o experimento, foi realizado em salas climatizadas ($26 \pm 2^{\circ}\text{C}$; 70-80% de UR e fotofase de 14 horas com aproximadamente 12000 lux) no Laboratório de Radioentomologia e Irradiação de Alimentos do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP) em Piracicaba-SP.

2.2.2.1 Criação de *D. longicaudata* em *C. capitata* *tsl*-Viena 8

A criação de *D. longicaudata* teve início em 2003, com parasitoides oriundos da criação da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura. Por três anos, foram multiplicados utilizando *C. capitata* linhagem bissexual como hospedeiro (WALDER, 2002). Em dezembro de 2004, a Embrapa Semi Árido importou do laboratório de Entomologia da IAEA em Seibersdorf, Áustria, ovos e pupas de uma linhagem GSS de *C. capitata*, a *tsl*-Viena 8 para implantar a TIE no Brasil. Essa linhagem foi multiplicada no Laboratório de Radioentomologia do CENA. Em abril de 2006 a criação do parasitoide passou a ser exclusivamente em larvas de *C. capitata* linhagem *tsl*-Viena 8, seguindo a metodologia de Walder (2002) para a criação do hospedeiro, pois a criação em *C. capitata* bissexual teve que ser eliminada para não contaminar a linhagem GSS.

Os adultos do parasitoide foram mantidos em gaiolas (50 x 50 x 30 cm) com arestas de alumínio, duas laterais e o fundo fixos de acrílico, duas laterais e o topo removíveis de tela, com livre acesso a uma “massa” feita de lenço de papel picado e mel para alimentação. As gaiolas foram dispostas em estantes de alumínio com

rodas, de forma a ficarem 3 gaiolas sobrepostas com espaço suficiente entre elas para colocar as unidades de parasitismo e para a entrada de luz, e mantidas em sala climatizada ($26 \pm 2^\circ\text{C}$; 70-80% de UR e fotofase de 14 horas com aproximadamente 12000 lux) (Figura 2.1).

Figura 2.1- Gaiolas para criação de adultos de *Diachasmimorpha longicaudata* em larga escala

O parasitismo teve início no quinto dia de idade dos adultos, sendo feito diariamente até o 12º dia. Para isso, larvas nuas (sem dieta) de *C. capitata* tsl-Viena 8, no fim do terceiro ínstar¹, foram expostas ao parasitoide em unidades de parasitismo (UPs), as quais consistiram em anéis de tubo de PVC de 10 cm de diâmetro com 1 cm de altura. O fundo da UP era de tecido voal colado no anel, e a tampa removível foi feita de PVC (Figura 2.2a). As larvas foram acondicionadas (Figura 2.2 b), as unidades tampadas (Figura 2.2 c) e colocadas externamente na parte superior das gaiolas de adultos do parasitoide (Figura 2.2 d), onde ficaram por 40 minutos à disposição das fêmeas para o parasitismo (Figura 2.2 e). Cada UP acomodou de 20 a 25 ml de larvas, cerca de 1400-1600 indivíduos.

A partir da geração 14, adotou-se a etapa de irradiação das larvas hospedeiras antes do parasitismo na criação do parasitoide, as quais receberam

¹ Larvas de *C. capitata* no fim do terceiro ínstar saem da dieta, à procura de local para formação do pupário, e caem em bandejas com água posicionadas embaixo, de onde são recolhidas em criações artificiais.

dose de 60 Gy (fonte Co^{60} , Gammabeam 650; 184,55-143,44 Gy/hora). Nesses casos, foi montada uma UP com larvas não-irradiadas para o controle de qualidade (Figura 2.3).

Figura 2.2 – Etapas de preparo das larvas e exposição ao parasitismo. a) Unidade de parasitismo (UP); b) acondicionamento das larvas na UP; c) UP com larvas; d) exposição das UPs às fêmeas de *Diachasmimorpha longicaudata*; e) fêmeas parasitando as larvas contidas nas UPs

Figura 2.3 - Unidades de parasitismo (UPs), em exposição aos parasitóides, contendo larvas irradiadas para a produção e não-irradiadas (seta vermelha) para controle de qualidade do parasitismo

As UPs foram retiradas do topo das gaiolas, cuidadosamente para não danificar o ovipositor das fêmeas. Posteriormente, as larvas foram removidas das unidades de parasitismo e colocadas em bandejas contendo vermiculita esterilizada (em estufa, 200°C/ 4 horas) para a formação dos pupários, os quais foram peneirados após sete dias tendo o respectivo volume mensurado.

Os pupários foram acondicionados em novas gaiolas para emergência dos adultos e início da geração seguinte do parasitoide. Cada gaiola descrita comportou de 6500 a 9750 adultos, de 400 a 600 ml de pupários parasitados, e foi mantida em produção por 10 dias (do 5º ao 15º) ou menos, conforme necessário. Diariamente, colocou-se 25 unidades de parasitismo em cada gaiola, na proporção de 10 larvas/fêmea.

De cada lote de parasitismo, foram retiradas amostras de 100 pupários para controle de qualidade, avaliando-se os seguintes parâmetros:

- Taxa de parasitismo: determinada pela amostra de larvas não-irradiadas parasitadas, consistindo na razão entre nº de parasitoides emergidos/ (nº de parasitoides + nº de moscas).
- Emergência do parasitoide: razão entre nº de parasitoides/ nº total de pupários.
- Razão sexual: nº de fêmeas/ nº machos + nº fêmeas

Os parâmetros acima descritos foram avaliados rotineiramente, em todos os lotes de parasitismo. Periodicamente, outros parâmetros foram avaliados:

- Habilidade de voo: 100 pupários parasitados (com 24 h antes da emergência) foram colocadas dentro de um anel de papel de aproximadamente 5 cm de diâmetro e 0,5 cm de altura, centrado em uma placa de Petri, no interior de um tubo preto (12 x 12 cm). A parte interna do tubo foi revestida com uma fina camada de talco neutro, para evitar a saída dos insetos por meio do caminhar, com distância de aproximadamente 1 cm acima da parte inferior do tubo, para fornecer locais de repouso para moscas recém-emergidas. Os tubos foram dispostos sobre uma mesa, dentro de uma sala fechada. Após a emergência, os parasitoides foram estimulados a voar mantendo-se as luzes acesas. A cada 4 horas os insetos emergidos foram aspirados da sala com aspirador de pó doméstico, para evitar que retornassem ou caíssem dentro dos tubos. Depois de três dias foi contabilizado o conteúdo dos tubos, isto é, parasitoides que não apresentaram habilidade para voar, semi-emergidos, deformados e pupas não-emergidas (FAO/IAEA/USDA, 2003). A

habilidade de voo foi expressa como taxa de voadores, calculada pela seguinte fórmula: $[\text{n}^\circ \text{ de pupários} - (\text{pupas não-emergidas} + \text{semi-emergidas} + \text{não-voadores})] / \text{n}^\circ \text{ de pupários}$.

- Longevidade sob estresse: confinou-se 10 machos e 10 fêmeas, separadamente, em potes plásticos transparentes de 500 ml, sem alimento e água. Após a emergência dos adultos, iniciou-se a contagem diária da mortalidade.
- Tamanho e peso: o tamanho dos parasitoides, da cabeça à extremidade do abdome, e do ovipositor das fêmeas, foram medidos em estereomicroscópio com ocular micrométrica. O peso foi determinado utilizando balança semi-analítica.

2.2.2.2 Dose de radiação gama em larvas de *C. capitata* tsl-Viena 8 para não emergência dos adultos e respectivo efeito na emergência e razão sexual do parasitoide *D. longicaudata*

A criação de *C. capitata* tsl-Viena 8 seguiu a metodologia de Walder (2002). Para determinar a melhor dose para irradiação das larvas hospedeiras que resultasse na não-emergência dos adultos, 10 ml de larvas de *C. capitata* tsl-Viena 8, no fim do terceiro ínstar, foram irradiados nas seguintes doses: 0; 20; 30; 40; 50; 60 e 70 Gy, conforme descrito no item 2.2.2.1, e acondicionados em copos plásticos (500 ml) com tampas perfuradas, contendo vermiculita úmida (solução aquosa de benzoato de sódio a 0,03 %) para a formação dos pupários, onde permaneceram por 5 dias. De cada copo retirou-se uma amostra aleatória de 200 pupários e, após a emergência, foi contabilizado o número de insetos emergidos. O experimento foi repetido 5 vezes.

O efeito da melhor dose foi avaliado em 11 gerações do parasitoide, da 14^a a 25^a geração. Para tal, larvas irradiadas e não-irradiadas foram expostas aos parasitoides da maneira descrita anteriormente no item 2.2.2.1. De cada lote de parasitismo, retirou-se uma amostra de 100 pupas.

2.2.2.3 Avaliação de diferentes coletas de larvas de *C. capitata* tsl-Viena 8 na taxa de parasitismo, emergência e razão sexual do parasitoide *D. longicaudata*

Duzentos casais do parasitoide foram acondicionados em gaiolas teladas de 50 x 50 x 30 cm, e o parasitismo foi realizado no oitavo dia de idade. Cada gaiola recebeu 6 UPs com 5,5 ml de larvas nuas de *C. capitata* no fim do terceiro ínstar em

cada, sendo 3 com larvas irradiadas, conforme descrito no item 2.2.2.1, e 3 com não irradiadas. Foram oferecidas, separadamente em cada gaiola, sete diferentes tipos de larvas: de primeira a quinta coletas (cinco dias consecutivos de coletas) ou da primeira coleta de larvas oriundas de ovos tratados termicamente (34°C/ 24 horas em banho-maria) da linhagem *tsl*-Viena 8 e também larvas do primeiro dia de coleta da linhagem bissexual, as quais ficaram expostas ao parasitismo por 40 minutos na proporção de 10 larvas/ fêmea. As larvas parasitadas foram colocadas em copos plásticos (500 ml) com vermiculita e tampa perfurada. Dois dias depois, os pupários foram peneirados, separados por cor (marrom ou branca) e mantidos em copos com vermiculita até emergência dos parasitoides. As larvas da linhagem *tsl*-Viena 8 utilizadas nesse experimento foram provenientes da criação do filtro (*FRS*).

Foram montadas 28 gaiolas ao total, quatro para cada coleta larval da linhagem *tsl*-Viena 8, quatro para larvas de ovos tratados termicamente e quatro para a linhagem bissexual.

A taxa de parasitismo foi calculada conforme item 2.2.2.1. A emergência do parasitoide foi calculada da seguinte forma: (total de parasitoides emergidos de larvas não-irradiadas + total de parasitoides emergidos de larvas irradiadas)/ total de pupários irradiados e não irradiados.

2.2.2.4 Análise dos dados

A escolha da melhor dose para não-emergência de moscas foi determinada analisando o número de moscas emergidas dos tratamentos por modelos lineares generalizados de regressão logística e ajuste para *over-dispersion* (CRAWLEY, 2007).

Para avaliar o efeito da radiação das larvas antes do parasitismo na emergência e razão sexual do parasitoide, os dados do controle de qualidade da criação da 14^a a 25^a geração foram submetidos à regressão logística utilizando modelos lineares generalizados (GLM) ajustados para *over-dispersion* (CRAWLEY, 2007).

Os parâmetros de produção e qualidade do parasitoide (quantidade de pupas parasitadas e parasitoides produzidos, duração do ciclo ovo-adulto, taxa de parasitismo, taxa de emergência e razão sexual) são oriundos de 25 gerações, e determinados conforme o item 2.2.2.1. A taxa de voadores e a longevidade sob estresse foram obtidos de 20 amostras de diferentes lotes da 25^a geração. O

tamanho e peso dos parasitoides foi determinado de 20 indivíduos dessa mesma geração. A longevidade sob estresse foi avaliada pelo estimador de Kaplan-Meier, sendo as curvas comparadas aos pares pelo teste de log-rank.

A relação entre sexo do hospedeiro (cor do pupário) e taxa de parasitismo, emergência e razão sexual do parasitóide foi avaliada com dados do controle de qualidade da criação em grande escala. Os valores foram analisados por meio de GLM de regressão logística, sendo que para as variáveis emergência e razão sexual do parasitoide houve ajuste do modelo para *over-dispersion* (CRAWLEY, 2007).

Para avaliar a taxa de parasitismo, taxa de emergência e razão sexual do parasitoide criado em larvas de diferentes coletas de *C. capitata* *tsl*-Viena 8, os valores obtidos em cada tratamento foram submetidos à GLM de regressão logística e ajuste para *over-dispersion* (CRAWLEY, 2007). As médias foram comparadas aos pares por teste t não paramétrico com ajuste do nível de significância pelo método de Bonferroni.

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o programa estatístico R, versão 2.15.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009).

2.2.3 Resultados

2.2.3.1 Dose de radiação gama em larvas de *C. capitata* *tsl*-Viena 8 para não emergência dos adultos e respectivo efeito na emergência e razão sexual do parasitoide *D. longicaudata*

Com o aumento da dose aplicada nas larvas, reduziu-se a emergência de moscas ($F_{(6, 22)} = 120,54$; $P < 0,00001$), chegando a 0% nas doses de 60 e 70 Gy (Figura 2.4).

Figura 2.4 – Doses de radiação gama aplicadas em larvas de *C. capitata* tsl-Viena 8 para não emergência dos adultos

A partir da 14^a geração, passou-se a irradiar as larvas antes da exposição ao parasitoide, na dose de 60 Gy, o que demonstrou efeito positivo na emergência do parasitoide ($F_{(1, 378)} = 24,75$; $P < 0,001$) mas não alterou a razão sexual ($F_{(1, 324)} = 3,30$; $P = 0,07$) (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Taxa de emergência e razão sexual [média $\pm$ erro padrão (n)] de *Diachasmimorpha longicaudata* criado em larvas de *Ceratitis capitata* tsl-Viena 8 irradiadas e não irradiadas. Temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$; 70-80% UR

Larvas hospedeiras	Taxa de emergência	Razão sexual
Irradiadas	0,20 $\pm$ 0,01 (194) a	0,53 $\pm$ 0,01 (166) a
Não-irradiadas	0,14 $\pm$ 0,01 (187) b	0,57 $\pm$ 0,02 (161) a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F ($P > 0,01$).

2.2.3.2 Parâmetros de produção e qualidade de *D. longicaudata* criado em larvas de *C. capitata* tsl-Viena 8

As quantidades de pupas parasitadas e parasitoides produzidos variaram nas primeiras gerações conforme a criação se estabiliza e a população aumenta (Figura 2.5). Com o aumento da produção de parasitoides, foi possível realizar liberações aumentativas no campo e experimentos em maior escala e, justamente essa demanda, ausente ou presente, resultou na flutuação da quantidade de pupas

parasitadas e parasitoides produzidos. A maior quantidade de parasitoides produzidos foi de 32,6 litros de pupas parasitadas, correspondendo a 456 mil parasitoides. A média foi de $6,67 \pm 1,56$ litros/geração e $76,86 \pm 20,47$ mil parasitoides por geração.

Figura 2.5 – Produção de pupas de *Ceratitis capitata* *tsl*-Viena 8 parasitadas e adultos de *Diachasmimorpha longicaudata* ao longo de 25 gerações. Temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$; 70-80% UR; 14 horas de fotofase

A taxa de emergência do parasitóide mostrou-se baixa quando criado na linhagem *tsl*-Viena 8 de *C. capitata* (Figura 2.6), em média $0,18 \pm 0,01$ ($n=375$), variando ao longo do período. Entretanto, a taxa de parasitismo obtida apresentou valores bem maiores, em média $0,73 \pm 0,02$ ($n=375$).

A razão sexual dos parasitoides mostrou-se praticamente estável ao longo das 25 gerações, com igual proporção de machos e fêmeas na população ($0,54 \pm 0,01$ em média [$n= 362$]).

Figura 2.6 - Parasitismo e emergência de *Diachasmimorpha longicaudata* produzido em larvas de *Ceratitis capitata* tsl-Viena 8 ao longo de 25 gerações. Temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$; 70-80% UR; 14 horas de fotofase

O tamanho do parasitoide criado em larvas irradiadas da linhagem *tsl*-Viena 8 de *C. capitata* está adequado para indivíduos de criação massal (Tabela 2.2).

A duração do ciclo do parasitoide neste hospedeiro durou cerca de 15 dias, com 76% de voadores em média (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Valores médios [$\pm$ EP (n)] de parâmetros morfológicos e biológicos para avaliação da qualidade de *Diachasmimorpha longicaudata* produzido em larvas irradiadas de *Ceratitis capitata* *tsl*-Viena 8. Temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$; 70-80% UR; 14 horas de fotofase

Parâmetros	Média $\pm$ erro padrão (n)
Peso de machos (mg)	2,70 $\pm$ 0,08 (20)
Peso de fêmeas (mg)	3,06 $\pm$ 0,09 (20)
Tamanho de machos (mm)	4,44 $\pm$ 0,07 (20)
Tamanho de fêmeas (mm)	4,55 $\pm$ 0,08 (20)
Tamanho do ovipositor (mm)	4,87 $\pm$ 0,11 (20)
Taxa de voadores ¹	0,76 $\pm$ 0,01 (10)
Duração do ciclo (dias)	14,62 $\pm$ 0,07 (20)

¹ n° de parasitoides voadores/ total emergido

Os machos do parasitoide tiveram maior longevidade sob estresse que as fêmeas ($\chi^2=24,1$; gl=1; $P<0,001$), com médias de $2,07 \pm 0,04$ dias (n=735) e $1,80 \pm 0,07$ dias (n=530), respectivamente (Figura 2.7). A longevidade média dos parasitoides criados em larga escala em larvas irradiadas de *C. capitata* *tsl*-Viena 8 foi de $1,95 \pm 0,03$ dias (n=1267).

Figura 2.7 - Longevidade (dias) sob estresse de adultos do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* criado em grande escala em larvas irradiadas de *Ceratitis capitata* tsl-Viena 8. Estimativa de Kaplan-Meier ($P < 0,01$). Temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$; 70-80% UR; 14 horas de fotofase

2.2.3.3 Relação entre sexo do hospedeiro *C. capitata* tsl-Viena 8 e taxa de parasitismo, taxa de emergência e razão sexual do parasitoide *D. longicaudata*

Analisando os dados de controle de qualidade da criação em grande escala, a taxa de parasitismo variou conforme o sexo (cor do pupário) do hospedeiro ($\chi^2_{(1, 44)} = 102,84$; $P < 0,001$), sendo maior em machos ($0,53 \pm 0,03$; $N=117$) que em fêmeas ($0,16 \pm 0,05$; $N=29$). O mesmo aconteceu para a emergência do parasitoide ($F_{(1, 299)} = 215,72$; $P < 0,001$), sendo maior em machos ($0,20 \pm 0,01$; $N=224$) que em fêmeas ($0,02 \pm 0,01$; $N=77$). Entretanto, não houve diferença na razão sexual dos parasitoides oriundos de machos ou fêmeas ($F_{(1, 245)} = 0,30$; $P=0,58$).

2.2.3.4 Avaliação de diferentes coletas de larvas de *C. capitata* tsl-Viena 8 na taxa de parasitismo, emergência e razão sexual do parasitoide *D. longicaudata*

Os três parâmetros variaram conforme a coleta do hospedeiro ($F_{(6, 77)} = 17,73$; $P < 0,001$ para taxa de parasitismo, $F_{(6, 161)} = 66,49$; $P < 0,001$ para emergência e $F_{(6, 161)} = 19,93$; $P < 0,001$ para razão sexual) (Tabela 2.3).

Dentre as larvas da linhagem *tsl*-Viena 8, aquelas de 4ª coleta e de ovos tratados termicamente apresentaram as maiores taxas de parasitismo (acima de 0,7)

e não diferiram da linhagem bissexual. Já a taxa de emergência de larvas de 4ª coleta foi baixa, e os maiores valores foram obtidos em larvas de tratamento térmico e da linhagem bissexual (acima de 0,5). A proporção de fêmeas foi maior na linhagem *tsl*-Viena 8 que em *C. capitata* bissexual (0,57), sendo que as larvas de 4ª coleta e de ovos do tratamento térmico foram os melhores valores (acima de 0,7).

Os resultados de taxa de parasitismo e emergência obtidos em larvas de ovos tratados termicamente foram iguais aos da linhagem bissexual e a proporção de fêmeas foi superior.

Tabela 2.3 - Taxa de parasitismo, emergência e razão sexual [média $\pm$ EP (n=12)] de *Diachasmimorpha longicaudata* criado em larvas de *Ceratitis capitata* *tsl*-Viena 8 de diferentes coletas, ovos tratados termicamente, e da linhagem bissexual (não-mutante). Temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$; 70-80% UR; 14 horas de fotofase

Larvas	Taxa de parasitismo	Taxa de emergência	Razão sexual
1ª coleta	0,35 $\pm$ 0,04 e	0,20 $\pm$ 0,01 e	0,57 $\pm$ 0,02 e
2ª coleta	0,68 $\pm$ 0,04 bc	0,29 $\pm$ 0,01 c	0,68 $\pm$ 0,01 ab
3ª coleta	0,57 $\pm$ 0,03 d	0,25 $\pm$ 0,01 d	0,66 $\pm$ 0,02 bc
4ª coleta	0,78 $\pm$ 0,03 a	0,29 $\pm$ 0,01 c	0,71 $\pm$ 0,01 a
5ª coleta	0,64 $\pm$ 0,01 cd	0,37 $\pm$ 0,01 b	0,64 $\pm$ 0,01 cd
Tratamento térmico	0,72 $\pm$ 0,02 ab	0,54 $\pm$ 0,02 a	0,70 $\pm$ 0,01 a
Linhagem bissexual	0,78 $\pm$ 0,05 a	0,53 $\pm$ 0,03 a	0,57 $\pm$ 0,02 de

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F ($P>0,05$)

2.2.4 Discussão

O uso de larvas hospedeiras irradiadas favorece a produção do parasitoide, e também a sua liberação em campo, e não causa efeitos negativos no seu desenvolvimento (SIVINSKI; SMITTLE, 1990; CANCINO et al., 2009b). A irradiação debilita o sistema imunológico das larvas, evitando-se assim a morte dos ovos e larvas de primeiro ínstar do parasitoide por encapsulação no hospedeiro. Doses de 60 Gy em *Aedes aegypti* e 50 Gy em *Periplaneta americana* reduziram e atrasaram a encapsulação de organismos externos (EPPENSTEINER; KARP, 1989; CHRISTENSEN; HUFF; LI, 1990). Irradiando-se as larvas hospedeiras exclui-se a

necessidade de separação as moscas emergidas das pupas parasitadas e há um ganho na operacionalidade da produção (HENDRICHES et al., 2009). Os parasitoides produzidos são levados ao campo para a liberação pouco antes da emergência, mas ainda na forma de pupas parasitadas. A irradiação prévia impede que dessas pupas emergjam moscas-das-frutas, e assim garante-se transporte, manuseio e liberação seguros do parasitoide sem possibilidade de contaminação dos locais com a praga (SIVINSKI; SMITTLE, 1990).

A taxa média de emergência do parasitoide diminuiu quando a escala de produção aumentou. Tal fato também coincidiu com o uso da radiação das larvas, entretanto a radiação mostrou-se positiva à emergência do parasitoide, considerando-se os mesmos lotes de hospedeiro (Tabela 2.1). Portanto, a emergência do parasitoide parece estar relacionada, além da mortalidade natural decorrente da ação do sistema imunológico do hospedeiro, com a escala de produção, mais especificamente a produção de hospedeiros com qualidade, ou ao superparasitismo.

A razão sexual equipara-se à 0,55 obtido em linhagem GSS Cast191 e à 0,56 em linhagem bissexual (VISCARRET et al., 2006). Já Ovruski et al. (2003) relata 59,9% de fêmeas em criação em linhagem bissexual de *C. capitata*.

A taxa de parasitismo obtida apresentou valores bem maiores, em média $0,73 \pm 0,02$ ($n=375$). na linhagem *tsl*-Viena 8, A taxa de parasitismo em linhagem *tsl*-Viena 8 mostrou-se boa, superando os valores de 26,75% e 44,1% obtidos por López et al. (2006) na linhagem GSS Cast191 e por Ovruski et al. (2003) em linhagem bissexual, respectivamente, mostrando que as fêmeas de *D. longicaudata* parasitam as larvas de *tsl*-Viena 8. A baixa taxa de emergência do parasitoide pode ser devido ao superparasitismo e/ou à baixa qualidade desse hospedeiro criado massalmente, que pode facilmente vir a morrer antes do parasitoide passar ao segundo ínstar, o que impede o desenvolvimento de ambos. Em *A. suspensa*, esse mesmo parasitoide não muda para o 2º ínstar até que inicie a apólise² larva-pupa do hospedeiro (LAWRENCE, 1982; LAWRENCE; HAGEDORN, 1986), que marca o início da fase de pupa e metamorfose do inseto. Se o hospedeiro não iniciar a apólise, morrem ambos parasitoide e hospedeiro.

² Apólise é a separação da epiderme da cutícula já existente para a formação de outra nova. A apólise ocorre pelo aumento de volume das células da epiderme, o qual é promovido pelo aumento de ecdisônio (CHAPMAN, 1998).

As larvas fêmeas dessa linhagem de hospedeiro, que possuem ambas as mutações *White pupae* e *tsl*, apresentam um desenvolvimento mais lento, por isso a proporção de pupas brancas é maior nas últimas coletas (CÁCERES, 2002), e o atraso no desenvolvimento de larvas fêmeas de *C. capitata* afeta negativamente até a fecundidade das moscas adultas (MANSO; PIZZARRO; CLADERA, 2006). Devido às mutações e ao lento desenvolvimento, os indivíduos dessa linhagem são debilitados e podem facilmente não completar os 3 picos de produção do ecdisônio necessários para desencadear o comportamento de saída do meio larval, formação do pupário e posteriormente apólise larva-pupa (LAWRENCE, 1986), impossibilitando o desenvolvimento do parasitoide.

A produção do ecdisônio pelo hospedeiro pode garantir um suprimento adequado, do mesmo hormônio, ao parasitoide. O ecdisônio não é armazenado na glândula protorácica, seu aparecimento na hemolinfa é reflexo direto da sua síntese na glândula, ativada pelo hormônio protorácico-trópico (CHAPMAN, 1998). Não há comprovação da existência ou não de uma glândula protorácica-trópica funcional nas larvas de 1º instar do parasitoide (LAWRENCE, 1986). Sabendo que essa espécie pode adquirir ecdisônio *in vitro* e convertê-lo na forma ativa de 20-hidroxiecdisônio (LAWRENCE; HAGEDORN, 1986), fica claro que esse parasitoide pode também adquirir ecdisônio *in vivo* do hospedeiro, o que pode ser por ingestão, absorção pelo fino tegumento presente em muitas larvas de 1º instar de parasitoides, ou até mesmo pela vesícula anal (GREENWOOD, 1985; BECKAGE, 1985; EDSON; VINSON, 1977 apud LAWRENCE, 1986). Sendo assim, a disponibilidade de ecdisônio para a primeira muda do parasitoide pode vir direta e integralmente do hospedeiro, nessa espécie e em demais endoparasitoides cuja primeira muda é sincronizada com o aumento de ecdisteróides e metamorfose do hospedeiro (LAWRENCE, 1986). Se o hospedeiro não apresentar o hormônio em quantidades adequadas, após formação do pupário e início do estágio de pupa, o parasitoide pode morrer no primeiro instar.

O superparasitismo pode agir de forma semelhante na emergência do parasitoide. González et al. (2007) viram que em criação massal de *D. longicaudata*, o superparasitismo é comum, com 92% de pupários com mais de duas cicatrizes de parasitismo, e a emergência do parasitoide em criação massal tem estreita relação, inversamente proporcional, com a intensidade do superparasitismo (> 6 cicatrizes/pupário), ou seja, quanto mais superparasitada a larva for, menor será a

probabilidade de emergência do parasitoide. Durante o parasitismo, as fêmeas infectam as larvas hospedeiras com rhabdovirus, que se replicam nas células da epiderme do hospedeiro e se acumulam nas vesículas dessas células (LAWRENCE, 2005; LAWRENCE; MATOS, 2005). No caso de superparasitismo, a quantidade de partículas virais nas células da epiderme é tanta que impede a mobilidade das vesículas no interior da célula e pode inibir a apólise larva-pupa do hospedeiro (LAWRENCE, 1988).

Outro fator desfavorável à emergência do parasitoide é o estágio do hospedeiro no momento do parasitismo. Conforme já dito, o estágio de 1º ínstar desse endoparasitoide é crucial para sua sobrevivência (LAWRENCE, 1986), devendo o hospedeiro apresentar os requisitos nutricionais e fisiológicos adequados para o desenvolvimento do embrião e larvas de 1º ínstar do parasitoide. A idade do hospedeiro determina seu tamanho, parasitismo e emergência do parasitoide (WONG; RAMADAN, 1992; WONG, 1993; CANCINO et al., 2009b). O tamanho do hospedeiro, pode até conferir-lhe adequabilidade aos estádios mais avançados do parasitoide, mas isso não garante estar adequado também para os estádios mais jovens (LAWRENCE, 1986). A eclosão das larvas de *D. longicaudata* em *A. suspensa* é cerca de 50% maior em larvas parasitadas no primeiro dia do terceiro ínstar que em larvas parasitadas quando já em comportamento de saída do meio larval (LAWRENCE; BARANOWSKI; GREANY, 1976). Em criação massal de *C. capitata*, tanto linhagens GSS quanto bissexuais, as larvas são coletadas justamente no estágio de saída do meio larval, pois isso é feito facilmente por meio de bandejas com água posicionadas abaixo do meio larval, uma vez que as larvas saltam para sair da dieta e formar o pupário. Esse estágio de coleta de larvas parece não ser o mais adequado para o desenvolvimento do parasitoide, entretanto é suficientemente prático e barato, em âmbitos operacional e produtivo, para viabilizar a produção do hospedeiro em escala massal.

O tamanho do ovipositor coincide com os valores da criação em *A. ludens*, mas é menor que o das fêmeas selvagens (CANCINO et al., 2002). A taxa de voadores, de 0,76, está abaixo da porcentagem obtida em parasitoides criados massalmente em *A. ludens* (83,5%) e em selvagens (96,3%) (CANCINO et al., 2002).

Em *C. capitata* bissexual o ciclo do parasitoide é de 16 dias (PALADINO; PAPESCHI; CLADERA, 2010), aproximadamente um dia a mais que na linhagem tsl-

Viena 8. Os períodos de pré-oviposição e oviposição em linhagem GSS Cast 191 não difere dos em linhagem bissexual, sendo em média 3,23 e 28 dias, respectivamente (VISCARET et al., 2006). Segundo esses mesmos autores, o pico de fertilidade das fêmeas do parasitoide criado em linhagem GSS se concentra entre o 6º e 14º dia.

A longevidade média sob estresse dos adultos de *D. longicaudata* criado em larvas irradiadas de *C. capitata* tsl-Viena 8 foi inferior às obtidas em criação massal em larvas irradiadas de *A. ludens*, que é um hospedeiro maior (LÓPEZ et al., 2009). Os autores constataram que a longevidade sob estresse das fêmeas está diretamente relacionada ao tamanho do hospedeiro, isso justifica a diferença nos valores, pois as larvas de *C. capitata* são visivelmente menores que as de *A. ludens*.

Existe relação entre cor da pupa hospedeira e taxa de parasitismo e emergência do parasitoide, sendo ambos maiores em pupas marrons, explicando a relação desses mesmos parâmetros com as diferentes coletas de larvas. A taxa de parasitismo e razão sexual em larvas especificamente de 4ª coleta foi boa, mas a taxa de emergência de larvas de 4ª coleta foi baixa, indicando que as larvas de quarta coleta são aparentemente adequadas ao parasitoide (talvez em tamanho ou alguma outra característica que a fêmea do parasitoide perceba e possa influenciar na escolha do hospedeiro), tanto que são as mais parasitadas dentre todas as coletas. Entretanto, a baixa taxa de emergência mostra que talvez não estejam fisiologicamente adequadas ao desenvolvimento do parasitoide, não conseguindo iniciar a fase de pupa e morrendo antes do parasitoide conseguir iniciar a muda para o segundo ínstar. Esse fato também foi observado na criação em larga escala, onde a baixa qualidade das larvas torna-se ainda mais pronunciada e prejudica significativamente a emergência do parasitoide.

O tratamento térmico promove a eliminação de indivíduos sensíveis ao calor: fêmeas, na totalidade, e machos recombinantes com mutação de sensibilidade à temperatura, que também tem desenvolvimento mais lento. Com isso, melhora a qualidade das larvas hospedeiras a serem disponibilizadas para os parasitoides, favorecendo o parasitismo e equiparando-se às larvas da linhagem bissexual.

Na produção massal de *C. capitata* tsl-Viena 8 para técnica do inseto estéril, as pupas de terceira coleta são descartadas, não sendo usadas nem para a produção de machos estéreis nem para as colônias aumentativas, pois a equivalência em número de pupas brancas e marrons inviabiliza a separação dos

sexos. No caso de associar as produções de insetos estéreis e parasitoides, a utilização de larvas de terceira coleta de *C. capitata* tsl-Viena 8 para produção do parasitoide seria interessante, pois essas larvas seriam descartadas. Entretanto, a taxa de emergência foi a segunda pior entre todas as coletas, apesar do desenvolvimento do parasitoide ser possível nessas larvas. Portanto, caso haja a necessidade de se criar o parasitoide e o único hospedeiro disponível em larga escala ser a linhagem *tsl*-Viena 8 de *C. capitata* (apesar de não ser um bom hospedeiro), o uso de larvas oriundas de ovos tratados termicamente seria uma alternativa interessante, pois nesse caso os parâmetros de qualidade do parasitoide equiparam-se aos da linhagem bissexual.

2.3 Conclusões

O parasitoide *D. longicaudata* parasita e se desenvolve na linhagem mutante *tsl*-Viena 8 de *C. capitata*, entretanto a emergência é baixa. A irradiação das larvas melhora a emergência do parasitoide em criação de larga escala. Recomenda-se utilizar larvas oriundas de ovos tratados termicamente para melhorar o parasitismo e a emergência do parasitoide nessa linhagem de hospedeiro.

Referências

- BESS, H.A.; BOSCH, R. van der; HARAMOTO, F.H. Fruit fly parasitoids and their activities in Hawaii. **Proceedings of the Hawaiian Entomological Society**, Honolulu, v. 17, p. 367-378, 1961.
- CÁCERES, C. Mass rearing of temperature sensitive genetic sexing strains in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitidis capitata*). **Genetica**, Dordrecht, v. 116, p. 107-117, 2002.
- CÁCERES, C.; FISHER, K.; RENDON, P. Mass rearing of the medfly temperature sensitive lethal genetic sexing strain in Guatemala. In: TAN, K.H. (Ed.). **Area-wide management of fruit flies and other major insect pests**. Penang: Universiti Sains Malaysia Press, 2000. p. 551-558.
- CANCINO, J.; CANCINO, J.L.; MARTINEZ, M.; LIEDO, P. Quality control parameters of wild and mass reared *Diachasmimorpha longicaudatata* (Ashmed), a fruit fly parasitoid. In: LEPPLA, N.C.; BLOEM, K.A.; LUCK, R.F. (Ed.). **Quality control for mass-reared arthropods**. Gainesville: Institute of Food and Agricultural Sciences; University of Florida, 2002. p. 84-94.

CANCINO, J.; RUIZ, L.; MONTTOYA, P.; HARRIS, E. Biological attributes of three introduced parasitoids as natural enemies of fruit flies, genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 133, p. 181–188, 2009a.

CANCINO, J.; RUIZ, L.; LOPEZ, P.; SIVINSKI, J. The suitability of *Anastrepha* spp. and *Ceratitis capitata* larvae as host of *Diachasmimorpha longicaudata* and *D. tryoni*: Effects on host age and radiation dose and implications for quality control in mass rearing. **Biocontrol Science and Technology**, Oxon, v.19, SI, p. 81-94, 2009b.

CARVALHO, R.S.; NASCIMENTO, A.S.; MATRANGOLO, W.J.R. Controle biológico. In: MALAVAZI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 113-117.

CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function**. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 770p.

CHRISTENSEN, B.M.; HUFF, B.M.; J. LI. Effect of gamma irradiation on the hemocyte-mediated immune response of *Aedes aegypti* against Microfilariae. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 56, p. 123-127, 1990.

CRAWLEY, M.J. **The R book**. West Sussex: John Wiley, 2007. 942 p.

EPPENSTEINER, J.M.; KARP, R.D. The effect of gamma irradiation on the response to primary xenografts in the American cockroach *Periplaneta Americana*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 81-86, 1989.

FAO. IAEA. USDA. **Manual for product quality control and shipping procedures for sterile mass-reared tephritid fruit flies**. Version 5.0. Vienna: International Atomic Energy Agency, 2003. 85 p.

FISHER, K. Genetic sexing strains of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): optimizing high temperature treatment of mass-reared temperature-sensitive lethal strains. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, p. 1406-1414, 1998.

_____. Genetic sexing strains of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): Quality in mass reared temperature sensitive lethal strains treated at high temperatures. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, p. 394-402, 2000.

FISHER, K.; CÁCERES, C. A filter rearing system for mass reared genetic sexing strains of Mediterranean fruit fly (Diptera:Tephritidae). In: TAN, K. H. (Ed.). **Area-wide management of fruit flies and other major insect pests**. Penang: Universiti Sains Malaysia Press, 2000. p. 543-550.

FRANZ, G.; GENCHEVA, E.; KERREMANS, P.H. Improved stability of genetic sex separation strains for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. **Genome**, Ottawa, v. 37, p. 72-82, 1994.

GODFRAY, H.C.J. **Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology**. Princeton University Press Princeton, 1994. 473 p.

GONZÁLEZ, P.I.; MOTOYA, P.; LACHAUD-PEREZ, G.; CANCINO, J.; LIEDO, P. Superparasitism in mass reared *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**, San Diego, v. 40, p. 320-326, 2007.

HENDRICH, J.; BLOEM, K.; HOCH, G.; CARPENTER, J.E.; GREANY, P.; ROBINSON, A.S. Improving the cost-effectiveness, trade and safety of biological control for agricultural insect pests using nuclear techniques. **Biocontrol Science and Technology**, Oxon, v.19, SI, p. 3-22, 2009.

KERREMANS, P.H.; FRANZ, G. Cytogenetic analysis of chromosome 5 from Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. **Chromosoma**, Heidelberg, v. 103, p. 142–146, 1994.

KERREMANS, P.; FRANZ, G. Isolation and cytogenic analyses of genetic sexing strains for the medfly, *Ceratitis capitata*. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 91, p. 255-261, 1995.

KLASSEN, W.; CURTIS, C.F. History of the sterile insect technique. In: DYCK, V.A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A.S. (Ed.). **Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 3-36.

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

LAWRENCE, P.O. *Biosteres longicaudata*: developmental dependence on host (*Anastrepha suspensa*) physiology. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 53, p. 396-405, 1982.

_____. Host-parasite hormonal interactions: An overview. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.32, n. 4, p. 295-298, 1986.

_____. Ecdysteroid titres and integument changes in superparasitized puparia of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 34, n. 7, p. 603-608, 1988.

_____. Morphogenic and cytopathic effects of the *Diachasmimorpha longicaudata* entomopoxvirus in host haemocytes. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 221-233, 2005.

LAWRENCE, P.O.; HAGEDORN, H.H. Relationship between the ecdysteroid titers of a host and those of its parasite. **Insect Biochemistry**, Oxford, v.16, p.163-167, 1986.

LAWRENCE, P.O., MATOS, L.F. Transmission of the *Diachasmimorpha longicaudata* rhabdovirus (DIRhV) to wasp offspring: an ultrastructural analysis. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 235-241, 2005.

LAWRENCE, P.O.; BARANOWSKI, R.M.; GREANY, P.D. Effect of host age on development of *Biosteres (Opius) longicaudata*, a parasitoid of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 59, p. 33-39, 1976.

LÓPEZ, S.N.; VISCARRET, M.; LANZAVECCHIA, S.; GOENAGA, S.; CLADERA, J.L. Producción masiva y simultánea de machos de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) y parasitoides *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). **Revista da Sociedad Entomologica da Argentina**, Mendoza, v. 65, n. 3/4, p. 99-108, 2006.

LÓPEZ, O.P.; HENAUT, Y.; CANCINO, J.; LAMBIN, M.; CRUZ-LOPEZ, L.; ROJAS, J.C. Is host size na indicator of quality in the mass-reared parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 92, n. 3, p. 441-449, 2009.

MANSO, F.C.; PIZZARRO, J.; CLADERA, J.L. Relación entre tempo de desarrollo larvário y fecundidad de la hembra em *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Revista da Sociedad Entomologica Argentina**, Mendoza, v. 65, n. 1/2, p. 43-54, 2006.

MESSING, R.H.; KLUNGNESS, L.M.; PURCELL, M.; WONG, T.T.Y. Quality control parameters of mass-reared Opiine parasitoids used in augmentative biological control of Tephritidae fruit flies in Hawaii. **Biological Control**, San Diego, v. 3, p. 140-147, 1993.

OVRUSKI, S.M.; COLIN, C.; SORIA, A.; OROÑO, L.E.; SCHLISERMAN, P. Introducción y producción en laboratorio de *Diachasmimorpha tryoni* y *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) para el control biológico de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) en la Argentina. **Revista da Sociedad Entomologica da Argentina**, Mendoza, v. 62, n. 3/4, p. 49-59, 2003.

PALADINO, L.Z.C.; PAPESCHI, A.G.; CLADERA, J.L. Immature stages of development in the parasitoid wasp *Diachasmimorpha longicaudata*. **Journal of Insect Science**, Ludhiana, v. 10, n. 56, p. 1-13, 2010.

R CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2009. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 20 dez. 2012.

ROBINSON, A.S.; VAN HEEMERT, C. *Ceratitis capitata*: a suitable case for genetic sexing. **Genetica**, Dordrecht, v. 58, p. 229-237, 1982.

RÖSSLER, Y. Recombination in males and females of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) with and without chromosomal aberrations. **Annals of Entomological Society of America**, Lanham, v. 75, p. 619-622, 1982a.

_____. Genetic recombination in males of Mediterranean fruit fly and its relation to automated sexing methods. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 75, p. 28-31, 1982b.

_____. Effects of genetic recombination in males of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) on the integrity of “genetic sexing” strains produced for sterile-insect releases. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 78, p. 265-270, 1985.

_____. The genetics of the Mediterranean fruit fly: a ‘white-pupa’ mutant. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 72, p. 583–590, 1979.

SIVINSKI, J.; SMITTLE, B. Effects of gamma radiation on the development of the Caribbean fruit fly (*Anastrepha suspensa*) and the subsequent development of its parasite *Diachasmimorpha longicaudata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 55, p. 295-297, 1990.

SIVINSKI, J.; PIÑERO, J.; ALUJA, M. The distributions of parasitoids (Hymenoptera) of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) along an altitudinal gradient in Veracruz, Mexico. **Biological Control**, San Diego, v. 18, p. 258-269, 2000.

SIVINSKI, J.; CALKINS, C.O.; BARANOWSKI, R.; HARRIS, D.; BRAMBILA, J.; DIAZ, J.; BURNS, R.E.; HOLLER, T.; DODSON, G. Suppression of a Caribbean fruit fly (*Anastrepha suspensa* (Loew), Diptera: Tephritidae) population through augmented releases of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, San Diego, v. 6, p. 177-185, 1996.

VAN NIEUWENHOVE, G.; OVRUSKI, S.M. Influence of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) larval instars on the production of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) progeny and their sex ratio. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 94, n. 4, p. 863-868, 2011.

VISCARRET, M.M.; LA ROSSA, R.; SEGURA, D.F.; OVRUSKI, S.M.; CLADERA, J.L. Evaluation of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) reared on a genetic sexing strain of *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**, San Diego, v. 36, p. 147–153, 2006.

WALDER, J.M.M. Produção de moscas-das-frutas e seus inimigos naturais: associação de moscas estéreis e controle biológico. In: PARRA, J.R.P. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p.181-190.

WHITE, I.M.; ELSON-HARRIS, M.M. **Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics**. Wallingford: CAB International, 1992. 624 p.

WONG, T.T.Y. Mass-rearing of larval fruit flies parasitoids in Hawaii. In: ALUJA, M.; LIEDO, P. (Ed.). **Fruit flies: biology and management**. New York: Springer-Verlag, 1993. p. 257-260.

WONG, T.T.Y.; RAMADAN, M. Mass rearing biology of larval parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) of Tephritid fruit flies in Hawaii. In: ANDERSON, T.; LEPLA, N. (Ed.). **Advances in insect rearing for research and pest management**. Boulder: Westview Press, 1992. p. 405-476.

3 CRIAÇÃO ARTIFICIAL DE *Anastrepha fraterculus* EM GRANDE ESCALA

Resumo

Na América, algumas espécies do gênero *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) são manejadas com sucesso associando a técnica do inseto estéril e liberações de parasitoides, e *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) segue a mesma tendência. Tais estratégias de manejo integrado só se tornam viáveis quando é possível criar os insetos em escala massal. Neste trabalho, são apresentados a metodologia de criação artificial de *A. fraterculus* ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ UR, fotofase 14 h) e dados de produção e qualidade de 54 gerações, incluindo o processo de domesticação da espécie (até a 5ª geração). A coleta de ovos foi por meio de painéis de oviposição, que consistem em uma das laterais das gaiolas confeccionada com tecido voal azul revestido em um dos lados por uma fina camada de silicone. Os ovos devem permanecer em aeração em água por 48 horas antes da semeadura em dieta. As larvas foram criadas em dieta artificial de Salles (1992), que pode ter a quantidade de ágar reduzida para 3,4 g/l de dieta (dieta semi-líquida) para minimizar o custo e melhorar a qualidade dos insetos produzidos. A dieta de adultos contém levedura hidrolisada nacional, bem como os demais ingredientes, com redução de custo e melhoria na produção e qualidade dos insetos. A quantidade de insetos produzida varia conforme a demanda para liberações, experimentos ou produção de parasitoides, chegando a média de 6,3 l de pupários/ geração. Os insetos produzidos de acordo com a metodologia proposta apresentam alta qualidade. A principal dificuldade da produção de *A. fraterculus* em grande escala encontra-se na fase larval do inseto. O rendimento da produção pode ser melhorado aumentando a homogeneidade no desenvolvimento larval.

Palavras-chave: Produção de insetos; Técnica do inseto estéril; Tephritidae; Manejo integrado de pragas; Moscas-das-frutas

Abstract

Some species of the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) are successfully managed by associating the sterile insect technique with parasitoid releases. Such strategies of integrated pest management can only be implemented if insect mass-rearing is feasible. In this work, we show the process of domestication, rearing technology and quality control data of 54 generations of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) kept under full artificial conditions.

Eggs were collected through an artificial oviposition panel consisting in one side of the cage made of blue *voile* fabric externally covered with a thin layer of silicon rubber and were air-bubbled in water at 25°C for 48 hours before seeding. Larvae were reared in the artificial diet of Salles (1992) with 66 % of agar reduction turning over a semi-liquid diet, which reduced costs and improved insect quality. The adult's diet comprised local ingredients including the hydrolyzed yeast. The volume of insects produced varied depending on the demand for releases, bioassays and parasitoid production. The critical stage in large-scale production of this fly is its larval development. This system of artificial rearing for *A. fraterculus* developed in Brazil allows producing a large amount of insects with excellent quality using local ingredients and little agar in the diet composition. By reducing the interval of egg

collection, the system might be optimized in terms of insect yield and therefore supply the demands of *A. fraterculus* for IPM purposes.

Keywords: Insect production; Sterile insect technique; Tephritidae; Integrated pest management; Fruit flies

3.1 Introdução

Dentre as pragas agrícolas de grande importância mundial encontram-se as mosca-das-frutas (Diptera: Tephritidae), que afetam a fruticultura pelas perdas diretas na produção e pelas restrições quarentenárias à exportação de frutas oriundas de áreas com ocorrência dessas pragas, interferindo no comércio internacional e prejudicando a economia do país.

Os programas de Manejo Integrado de Pragas na fruticultura têm incentivado o uso de técnicas de controle biológico, que dispensam o uso de agentes químicos e promovem o aumento da população de inimigos naturais, o que, consequentemente, leva à redução populacional das pragas. Além do controle biológico, existe outra técnica que dispensa o uso de agentes químicos, conhecida como 'Técnica do Inseto Estéril' (TIE), que consiste na esterilização de grande quantidade de insetos para liberação no campo. Os insetos liberados competirão com insetos selvagens na cópula, ocasionando a diminuição populacional gradativa da praga a cada geração.

Em programas de manejo integrado de moscas-das-frutas, o controle biológico aplicado, com uso de parasitoides, e a técnica do inseto estéril se completam de maneira bastante eficiente. Para implantar essas estratégias, em conjunto ou não, é necessária a criação massal da praga alvo, no caso da TIE, e do parasitoide no caso do controle biológico aplicado, o que por sua vez demanda a criação de algum hospedeiro para sua produção. Para a criação desses insetos em condições artificiais, é necessário estabelecer técnicas e meios para que estes consigam se multiplicar de forma significativa, escalonada e estável, originando progênes com a qualidade necessária para o propósito para o qual estão sendo produzidos, com o menor custo possível.

Dentre as espécies de *Anastrepha* manejadas com sucesso pelo uso da TIE ou controle biológico aplicado, destacam-se *A. obliqua* e *A. ludens* no México (GUTIÉRREZ- RUELAS; SANTIAGO, 2008); *A. suspensa* no México e EUA

(KNIPLING, 1992; SIVINSKI et al., 1996; MONTOYA et al., 2000) e *A. fraterculus* na Argentina (ALLINGHI et al., 2007; CENDRA et al., 2007; VERA et al., 2007; OVRUSKI et al., 2011).

No Brasil, a espécie de maior importância econômica é a *A. fraterculus* (MALAVASI; ZUCCHI; SUGAYAMA, 2000). O presente trabalho teve por objetivo apresentar uma metodologia de criação de *A. fraterculus* em grande escala, com o menor custo possível, visando futuras criações massais para projetos de manejo integrado com uso da TIE e controle biológico aplicado.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Revisão bibliográfica

Anastrepha fraterculus (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) é uma espécie de grande importância econômica cuja população atinge altos níveis de densidade. Popularmente é conhecida como mosca sul-americana. Multivoltina, pode apresentar mais de seis gerações ao ano, o que possibilita sua ocorrência em todos os meses do ano, atacando mais de 80 espécies frutíferas, incluindo manga, citros, goiaba, maçã e (DA SILVA; SILVEIRA NETO; ZUCCHI, 1996; STECK, 1999). É considerada praga-chave na fruticultura nas regiões sul e sudeste do Brasil, e encontra-se distribuída nas Américas, do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina (SALLES, 1995; ALUJA, 1999).

A. fraterculus é considerada um complexo de espécies crípticas e não uma única espécie. Entre as populações do Brasil, Solferini; Morgante (1987) observaram quatro variações cariotípicas. Posteriormente, outras evidências morfológicas, citogenéticas, comportamentais e no próprio DNA também confirmaram essa hipótese (STECK; SHEPPARD, 1993; SELIVON; MORGANTE; PERONDINI, 1997; SELIVON; PERONDINI, 1998; SELIVON et al., 2001; INFANTE-MALACHIAS; SHOJI; SELIVON, 2001).

O ciclo de vida dessa espécie pode durar 40 dias e os adultos demoram cerca de 16 dias para atingirem a maturidade sexual (DE LIMA; HOWSE; SALLES, 1994) período no qual as fêmeas necessitam de alimentação proteica para desenvolvimento e maturação dos ovos. Após acasalarem, as fêmeas depositam seus ovos no mesocarpo de frutos maduros. Em 72 horas as larvas eclodem e se

desenvolvem no interior do fruto, levando cerca de 22 dias para completarem os três instares da fase larval (ZART; FERNANDES; BOTTON, 2010). No fim do terceiro ínstar, deixam o fruto hospedeiro e no solo se transformam em pupa. Após 14-15 dias de estágio pupal (SUGAYAMA et al., 1998; ZART; FERNANDES; BOTTON, 2010), os adultos emergem e inicia-se um novo ciclo. A longevidade geralmente ultrapassa 40 dias (SUGAYAMA et al., 1998; JOACHIM-BRAVO et al., 2003; ZART; FERNANDES; BOTTON, 2010).

A criação de insetos em meios artificiais proporcionou o avanço nas áreas básicas da Entomologia, como a nutrição, toxicologia, genética, comportamento, ecologia e até taxonomia. Assim, o desenvolvimento da criação massiva de insetos, que envolve a produção de milhões de insetos em condições artificiais (PARRA, 2000), acarretou no aumento de pesquisas aplicadas em controle biológico, resistência de plantas, patologia de insetos, controle genético (esterilização de machos e genes letais), vetores de doenças, produção de feromônios etc. (PARRA, 2001).

O primeiro grande avanço na criação de *A. fraterculus* foi obtido a partir dos estudos realizados por Salles (1992) na Embrapa Clima Temperado em Pelotas, RS. Com este sistema, foi possível o estabelecimento da criação de *A. fraterculus* em laboratório no Brasil e Argentina (DE LIMA; HOWSE; SALLES, 1994; JALDO; GRAMAJO; WILLINK, 2001).

A partir de 1996, com a realização do Workshop da FAO/IAEA sobre criação massal de *A. fraterculus* em Viña Del Mar (Chile) e com a participação de pesquisadores da Argentina, Brasil, Colômbia e Peru, foram abordados os avanços e as dificuldades com a criação dessa espécie em laboratório (ORTIZ, 1999). Os pesquisadores chegaram ao consenso de que os maiores problemas estavam em encontrar uma técnica que promovesse uma oviposição efetiva, sem perda de fertilidade e dietas artificiais mais baratas (ORTIZ, 1999).

3.2.2 Material e Métodos

3.2.2.1 Domesticação de *A. fraterculus*

Os insetos parentais foram coletados de frutos infestados de uma única planta de uvaia, hospedeira de *A. fraterculus*, em setembro de 2005. Esses frutos foram

mantidos no laboratório ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ UR e fotofase de 14 h) em bandejas plásticas com vermiculita para formação e coleta dos pupários. Os adultos coletados foram certificados morfologicamente quanto à espécie (duas manchas longitudinais no mesotergito e subescutelo) (URAMOTO; ZUCCHI, 2009), confirmando 250 indivíduos machos e 262 fêmeas. Os adultos foram colocados em gaiola telada (30 x 30 x 30 cm) contendo água, alimento (1 parte de açúcar refinado e 3 partes de levedura hidrolisada *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Hydrolysate Enzymatic, empresa MP Biomedical LLC) e fruto de mamão papaia (*Carica papaya*) para oviposição natural.

Para iniciar a colônia, a primeira geração foi criada somente em frutos, provendo 100 pupários dos quais emergiram 39 machos e 42 fêmeas. A partir da segunda geração, além da água, do alimento e do fruto, a gaiola continha uma das laterais composta por tecido de voal azul siliconado estimulando oviposição artificial. Cuidadosamente, os poucos ovos colocados no tecido de voal foram retirados da superfície externa, com auxílio de pincel, e colocados em papel de filtro umedecido dentro de placas de Petri para incubação ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 72 h). As larvas de 1º instar foram transferidas com pincel para a dieta artificial (SALLES, 1992). Os adultos oriundos desses ovos foram mantidos em gaiolas sem fruto para oviposição, de forma a forçar a postura em substrato artificial.

Os frutos de mamão foram substituídos da gaiola a cada dois dias, sendo transferidos para bandejas plásticas contendo vermiculita onde permaneceram por aproximadamente 13 dias (período de desenvolvimento larval). As larvas foram retiradas dos frutos já apodrecidos e mantidas em vermiculita para formação dos pupários. Dois dias antes da emergência, os pupários foram acondicionados em nova gaiola para continuidade de criação.

Os adultos emergidos dos frutos foram colocados em gaiolas separadas dos adultos oriundos da postura de ovos na tela do voal, estabelecendo assim, uma criação no mamão paralela à artificial. A oviposição nos frutos foi feita para garantir o desenvolvimento das primeiras gerações no laboratório evitando novas coletas de frutos infestados no campo, caso houvesse perdas de insetos criados artificialmente. Esse processo teve continuidade até a quinta geração.

3.2.2.2 Criação artificial de *A. fraterculus*

Após a domesticação, a partir da sexta geração, a criação passou a ser conduzida totalmente em condições artificiais. Alguns exemplares de adultos, ovos e larvas foram enviados para o Laboratório de Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento de Insetos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para identificação. Com base na morfologia do acúleo e dos ovos e na análise cromossômica das larvas confirmou-se tratar de uma colônia pura de *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus* (SELIVON; PERONDINI; MORGANTE, 2005; ARAÚJO; ZUCCHI, 2006).

Os adultos foram mantidos em gaiolas (30 x 50 x 100 cm) com base e cantoneiras de alumínio, tendo a parte da frente e de trás de acrílico, parte superior e uma das laterais teladas para ventilação, e a outra lateral com tecido voal azul com fina camada de silicone, por onde as fêmeas ovipositavam (Figura 3.1). Para evitar o ressecamento dos ovos, foi colocado paralelamente a este tecido siliconado, um pano-esponja vegetal umedecido, preso a uma tampa de PVC transparente (Figura 3.1). Cada gaiola recebeu aproximadamente 70 ml de pupários, correspondendo a cerca de 1960 adultos.

Figura 3.1 - Gaiolas de adultos utilizadas para criação artificial, em larga escala, de *Anastrepha fraterculus*. Os painéis de oviposição das três últimas gaiolas do lado direito estão revestidos com esponja umedecida para evitar ressecamento dos ovos. As gaiolas da direita não possuem revestimento no painel, pois as fêmeas encontram-se no período de pré-oviposição

A dieta para adultos foi composta, inicialmente de mistura de levedura hidrolisada (Yeast Hydrolysate Enzymatic, empresa MP Biomedical LLC) e açúcar refinado, na proporção 1 : 3, sendo fornecida na canaleta superior da gaiola. A partir da 17ª geração, passou-se a adicionar gérmen de trigo cru à dieta, na proporção de 1 parte de proteína hidrolisada, 1 parte de gérmen de trigo e 3 partes de açúcar refinado, triturando previamente todos os ingredientes no liquidificador. A partir da 25ª geração, passou-se a usar, apenas em parte da criação, outras fontes proteicas na dieta dos adultos em substituição ao produto importado, que na ocasião encontrava-se indisponível para compra. As novas fontes proteicas foram posteriormente avaliadas experimentalmente na 30ª geração.

O fornecimento de água deionizada foi feito com 0,03% de benzoato de sódio para evitar contaminação fúngica, e a solução foi acondicionada em canaleta fechada com uma única fenda, por meio da qual se colocou papel de filtro para as moscas terem acesso à água sem se molhar.

A atração das fêmeas para ovipositarem no voal foi feita por meio de lâmpadas fluorescentes colocadas próximas ao tecido. As fêmeas introduzem os ovipositores através da malha do voal e os ovos ficam presos no lado externo do tecido siliconado (Figura 3.2 a), sendo retirados com um jato leve de água (Figura 3.2 b). Esses ovos foram recolhidos a cada 24 h por 15-20 dias, descartando-se os adultos após esse período.

Figura 3.2 – Coleta de ovos de *Anastrepha fraterculus*. a) ovos presos no painel de oviposição em criação artificial; b) coleta dos ovos com jato leve de água

Os ovos foram lavados com água filtrada e solução de benzoato de sódio a 0,03% por 5 minutos para reduzir as contaminações microbianas na dieta artificial. Após a determinação do volume de ovos coletado os mesmos foram colocados em Erlenmeyer de 500 ml para aeração em água filtrada (20 ml água: 1 ml ovos) por um período de 48 h em banho-maria a 25°C (Figura 3.3). A aeração foi feita por meio de uma pequena bomba com aerador para aquário colocado no fundo do Erlenmeyer contendo a água com os ovos.

Figura 3.3 - Aeração de ovos de *Anastrepha fraterculus* em criação artificial

Em seguida, os ovos foram colocados em dieta para o desenvolvimento larval (Salles, 1992) com a seguinte composição: 60 g de germe de trigo; 60 g de levedura-de-cerveja; 60 g de açúcar branco cristal; 1 g de benzoato de sódio. Esses ingredientes foram homogeneizados em liquidificador com 400 ml de água fria, formando uma pasta. Adicionou-se 6 ml de ácido clorídrico concentrado (37%) e 8 ml de solução alcoólica de nipagin a 10%. Em outro recipiente, colocou-se 400 ml de água e 10,0 g de ágar grau técnico. Levou-se ao fogo, mexendo constantemente, até o ponto de fervura. Adicionou-se a solução água-ágar à pasta da dieta e bateu-se novamente no liquidificador por mais 2 minutos, até a perfeita homogeneização.

Foram distribuídos de 1 a 3 l de dieta, ainda quente, em bandejas plásticas (35 x 25 x 7 cm).

Após o resfriamento da dieta, os ovos, já submetidos à aeração, foram inoculados na proporção de 1 ml de ovos por 100 ml de dieta, e as bandejas contendo dieta e ovos foram revestidas com tecido elástico e acondicionadas em salas climatizadas com temperatura de 24 ± 2 °C (Figura 3.4) por cerca de 10-12 dias ou até atingirem o fim do terceiro ínstar (Figura 3.5).

Figura 3.4 - Ovos de *Anastrepha fraterculus* inoculados sobre papel de filtro em dieta artificial

Figura 3.5 - Larvas de *Anastrepha fraterculus* no fim do terceiro ínstar em dieta artificial

O final do terceiro ínstar em *A. fraterculus* é caracterizado pela posição dos espiráculos das larvas, estrutura respiratória que está localizada na extremidade posterior do abdome. Quando a maioria das larvas está posicionada verticalmente com os espiráculos em direção à luz, indica que elas estão se alimentando e que ainda não completaram o desenvolvimento larval (Figura 3.6 a). Quando a maioria está caminhando horizontalmente sobre a dieta e seus espiráculos não estão em direção à luz (Figura 3.6 b), indica que elas pararam a alimentação e caminham para encontrar um ambiente para formação do pupário.

Foto: FAGGIONI, 2011

Figura 3.6 - Larvas de terceiro ínstar de *Anastrepha fraterculus* em dieta artificial; a) larvas com espiráculo em direção à luz ainda se alimentam; b) larvas caminhando sobre a dieta cessaram a alimentação e estão próximas de formarem pupários

Após este período, as larvas foram separadas da dieta por lavagem em água corrente e filtradas em peneira plástica (Figura 3.7 a), volumetradas (Figura 3.7 b) e colocadas em bandejas contendo vermiculita fina umedecida com benzoato de sódio a 0,03% para formação dos pupários (Figura 3.7 c).

Figura 3.7 – Coleta de larvas de *Anastrepha fraterculus*. a) separação da dieta artificial; b) larvas volumetradas; c) larvas em bandejas com vermiculita para formação dos pupários

As larvas em vermiculita foram mantidas em sala com temperatura entre 24 ± 2 °C, UR de 65 a 75% e ausência de luz para a formação dos pupários, que ocorre em 24 h. As pupas permaneceram em vermiculita por 8 a 10 dias, quando então foram separadas por peneiramento suave. Os pupário limpos foram mantidos no mesmo tipo de bandejas plásticas (35 x 25 x 7 cm) e na mesma sala até 24 h antes da emergência dos adultos, quando foram inseridos em novas gaiolas para dar continuidade à criação.

3.2.2.3 Controle de Qualidade da criação

Os parâmetros de controle de qualidade seguem o protocolo da FAO/IAEA/USDA (2003) e são avaliados para cada lote de coleta de ovos da seguinte forma:

- a) Volume de ovos coletado (ml): é medido diretamente em tubetes graduados.

- b) Viabilidade de ovos (taxa de eclosão): após o período de aeração, é retirada uma alíquota de aproximadamente 100 ovos, a qual é disposta sobre papel de filtro preto sobre pano esponja vegetal umedecida em placa de Petri. Contabiliza-se o número de ovos e o número de larvas. Quatro dias após, contabiliza-se o número de eclosões e calcula-se a taxa de eclosão da seguinte forma: $(n^{\circ} \text{ de larvas} + n^{\circ} \text{ de eclosões})/n^{\circ} \text{ de ovos da amostra}$.
- c) Volume de pupários coletado (ml): é medido diretamente em provetas graduadas.
- d) Viabilidade larval (taxa de viabilidade larval): sabendo que cada ml de pupários contém 30 pupários e cada ml de ovos contém 11700 ovos aproximadamente, a taxa de viabilidade larval é calculada da seguinte forma: $(\text{volume de pupários produzido} \times 30) / (\text{volume de ovos inoculado} \times 11700 \times \text{taxa de eclosão})$
- e) Peso de 100 pupários: uma amostra de 100 pupários é separada aleatoriamente e pesada em balança digital.
- f) Emergência (taxa de emergência) e razão sexual: uma amostra de 100 pupários é acondicionada em pote plástico com tampa perfurada. Três dias após a emergência dos adultos, contabiliza-se o número de machos e fêmeas emergidos. A quantidade de adultos semi-emergidos também deve ser observada. A taxa de emergência é calculada da seguinte forma: $n^{\circ} \text{ de adultos emergidos} / n^{\circ} \text{ de pupários}$; e a razão sexual dividindo-se o $n^{\circ} \text{ de fêmeas} / n^{\circ} \text{ de machos} + n^{\circ} \text{ de fêmeas}$.
- g) Rendimento ovo-pupa: considerando as informações do item d, o rendimento é calculado pela seguinte fórmula: $(\text{volume de pupários produzido} \times 30) / (\text{volume de ovos inoculado} \times 11700)$
- h) Duração do ciclo ovo-adulto (dias): contabiliza-se o número de dias decorridos da data de coleta dos ovos à emergência dos adultos.

Serão apresentados os parâmetros de qualidade referentes às gerações em condições artificiais de oviposição e desenvolvimento larval, ou seja, a partir da segunda geração, referentes ao período de novembro de 2005 a agosto de 2012. Para estimativa da variação dos parâmetros, foi calculado o erro padrão dos valores médios.

3.2.2.4 Redução do ágar na dieta de larvas

Visando reduzir o custo da criação de *A. fraterculus*, foi desenvolvido um experimento para verificar a possibilidade da redução da quantidade de ágar na dieta de larvas.

Foram testadas diferentes quantidades de ágar na dieta padrão de Salles (1992): 3,0; 3,2; 3,4; 3,6; 3,8; 4,0; 7,0 e 10,0 gramas por litro de dieta. Todos os procedimentos de inoculação de ovos, coleta de larvas, acondicionamento de pupas e controle de qualidade foram feitos conforme a metodologia descrita no item 3.2.2.3, exceto pela quantidade de inseto, e respectivas proporções, que não foram feitas em grande escala, mas sim em escala experimental. As dietas foram acondicionadas em potes plásticos de 500 ml, contendo 200 ml de dieta em cada pote. Em cada pote, foi inoculado 0,1 ml de ovos após aeração.

Cerca de 10 a 13 dias após a inoculação, as larvas no fim do terceiro ínstar foram retiradas da dieta e acondicionadas em vermiculita úmida para a formação dos pupários.

Foram avaliados os seguintes parâmetros conforme descritos no item anterior: peso de 100 pupários, rendimento ovo-pupa, emergência e duração do ciclo ovo-adulto. Foi também avaliada a habilidade de voo e a viabilidade larval dos insetos, sendo que para a habilidade de vôo de 50 a 100 pupários de cada tratamento (com 24 h antes da emergência) foram colocadas dentro de um anel de papel de aproximadamente 5 cm de diâmetro e 0,5 cm de altura, centrado em uma placa de Petri, no interior de um tubo preto (12 x 12 cm). A parte interna do tudo foi revestida com uma fina camada de talco neutro, para evitar a saída das moscas por meio do caminhar, com distância de aproximadamente 1 cm acima da parte inferior do tubo, para fornecer locais de repouso para moscas recém-emergidas. Os tubos foram dispostos sobre uma mesa, dentro de uma sala fechada. Após a emergência, as moscas foram estimuladas a voar mantendo-se as luzes acesas. A cada 4 horas as moscas que voaram foram aspiradas, para evitar que retornassem ou caíssem dentro dos tubos. Depois de 3 dias foi contabilizado o conteúdo dos tubos, isto é, moscas que não apresentaram habilidade para voar, semi-emergidas, deformadas e pupas não-emergidas (FAO/IAEA/USDA, 2003). A habilidade de voo foi expressa como taxa de voadores, calculada pela seguinte fórmula:
$$\text{Taxa de voadores} = \frac{\text{nº de pupários} - (\text{pupários não-emergidos} + \text{moscas semi-emergidas} + \text{não-voadores})}{\text{nº de pupários}}$$

A viabilidade larval foi avaliada inoculando-se 200 larvas recém-eclodidas em cada pote de dieta. Após a coleta das pupas, a viabilidade foi calculada dividindo-se o número de pupas coletada pelo número de larvas inoculadas.

O delineamento foi inteiramente ao acaso, com 10 repetições para cada tratamento, exceto a viabilidade larval que foi avaliada em 6 repetições.

A análise estatística foi feita submetendo os valores obtidos para emergência, habilidade de voo, rendimento ovo-pupa e viabilidade larval à modelos lineares generalizados (GLM) de regressão logística e ajuste para *over-dispersion*. As médias foram comparadas aos pares por teste t não paramétrico com ajuste do nível de significância pelo método de Bonferroni. As variáveis peso de 100 pupários e duração do ciclo foram submetidas à GLM de regressão linear e as médias comparadas pelo teste de Tukey HSD. Todas as análises foram feitas utilizando o pacote estatístico R versão 2.10.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009).

3.2.2.5 Substituição da fonte proteica na dieta de adultos

A maioria das biofábricas de moscas-das-frutas de todo o mundo, e o próprio laboratório de Radioentomologia do CENA/USP, onde foi desenvolvido o trabalho, utilizam como fonte proteica na dieta de adultos, levedura hidrolisada (*Saccharomyces cerevisiae*) importada dos EUA, implicando em alto custo na produção de insetos. Visando alternativas que reduzam o custo da produção de *A. fraterculus*, foram avaliados produtos nacionais, como fonte de proteína na dieta de adultos, que possam substituir o produto importado sem prejuízo dos parâmetros de qualidade.

Para o experimento, foram montadas três gaiolas de adultos conforme descritas no item 3.2.2.2, sendo que cada uma continha dieta com fontes proteicas diferentes. Os insetos encontravam-se na 30ª geração em condições artificiais quando o experimento foi conduzido. Foram avaliados três produtos: T1= levedura Bionis YE MF®, nacional (Biorigin); T2= levedura Bionis YE NS®, nacional (Biorigin) e T3= levedura YHE (Yeast Hydrolysate Enzymatic) importada (MP Biomedical LLC). Os tratamentos T1 e T2 constituem fontes proteicas alternativas ao produto importado (T3). Para todos os tratamentos, as dietas foram compostas de 3 partes de açúcar refinado: 1 parte de fonte proteica: 1 parte de gérmen de trigo cru, conforme descrito no item 3.2.2.2.

Oito dias após a emergência dos adultos, iniciou-se a coleta dos ovos. Esse procedimento, bem como os subsequentes até a emergência da progênie, foram os mesmos utilizados no item 3.2.2.2.

Foram avaliados: volume e viabilidade de ovos, viabilidade larval, peso dos pupários, rendimento ovo-pupa, emergência, razão sexual, duração do ciclo e habilidade de voo da progênie conforme metodologia descrita em 3.2.2.3 e 3.2.2.4. Foi também avaliada a longevidade sob estresse dos adultos confinando 100 pupários de cada repetição em potes plásticos transparentes de 500 ml, sem alimento e água. Após a emergência dos adultos, iniciou-se a contagem diária da mortalidade.

Todos os parâmetros, exceto a longevidade, foram analisados por ANOVA em esquema fatorial sem repetições, uma vez que os dados seguiram distribuição normal e não houve diferença significativa entre as variâncias. Cada dia de coleta de ovos constituiu um bloco, sendo cada um com 10 repetições. Nos casos de significância entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey HSD ($P < 0,05$). A longevidade sob estresse foi avaliada pelo estimador de Kaplan-Meier, sendo as curvas comparadas aos pares pelo teste de log-rank com correção de Bonferroni. Todas as análises foram feitas utilizando o pacote estatístico R versão 2.10.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009).

3.2.3 Resultados

3.2.3.1 Parâmetros de produção e qualidade de *Anastrepha fraterculus*

A partir da segunda geração, os insetos começaram a ser criados em condições artificiais. Os parâmetros apresentados (Tabela 3.1) são oriundos de 54 gerações com oviposição em substrato e dietas artificiais durante o período de novembro de 2005 a agosto de 2012, ou seja, 6 anos e 9 meses de criação artificial.

O volume diário de ovos coletado (Figura 3.8) variou bastante em função da quantidade de fêmeas adultas da geração anterior, ou seja, da quantidade de gaiolas de adultos em produção. Até a 25ª geração, todos os insetos produzidos iam para a colônia para aumentar a criação. Após a 25ª geração, a produção passou a ser dimensionada conforme a demanda por insetos. Dessa forma, o número de

gaiolas de adultos em produção foi reduzido ou aumentado conforme a demanda, e dessa forma a quantidade de ovos coletada variou muito.

Figura 3.8 - Volume médio diário de ovos de *Anastrepha fraterculus* e respectiva quantidade viável em condições artificiais durante 54 gerações. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$; 70-75% UR; 14 horas de fotofase

O volume médio de ovos produzido por geração (Figura 3.9) foi de 102 ml. O volume de pupas produzido (diário e total, Figuras 3.8 e 3.9, respectivamente) foi resultado da quantidade de ovos inoculados, que por sua vez, variou conforme a demanda de insetos. O volume médio foi de 260 ml/ dia e 6,3 l/ geração.

Figura 3.9 - Volume total de ovos de *Anastrepha fraterculus* coletado por geração, e respectiva quantidade viável, em condições artificiais durante 54 gerações. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$; 70-75% UR; 14 horas de fotofase

O volume de pupas produzido (diário e total, Figuras 3.10 e 3.11, respectivamente) foi resultado da quantidade de ovos inoculados, que por sua vez, variou conforme a demanda de insetos. O volume médio foi de 260 ml/ dia e 6,3 l/ geração.

Figura 3.10 - Volume médio diário de pupários de *Anastrepha fraterculus* produzido e respectiva quantidade de pupas viáveis em condições artificiais durante 54 gerações. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$; 70-75% UR; 14 horas de fotofase

Figura 3.11 - Volume total de pupários de *Anastrepha fraterculus* produzido por geração e respectiva quantidade viável em condições artificiais durante 54 gerações. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$; 70-75% UR; 14 horas de fotofase

Os parâmetros de produção são importantes no presente trabalho para fornecer uma ordem de grandeza da produção alcançada no CENA, pois os valores e oscilações observados foram resultados da demanda de insetos a ser produzido. O mais importante é atentar para os parâmetros de qualidade dessa produção, tais

quais: taxa de eclosão, rendimento ovo-pupa, viabilidade larval, peso de pupupários, emergência e razão sexual, que refletem a qualidade do inseto produzido e a eficiência da produção nas diferentes fases do inseto.

A taxa de eclosão apresenta dois aumentos significativos: um entre a 13^a e 18^a gerações e outro entre a 25^a e 30^a (Tabela 3.1). O primeiro aumento foi obtido pelo acréscimo do gérmen de trigo cru na dieta de adultos, e o segundo pela substituição da fonte proteica na dieta dos adultos. Somente a partir da 43^a geração, atingiu-se um valor médio acima de 75%.

A viabilidade larval também oscilou ao longo das gerações. Tal fato é passível de acontecer em criações artificiais em função das variações nos lotes, e até mesmo fornecedores, das matérias-primas da dieta de larvas. O brusco decréscimo observado entre a 25^a e 30^a gerações aconteceu devido a um lote de gérmen de trigo provavelmente com resíduo de defensivo agrícola, pois sua substituição resultou em desenvolvimento normal das larvas na dieta. Nas gerações seguintes (31^a a 36^a) observou-se uma melhora discreta no parâmetro, e a partir da 37^a atingem-se novamente valores próximos aos melhores obtidos ao longo do período. Entretanto, o valor médio de 0,29 foi muito baixo e deve ser melhorado. O peso dos pupário foi estável ao longo das gerações e a taxa de emergência chegou a valores próximos de 0,9.

O rendimento ovo-pupa foi muito baixo, somente 0,17 dos embriões chegaram à fase de pupa. Contudo, valores acima de 0,4 podem ser alcançados (JALDO; GRAMAJO; WILLINK, 2001; VERA et al., 2007).

Nessas condições de criação, o ciclo de ovo a adulto durou de 28 a 31 dias, com média de 30 dias. A variação no ciclo foi de somente 3 dias durante todo o período de criação.

Tabela 3.1 - Parâmetros médios ($\pm$ EP) de produção e qualidade de *Anastrepha fraterculus* produzida em condições artificiais. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$; 70-75% UR; 14 horas de fotofase

Gerações	Volume diário de ovos (ml)	Taxa de eclosão	Taxa de viabilidade larval	Volume diário de pupas (ml)	Peso de 100 pupas (g)	Taxa de emergência	Razão sexual	Rendimento ovo-pupa	Duração do ciclo ovo-adulto (dias)
2^a a 6^a(¹)	0,04 $\pm$ 0,00	0,28 $\pm$ 0,01	0,45 $\pm$ 0,04	10,04 $\pm$ 2,72	...	0,51 $\pm$ 0,04	0,48 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,01	28,45 $\pm$ 0,54
7^a a 12^a	0,42 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,04	62,19 $\pm$ 7,95	...	0,70 $\pm$ 0,03	0,48 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,01	29,23 $\pm$ 0,40
13^a a 18^a	4,58 $\pm$ 0,61	0,35 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,03	216,22 $\pm$ 39,95	...	0,87 $\pm$ 0,02	0,51 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	28,65 $\pm$ 0,34
19^a a 24^a	5,62 $\pm$ 0,23	0,49 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,02	291,71 $\pm$ 16,36	1,39 $\pm$ 0,02	0,85 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01	30,75 $\pm$ 0,18
25^a a 30^a	5,61 $\pm$ 0,22	0,72 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01	208,32 $\pm$ 11,14	1,47 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,01	0,55 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,01	30,65 $\pm$ 0,15
31^a a 36^a	6,82 $\pm$ 0,23	0,73 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,01	397,11 $\pm$ 11,37	1,44 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,00	0,52 $\pm$ 0,00	0,16 $\pm$ 0,00	30,52 $\pm$ 0,08
37^a a 42^a	3,84 $\pm$ 0,12	0,72 $\pm$ 0,01	0,38 $\pm$ 0,01	405,68 $\pm$ 14,18	1,35 $\pm$ 0,01	0,86 $\pm$ 0,00	0,54 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 0,01	28,43 $\pm$ 0,22
43^a a 48^a	4,04 $\pm$ 0,15	0,76 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,01	377,26 $\pm$ 12,87	1,45 $\pm$ 0,01	0,87 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,00	0,27 $\pm$ 0,01	29,66 $\pm$ 0,16
49^a a 54^a	5,43 $\pm$ 0,20	0,80 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,01	454,60 $\pm$ 26,24	1,43 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,01	0,55 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,01	30,61 $\pm$ 0,17
Média(²)	5,03 $\pm$ 0,1	0,64 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,01	317,55 $\pm$ 6,48	1,43 $\pm$ 0,004	0,85 $\pm$ 0,003	0,53 $\pm$ 0,002	0,17 $\pm$ 0,003	30,04 $\pm$ 0,07

Nota: ... dado numérico não disponível

(¹) fase de domesticação

(²) exclui fase de domesticação. N=1076 lotes (coletas de ovos)

3.2.3.2 Redução do ágar na dieta de larvas

Dentre as quantidades de ágar avaliadas, 3,4 g por litro de dieta foi a que apresentou os melhores valores em todos os parâmetros avaliados (Tabela 3.2). A redução de 10 para 3,4 g melhorou o peso das pupas ($F_{(7, 72)} = 8,96$; $P < 0,001$), habilidade de voo ($F_{(7, 72)} = 18,09$; $P < 0,001$), duração do ciclo ($F_{(7, 72)} = 3,89$; $P = 0,001$) e rendimento ovo-pupa ($F_{(7, 72)} = 18,82$, $P < 0,001$), ou seja, a qualidade dos insetos e o rendimento da produção. A redução do ágar na dieta não influenciou a taxa de emergência e nem a viabilidade larval ($F_{(7, 72)} = 0,66$; $P = 0,13$ e $F_{(7, 38)} = 0,76$, $P = 0,62$, respectivamente).

Tabela 3.2 – Parâmetros de qualidade de *Anastrepha fraterculus* (Média±EP) quando as larvas foram criadas em dieta artificial com diferentes concentrações de ágar. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$; 70-75% UR; 14 horas de fotofase

Quantidade de ágar (g/ l dieta)	Peso de 100 pupas (g)	Taxa de emergência	Taxa de voadores	Ciclo ovo-adulto (dias)	Taxa de rendimento ovo-pupa	Taxa de viabilidade larval ⁽¹⁾
3,0	1,53±0,03 ab	0,79±0,02	0,52±0,03 de	27,6±0,16 a	0,14±0,02 f	0,77±0,04
3,2	1,55±0,01 ab	0,79±0,02	0,64±0,01 bc	27,4±0,22 a	0,39±0,04 cde	0,80±0,03
3,4	1,61±0,01 a	0,85±0,01	0,74±0,02 a	27,2±0,33 a	0,63±0,02 a	0,83±0,02
3,6	1,61±0,01 a	0,82±0,02	0,69±0,02 ab	27,1±0,38 a	0,53±0,02 b	0,82±0,05
3,8	1,59±0,02 a	0,80±0,02	0,58±0,02 cd	27,5±0,17 a	0,28±0,05 ef	0,84±0,03
4,0	1,52±0,02 b	0,79±0,02	0,57±0,03 cd	27,3±0,30 a	0,32±0,05 de	0,79±0,04
7,0	1,48±0,02 b	0,80±0,02	0,46±0,02 e	25,9±0,23 b	0,43±0,03 bcd	0,85±0,03
10,0	1,53±0,01 ab	0,84±0,01	0,55±0,02 de	27,3±0,30 a	0,48±0,04 bc	0,81±0,01

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ($P < 0,01$)

⁽¹⁾ Todos os parâmetros foram avaliados em n=10, exceto a viabilidade larval que teve n=6

3.2.3.3 Substituição da fonte proteica na dieta de adultos

A qualidade dos insetos produzidos, substituindo-se a proteína importada pelos produtos nacionais, manteve-se a mesma com melhorias em alguns parâmetros de qualidade, como produção de ovos ($F_{(2,18)} = 3,78$; $P = 0,04$), viabilidade

larval ($F_{(2,18)}=0,77$; $P=0,48$), número de adultos voadores ($F_{(2,18)}=4,00$; $P=0,04$) (Tabela 3.3) e longevidade sob estresse ($\chi^2_{(2,29)}=980$, $P<0.0001$) (Figura 3.15).

Tabela 3.3 – Efeito de diferentes leveduras na dieta artificial para adultos nos parâmetros biológicos de *Anastrepha fraterculus*. Média $\pm$ EP (n). Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$; 70-75% UR; 14 horas de fotofase

Parâmetros	Tratamentos ⁽¹⁾			P
	T1	T2	T3	
Volume de ovos (ml)	1,25 $\pm$ 0,13 (10) a	1,08 $\pm$ 0,08 (10) ab	1,06 $\pm$ 0,12 (10) b	0,0426*
Taxa de eclosão	71,35 $\pm$ 2,14 (10) a	71,65 $\pm$ 2,32 (10) a	68,21 $\pm$ 1,97 (10) a	0,4792
Taxa de viabilidade larval	65,17 $\pm$ 6,61 (6) a	66,33 $\pm$ 5,56 (6) a	51,67 $\pm$ 7,25 (6) b	0,0037*
Peso de 100 pupários (g)	1,58 $\pm$ 0,04 (10) a	1,59 $\pm$ 0,05 (10) a	1,60 $\pm$ 0,05 (10) a	0,7365
Taxa de rendimento ovo-pupa	29,32 $\pm$ 3,50 (10) a	26,67 $\pm$ 4,92 (10) a	26,97 $\pm$ 5,15 (10) a	0,7014
Taxa de emergência	90,30 $\pm$ 1,64 (10) a	90,08 $\pm$ 1,61 (10) a	87,30 $\pm$ 2,27 (10) a	0,2559
Taxa de voadores	87,70 $\pm$ 1,43 (10) a	87,10 $\pm$ 1,68 (10) a	81,60 $\pm$ 2,42 (10) b	0,0364*
Razão sexual	0,35 $\pm$ 0,02 (10) a	0,37 $\pm$ 0,02 (10) a	0,40 $\pm$ 0,01 (10) a	0,1007
Ciclo ovo-adulto (dias)	28,90 $\pm$ 0,48 (10) a	29,00 $\pm$ 0,44 (10) a	29,10 $\pm$ 0,43 (10) a	0,3874

¹ T1= levedura Bionis YE MF[®] (Biorigin); T2= levedura Bionis YE NS[®] (Biorigin) e T3= levedura importada (MP Biomedical LLC).

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ($P>0.05$).

3.2.4 Discussão

As gaiolas de adultos foram mantidas em produção por 15 dias, resultando em 13-15 coletas de ovos, pois após esse período a produção decai significativamente (VERA et al., 2007). Caso seja necessário aumentar a produção, deve-se aumentar o número de fêmeas em produção. Entretanto, isso deve ser feito aumentando-se o número de gaiolas e não a quantidade de insetos na gaiola. O máximo de adultos que a gaiola descrita comporta é de 7650 indivíduos (300 ml de pupas), dos quais aproximadamente 4054 são fêmeas.

Os resultados demonstraram que a taxa de eclosão foi inferior ao obtido por Vera et al. (2007), que relataram valores superiores a 80%. A adição de germen de trigo cru na dieta dos adultos elevaram os valores da taxa de eclosão, entretanto esse parâmetro poderia ser melhorado ainda mais se evitando o ressecamento dos

ovos de forma mais efetiva. Vera et al. (2007) obtiveram valores altos controlando a umidade relativa na sala das gaiolas de adultos com um humidificador. Em criação massal, o controle de umidade dessa forma torna-se inviável, portanto alternativas que conservem a umidade no painel de oviposição tornam-se mais interessantes, como o uso do gel fuceleron® (Burtonite 44, Tic Gums; Inc. Madison, U.S.A.) no México para criação massal de *Anastrepha* spp. (FLORES; HERNANDÉZ; TOLEDO, 2012). Durante as 48 horas de aeração dos ovos ocorre o desenvolvimento embrionário e, no momento da semeadura em dieta, as larvas estão prestes a eclodir ou recém-eclodidas, reduzindo dois dias de degradação física e microbiana da dieta.

O peso dos pupário foi acima do obtido por Vera et al. (2007). A FAO/IAEA/USDA (2003) não especifica valores de referência para *A. fraterculus*, entretanto tanto os valores de peso como de emergência foram muito próximos aos recomendados para *A. obliqua* e *A. suspensa*. A razão sexual também se manteve relativamente estável com média de 53% de fêmeas, conforme o padrão da FAO/IAEA/USDA (2003).

A viabilidade larval ficou abaixo do obtido por Vera et al. (2007), que obtiveram valores de até 66%. Contudo, melhorias na estrutura e no manuseio da dieta poderiam aumentar os valores obtidos no presente trabalho. A principal diferença entre estes trabalhos deveu-se à forma de coleta das larvas. Vera et al. (2007) colocaram as bandejas com dieta sobre areia esterilizada, e as larvas ao atingirem o terceiro ínstar saíram da bandeja caminhando. Dessa forma, de uma única bandeja são feitas coletas em dias diferentes. No CENA, as larvas são retiradas da dieta por peneiramento quando a maioria das larvas interrompe a alimentação. Assim, é feita só uma coleta de larvas por bandeja, e como nem todas atingiram o terceiro ínstar, a quantidade de pupas recuperada é menor, afetando diretamente a viabilidade larval e o rendimento ovo-pupa. Entretanto, esse sistema de coleta de larvas favorece a homogeneização da criação e parece selecionar indivíduos mais vigorosos, pois o peso de pupários e taxa de emergência foram melhores que de Vera et al. (2007).

O rendimento ovo-pupa está bem abaixo do obtido por Vera et al. (2007), que atingiram rendimento maior que 50% em aproximadamente dois anos de criação artificial, enquanto no presente trabalho tais valores não foram obtidos em 54 gerações. Assim como para a viabilidade larval, a forma como as larvas são

coletadas nos dois trabalhos justifica tal diferença no rendimento ovo-pupa. Alguns indivíduos foram perdidos na fase de ovo, entretanto o problema de baixo rendimento na produção ocorreu na fase de larva.

Coletas de ovos em intervalos menores seriam uma ótima alternativa para complementar a presente metodologia de coleta de larvas, pois homogeneizando o desenvolvimento larvário aumentar-se-ia o rendimento da produção. Intervalos de 8 horas entre as coletas seriam interessantes, pois coincidem com a troca de turno dos funcionários de uma biofábrica, que funciona 24 horas.

Comparando ambas as metodologias de criação, pode-se dizer que a eficiência do sistema adotado por Vera et al. (2007) foi maior, enquanto a qualidade dos insetos produzidos no Brasil é melhor.

A redução da quantidade de ágar na dieta das larvas não favoreceu a viabilidade larval, entretanto o desenvolvimento do inseto foi melhor em dietas com baixas quantidades de ágar (3,2 a 3,8 g), evidenciando que a quantidade de ágar pode ser reduzida. Dentre as menores quantidades, a que apresentou melhor rendimento ovo-pupa foi a de 3,4g, implicando em maior rendimento de produção.

Apesar de o elemento ágar ter efeito geleificante e não nutricional, aparentemente ele proporcionou para o inseto estímulos que promoveram sua alimentação. O excesso ou falta do ágar pode interferir na ingestão dos nutrientes presentes na dieta, afetando a nutrição do inseto e consequentemente a qualidade do mesmo. Por exemplo, a metionina além de ingerida, pode ser sintetizada a partir da cistina, que por sua vez é precursora da síntese do bursicônio, responsável pela esclerotização do tegumento e expansão das asas dos insetos (DEWEY et al., 2004; LUO et al., 2005). Portanto, baixa ingestão de nutrientes essenciais, como os aminoácidos, pode influenciar diretamente a fisiologia do inseto. A dieta que resultou no menor ciclo também resultou em pupas de baixo peso e menos adultos voadores, mostrando que a dificuldade em se alimentar no meio pode levar o inseto a mudar da fase de larva para pupa antes de ter atingido um peso adequado. Além de melhorar a eficiência da produção, a redução do ágar por si só implicou em redução de custo. Utilizando 3,4 g de ágar/ litro de dieta tem-se uma redução de 66% no consumo de ágar. Dez litros da dieta padrão de Salles (1992) teve um custo de R\$ 142,80 com ingredientes. Na dieta modificada, contendo 3,4 g de ágar, o custo foi de R\$ 76,80, ou seja, a redução do ágar implicou em redução de 46% nos gastos com ingredientes.

A substituição da fonte de proteína importada na dieta de adultos por produtos nacionais melhorou a produção de ovos e a qualidade dos insetos produzidos. A principal diferença entre os aminogramas das diferentes fontes proteicas utilizadas nas dietas de adultos foi que a levedura importada não contém cistina (Anexo A). Cistina é um aminoácido não-essencial para a maioria dos insetos, é composto por duas moléculas de cisteína ligadas por ponte dissulfídica e consiste em uma importante fonte de grupos –SH em animais (GILMOUR, 1961). Muitos organismos, incluindo os insetos, podem sintetizar cisteína a partir da metionina e, por isso, geralmente ela não é necessária na dieta quando a mesma contém metionina (GILMOUR, 1961). Entretanto, a quantidade necessária de metionina para o desenvolvimento dos insetos pode ser garantida com o fornecimento de cisteína, pois a via sintética da cisteína a partir da metionina é reversível nos insetos (DADD, 1985).

Uma vez que a dieta que resultou em menor viabilidade larval e menor número de adultos voadores foi aquela com levedura hidrolisada que não contém cistina (Anexo A), possivelmente esse aminoácido tem um efeito importante, porém não restritivo, nos processos fisiológicos essenciais ao desenvolvimento de *A. fraterculus*.

A disponibilidade de cistina para as fêmeas durante a formação dos ovos pode ter resultado em larvas neonatas com maior capacidade de desenvolvimento larval, pois esse aminoácido influencia o processo de ecdise (GILMOUR, 1961). Além disso, a cistina disponível no embrião para o desenvolvimento larval pode ser poupada pelo fornecimento de metionina na dieta das larvas, resultando em pupas com maior disponibilidade de cistina e, conseqüentemente, maior emergência de voadores, conforme observado, pois a cistina está presente na constituição do bursicônio que é o hormônio responsável pela esclerotização da cutícula e expansão das asas nos insetos (DEWEY et al., 2004; LUO et al., 2005).

As dietas artificiais representam um dos principais custos na produção massal de insetos (PARKER, 2005). Utilizando proteína importada para produzir 1 milhão de adultos de *A. fraterculus* no CENA-USP, o custo da dieta foi de R\$ 166,96 (US\$ 82.01), enquanto com o uso da levedura nacional esse custo seria de R\$ 17,14 (US\$ 8.42), representando uma economia de 89,73% no custo da dieta de adultos e até 31,14% no custo geral com dietas (de adultos e larvas).

3.3 Conclusões

A metodologia de criação artificial de *A. fraterculus* proposta permite criar grandes quantidades do inseto com alta qualidade, usando ingredientes nacionais na composição das dietas e baixo consumo de ágar. Pequenas modificações podem ser feitas para melhorar o rendimento do processo de produção.

Referências

- ALLINGHI, A.; CALCAGNO, G.; PETTIT-MARTY, N.; CENDRA, P.G.; SEGURA, D.; VERA, T.; CLADERA, J.; GRAMAJÓ, C.; WILLINK, E.; VILARD, J.C. Compatibility and competitiveness of a laboratory strain of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) after irradiation treatment. **Florida Entomologist**, Lanham, v. 90, n. 1, p. 27-32, 2007.
- ALUJA, M. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) research in Latin America: myths, realities and dreams. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 28, p. 565-594, 1999.
- ARAÚJO, E.L.; ZUCCHI, R.A. Medidas do acúleo na caracterização de cinco espécies de *Anastrepha* do grupo *fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, p. 329-337, 2006.
- CENDRA, P.G.; SEGURA, D.; ALLINGHI, A.; CLADERA, J.; VILARDI, J. Comparison of longevity between a laboratory strain and a natural population of *Anastrepha fraterculus* under field cage conditions. **Florida Entomologist**, Lanham, v. 90, n. 1, p. 147-153, 2007.
- DA SILVA, N.M.; SILVERA NETO, S.; ZUCCHI, R.A. The natural host plant of *Anastrepha* in the state of Amazonas, Brazil, In: McPHERAN, B.A.; STICK, G. (Ed.). **Fruit fly pest: a world assessment of their biology and management**. Boca Raton: St Lucie Press, 1996. p. 353- 357.
- DADD, R.H. Nutritional: organisms. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 4, p. 313-390.
- DE LIMA, I.S.; HOWSE, P.E.; SALLES, L.A.B. Reproductive behavior of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) laboratory and field studies. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 19, p. 271–277, 1994.
- DEWEY, E.M.; MCNABB, S.L.; EWER, J.; KUO, G.R.; TAKANISHI, C.L.; TRUMAN, J.W.; HONEGGER, H.W. Identification of the gene encoding bursicon, an insect neuropeptide responsible for cuticle sclerotization and wing spreading. **Current Biology**, London, v. 14, p. 1208-1213, 2004.

FAGGIONI, K.M. Diferentes concentrações de ágar na dieta artificial de Salles (1992), para larvas de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae). 2011. 38p. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, 2011.

FAO/IAEA/USDA. **Manual for product quality control and shipping procedures for sterile mass-reared tephritid fruit flies**. Version 5.0. Vienna: International Atomic Energy Agency, 2003. 85 p.

FLORES, H.S.; HERNÁNDEZ, E.; TOLEDO, J. Desarrollo de um sistema de cria artificial para *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Acta Zoologica Mexicana**, Cidade do México, v. 28, p. 321-340, 2012.

GILMOUR, D. **The biochemistry of insects**. 2nd ed. London: Academic Press, 1961. 343 p.

GUTIÉRREZ-RUELAS, J.M.; SANTIAGO, G. Situación actual de la campaña nacional contra moscas de la fruta en México. In: MEETING OF THE WORKING GROUP ON FRUIT FLIES OF THE WESTERN HEMISPHERE, 7., 2008, Mazatlán. **Proceedings...** Mazatlán: Meeting Publication, 2008. p. 11-13

INFANTE-MALACHIAS, M. E.; SHOJI, A.H.; SELIVON, D. Phylogeny of *Anastrepha fraterculus* species group (Diptera: Tephritidae) based upon 16S and COI mitochondrial DNA sequences. In: MEETING OF THE WORKING GROUP ON FRUIT FLIES OF THE WESTERN HEMISPHERE, 4., 2001, Mendoza. **Proceedings...** Mendoza:ISCAMEN 2001. p. 70-71.

JALDO, H.E.; GRAMAJO, M.C.; WILLINK, E. Mass-rearing of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae): A preliminary strategy. **Florida Entomologist**, Lanham, v. 84, n. 4, p. 716-718, 2001.

JOACHIM-BRAVO, I.S.; MAGALHÃES, T.C.; SILVA NETO, A.M.; GUIMARÃES, A.L.; NASCIMENTO, A. Longevity and fecundity of four species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, p. 543-549, 2003.

KNIPLING, E.F. **Principles of Insect parasitism analyzed from new perspectives: practical implications for regulating insect populations by biological means**. Washington: USDAgriculture, 1992. 337 p. (Agriculture Handbook, 639).

LUO, C.W.; DEWEY, E.M.; SUDO, S.; EWER, J.; HSU, S.Y.; HONEGGER, H.W.; HSUEH, A.J.W. Bursicon, the insect cuticle-hardening hormone, is a heterodimeric cystine knot protein that activates G protein-coupled receptor LGR2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 102, p. 2820-2825, 2005.

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

MONTOYA, P.; LIEDO, P.; BENREY, B.; CANCINO, J.; BARRERA, J.F.; SIVINSKI, J.; ALUJA, M. Biological control of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in mango orchards through augmentative releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmed) (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, San Diego, v. 18, n. 3, p. 216-224, 2000.

ORTIZ, G. The South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Wied.): advances in artificial rearing, taxonomic status and biological studies. In: WORKSHOP ORGANIZED BY THE JOINT FAO/IAEA DIVISION OF NUCLEAR TECHNIQUES IN FOOD AND AGRICULTURE, 1999, Viña del Mar. **Proceedings...** Viña del Mar: IAEA-TECDOC-1064, 1999. p. 1.2.

OVRUSKI, S.M.; BEZDJIAN, L.P.; VA NIEUWENHOVE, G.A.; ALBOROZ-MEDINA, P.; SCHLISERMAN, P. Host preference by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) reared on larvae of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, Lanham, v. 94, n. 2, p. 195-200, 2011.

PARKER, A.G. Mass-rearing for sterile insect release. In: DYCK, V.A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A.S. (Ed.). **Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 209-232.

PARRA, J.R.P. O controle biológico e o manejo de pragas: passado, presente e futuro, In: GUEDES, J.V.C.; COSTA, I.D.; CASTIGLIONI, E. **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: UFSM, CCR, DFS, 2000. p. 59-69.

_____. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. 6. ed. Piracicaba: FEALQ, 2001. 134 p.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2009. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 20 dez. 2012.

SALLES, L.A.B. Metodologia de criação de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) em dieta artificial em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 479-486, 1992.

_____. **Bioecologia e controle da moscas das frutas sul-americanas**. Pelotas: EMBRAPA, CPACT, 1995. 58 p.

SELIVON, D.; PERONDINI, A.L.P. Eggshell morphology in two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 91, p. 473-478, 1998.

SELIVON, D.; MORGANTE, J.S.; PERONDINI, A.L.P. Egg size, yolk mass extrusion and hatching behavior in two cryptic species of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera, Tephritidae). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, p. 587-594, 1997.

SELIVON, D.; PERONDINI, A.L.P.; MORGANTE, J.S. A genetic-morphological characterization of two cryptic species of *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 98, p. 367-381, 2005.

SELIVON, D.; PERONDINI, A.L.P.; VRETOS, C.; FONTES, L. Characterization of cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex. In: MEETING OF THE WORKING GROUP ON FRUIT FLIES OF THE WESTERN HEMISPHERE, 4., 2001, Mendoza. **Proceedings...** Mendoza: ISCAMEN 2001. p. 30-31

SIVINSKI, J.; CALKINS, C.O.; BARANOWSKI, R.; HARRIS, D.; BRAMBILA, J.; DIAZ, J.; BURNS, R.E.; HOLLER, T.; DODSON, G. Suppression of Caribbean fruit fly (*Anastrepha suspensa* (Loew) Diptera: Tephritidae) population through releases of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, San Diego, v. 6, p. 177-185, 1996.

SOLFERINI, V.N.; MORGANTE, J.S. Karyotype study of eight species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). **Caryologia**, Firenze, v. 40, p. 229-241, 1987.

STECK, G.J.; SHEPPARD, W.S. Mitochondrial DNA variation in *Anastrepha fraterculus*. In: ALUJA, M.; LIEDO, P. **Fruit flies: biology and management**. New York: Springer, 1993. p. 9-14.

STECK, G.J. Taxonomic status of *Anastrepha fraterculus*, In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, **The South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Wied.)**; **advances in artificial rearing, taxonomic status and biological studies**, Vienna: FAO; IAEA, 1999. p. 13-20. (TECDOC, 1064).

SUGAYAMA, R.L.; BRANCO, E.S.; MALAVASI, A.; KOVALESKI, A.; NORA, I. Oviposition behavior and preference of *Anastrepha fraterculus* in apple and dial pattern of activity in an apple orchard in Brazil. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 83, p. 239-245, 1998.

URAMOTO, K.; ZUCCHI, R.A. Taxonomia de espécies de *Anastrepha*. In: CURSO INTERNACIONAL DE CAPACITAÇÃO EM MOSCAS-DAS-FRUTAS, 5., 2009, Juazeiro. Juazeiro: Biofábrica Moscamed Brasil, 2009. p. 11.

VERA, T.; ABRAHAM, S.; OVIEDO, A.; WILLINK, E. Demographic and quality parameters of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) maintained under artificial rearing. **Florida Entomologist**, Lanham, v. 90, n.1, p. 53-57, 2007.

ZART, M.; FERNANDES, O.A.; BOTTON, M. Biology and fertility life table of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* on grape. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 63, n. 2, p. 237-242, 2010.

4 PRODUÇÃO EM GRANDE ESCALA DO PARASITOIDE *Diachasmimorpha longicaudata* EM LARVAS HOSPEDEIRAS DE *Anastrepha fraterculus* EM COMPARAÇÃO COM *Ceratitidis capitata* tsl-Viena 8

Resumo

No mundo todo, o manejo integrado de moscas-das-frutas é feito com associação do controle biológico aplicado, com liberações inundativas de parasitoides, e técnica do inseto estéril. Além da boa eficiência no campo, a associação dessas técnicas é também favorecida pelo fato de ambos os organismos, insetos estéreis e parasitoides, poderem ser produzidos massalmente na mesma fábrica com menor custo. O presente trabalho foi desenvolvido para avaliar a produção e qualidade do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* em larvas irradiadas de *A. fraterculus* de forma comparativa à produção em *C. capitata* linhagem tsl-Viena 8. Dados de produção e qualidade de 51 gerações do parasitoide são apresentados, e mostram altas taxas de parasitismo e emergência, com grande proporção de fêmeas. A irradiação das larvas de *A. fraterculus* com 40 Gy de radiação gama antes do parasitismo favorece a emergência do parasitoide. Larvas de terceiro ínstar de *A. fraterculus* são melhores hospedeiros que larvas de *C. capitata* para produção em grande escala do parasitoide *D. longicaudata*, pois promovem maior emergência do parasitoide, maior quantidade e melhor qualidade de fêmeas.

Palavras-chave: Produção de insetos; Irradiação; Controle biológico; Braconidae; Moscas-das-frutas

Abstract

The integrated management of fruit flies is done worldwide with the association of augmentative biological control with parasitoids and the sterile insect technique. Beyond the efficiency in the field, the joint of both techniques is also favored by the easy production of organisms, both parasitoids and sterile insects, in the same facility with low costs. The present work consisted in evaluate the production and quality parameters of the parasitoid *D. longicaudata* reared on *A. fraterculus* irradiated larvae comparing with *C. capitata* tsl-Viena 8 strain as host. Data of 51 consecutive generations of the parasitoid are presented and show high parasitism, emergence and female biased sex ration. Larvae irradiation with 40 Gy of gamma radiation before parasitism increased the emergency. *A. fraterculus* third instar larvae are better hosts than *C. capitata* for large scale production of the parasitoid *D. longicaudata*, furthering greater emergency, higher amount and quality of females.

Keywords: Insect production; Irradiation; Biological control; Braconidae; Fruit flies

4.1 Introdução

No mundo todo, o controle biológico de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritide) baseia-se fortemente em liberações inundativas de parasitoides, os quais são produzidos em grande escala e liberados rotineiramente para prontamente agirem sobre a praga-alvo. Na prática, o Controle Biológico Aplicado (CBA) de moscas-das-frutas atua como uma ferramenta, dentre outras, que compõe as estratégias dos Programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), e visam à produção de frutas de alta qualidade que atendam às exigências fitossanitárias e de segurança alimentar do comércio internacional.

Diachasmimorpha longicaudata (Ashmed) (Hymenoptera: Braconidae) é uma das mais importantes espécies utilizadas no controle biológico de moscas-das-frutas no mundo. Parasita larvas de terceiro ínstar da família Tephritidae e é originário do sudeste asiático (região indo-australiana), onde ataca larvas de *Bactrocera* spp. (WHITE; ELSON-HARRIS, 1992). Essa espécie tornou-se importante como inimigo natural do gênero *Anastrepha* spp. (CANCINO et al., 2009a) e muito conhecida no mundo todo por sua especificidade em hospedeiros da família Tephritidae. Atualmente, é liberado massalmente em vários países para o controle biológico de moscas-das-frutas (SIVINSKI et al., 1996).

Em um programa de MIP, todos os métodos de controle devem ser utilizados racionalmente, e uma proposta bastante interessante para moscas-das-frutas é a associação de inimigos naturais e Técnica do Inseto Estéril (TIE). Vários programas de MIP de moscas-das-frutas no mundo fazem essa associação (MESSING et al., 1993), o que é bom do ponto de vista de redução de custos de produção desses organismos, uma vez que a biofábrica pode ser explorada para produzir massalmente as moscas estéreis e os parasitoides, utilizando as moscas como hospedeiros para a criação do parasitoide.

A Técnica do Inseto Estéril (TIE) é a principal componente de muitos programas de manejo integrado de moscas-das-frutas em todo o mundo (KLASSEN; CURTIS, 2005), e consiste na liberação sistemática de grande número de insetos estéreis nas áreas agrícolas, onde os machos estéreis copulam com as fêmeas selvagens evitando sua reprodução (KNIPLING, 1955).

Dentre as espécies de *Anastrepha* spp. manejadas com sucesso pelo uso da TIE ou controle biológico aplicado, destacam-se *A. obliqua* e *A. ludens* no México (GUTIÉRREZ- RUELAS; SANTIAGO, 2008) e *A. suspensa* no EUA (SIVINSKI et al.,

1996). *Anastrepha fraterculus* segue a mesma tendência na Argentina (ALLINGHI et al., 2007; CENDRA et al., 2007; VERA et al., 2007; OVRUSKI et al., 2011). No Brasil, a espécie de *Anastrepha* de maior importância econômica é a *A. fraterculus*.

Visando à produção em grande escala de *D. longicaudata* para controle biológico, o presente trabalho avaliou a produção e qualidade do parasitoide em larvas irradiadas de *A. fraterculus* e *C. capitata* linhagem *tsl*-Viena 8 como hospedeiros.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Revisão Bibliográfica

O parasitoide *D. longicaudata* é um endoparasitoide de larvas de segundo e terceiro instares de várias espécies de Tephritidae (WHITE; ELSON-HARRIS, 1992; VAN NIEUWENHOVE; OVRUSKI, 2011). Parasita larvas em diferentes frutos hospedeiros e se desenvolve no interior do pupário da mosca (SIVINSKI; PIÑERO; ALUJA, 2000). A razão sexual da progênie é resultado de partenogênese arrenótoca e reprodução sexuada, sendo que ovos não-fecundados originam somente machos e os fecundados fêmeas (GODFRAY, 1994). O parasitoide possui quatro estágios de desenvolvimento, sendo que em *C. capitata* a fase de ovo dura 1,5 dias; larva de primeiro ínstar 1,5 dias; segundo ínstar 2,7 dias; terceiro ínstar 1,5 dias; pré-pupa 2,5 dias; pupa 3 dias e adulto farato 3 dias, totalizando 16 dias entre parasitismo e emergência de adultos (PALADINO; PAPESCHI; CLADERA, 2010). Segundo os mesmo autores, machos e fêmeas do parasitoide tem taxas de desenvolvimento diferente. Os machos emergem de 2-3 dias antes das fêmeas (BAUTISTA; HARRIS, 1997).

Originário do sudeste asiático (Indonésia, Filipinas e Malásia) (WHITE; ELSON-HARRIS, 1992), foi introduzido nos Estados Unidos primeiramente no Havaí (BESS; van der BOSCH; HARAMOTO, 1961) e posteriormente Florida e muitos países da América Latina para controle de *Anastrepha* spp. *C. capitata*, entre eles o Brasil em 1994 (CARVALHO; NASCIMENTO; MATRANGOLO, 2000).

Técnicas de criação que resultem em baixo custo de produção e em parasitoides de alta qualidade são sempre importantes e devem ser estimuladas (SIVINSKI et al., 1996). A irradiação das larvas antes da exposição ao parasitismo, por exemplo, podem simplificar os processos de criação, transporte e liberação

(HENDRICHS et al., 2009; SIVINSKI; SMITTLE, 1990) com maior segurança devido à ausência da praga, e sem malefícios aos parasitoides (CANCINO et al., 2009b).

As fêmeas do parasitoide preferem parasitar larvas de *A. fraterculus* à *C. capitata* (OVRUSKI et al., 2011), e também demonstram preferência por hospedeiros maiores dentro de uma mesma espécie de Tephritidae (MESSING et al., 1993; CANCINO et al., 2002; CANCINO; VILLALOBOS; de LA TORRE, 2002; LOPÉZ et al., 2009). Larvas hospedeiras de maior tamanho favorecem significativamente a longevidade do parasitoide sob estresse, velocidade das atividades e fecundidade das fêmeas, entretanto a emergência do parasitoide é significativamente maior em larvas de tamanho médio (LOPÉZ et al., 2009), possivelmente pelo maior superparasitismo que ocorre nas maiores larvas (MONTROYA et al., 2011).

O superparasitismo é comum em condições de laboratório e criação massal (MONTROYA et al., 2000b; GONZÁLEZ et al., 2007), mas somente um indivíduo dentro do pupário chega à fase adulta (MONTROYA et al., 2011), sendo nesses casos uma fêmea (WANG; MESSING, 2003; MONTROYA et al., 2011). González et al. (2007) viram que um nível moderado de parasitismo (até 6 cicatrizes de oviposição/pupário hospedeiro) é benéfico para a emergência do parasitoide e aumenta a proporção de fêmeas em criação massal. Larvas maiores são mais frequentemente superparasitadas (MONTROYA et al., 2011) e níveis de parasitismo maiores reduzem significativamente a emergência do parasitoide (MONTROYA et al., 2000b; GONZÁLEZ et al., 2007). A razão sexual da progênie também tem relação com o superparasitismo, que favorece uma maior proporção de fêmeas (MONTROYA et al., 2011).

Segundo Lawrence (1988), nessa espécie de parasitoide, a eliminação de larvas co-específicas pode ser por ataque físico ou supressão fisiológica (66% dos casos), entretanto Paladino; Papeschi; Cladera (2010) e Montoya et al. (2000b) não encontraram nenhum sinal de dano físico nas larvas intactas ou mortas no início do primeiro ínstar, sendo que somente uma larva encontrava-se em estágio avançado de primeiro ínstar ou segundo, e sugerem que a eliminação de co-específicos seja por supressão fisiológica, onde o nível de oxigênio ou compostos liberados pela larva maior no interior do hospedeiro não permitem o desenvolvimento das demais larvas (LAWRENCE, 1988; VINSON; HEGAZI, 1998), que são menores e morrem sempre antes de mudarem para o segundo ínstar, entre 24 e 36 horas após a eclosão (LAWRENCE, 1988).

4.2.2 Material e métodos

4.2.2.1 Dose de radiação gama em larvas de *A. fraterculus* para não emergência dos adultos e respectivo efeito na emergência e razão sexual do parasitoide *D. longicaudata*

A criação de *A. fraterculus* foi conduzida conforme metodologia descrita no item 3.2.2.2. Para determinar a melhor dose para irradiação das larvas hospedeiras que resultasse na não-emergência dos adultos, 10 ml de larvas de *A. fraterculus* no fim do terceiro ínstar foram irradiados nas seguintes doses: 0; 20; 30; 40; 50; 60 e 70 Gy (fonte Co⁶⁰, Gammabeam 650; 184,55-143,44 Gy/ hora) e acondicionados em copos plásticos (500 ml) com tampas perfuradas, contendo vermiculita para a formação dos pupários, onde permaneceram por 10 dias. De cada copo retirou-se uma amostra aleatória de 200 pupários e, após a emergência, foi contabilizado o número de insetos emergidos. O experimento foi repetido 5 vezes.

Para iniciar a criação do parasitoide em *A. fraterculus*, foram oferecidas aos parasitoides larvas irradiadas (segundo a melhor dose determinada conforme parágrafo anterior) e não irradiadas (controle). Portanto, o efeito dessa dose na emergência e razão sexual do parasitoide foi avaliado em todas as gerações entre os anos de 2008 a 2012, da primeira à 51ª. De cada lote de parasitismo, retirou-se uma amostra de 100 pupários para determinação dos parâmetros acima referidos.

4.2.2.2 Criação do parasitoide *D. longicaudata* em larvas de *A. fraterculus*

A criação do parasitoide em larvas de *A. fraterculus* no Laboratório de Radioentomologia do CENA/USP teve início em março de 2008, com parasitoides oriundos da própria criação em *C. capitata* tsl-Viena 8 mantida no CENA/USP.

Os adultos do parasitoide foram mantidos em gaiolas (50 x 50 x 30 cm) com arestas de alumínio, duas laterais e o fundo fixos de acrílico, duas laterais e o topo removíveis de tela, com livre acesso a uma “massa” feita de lenço de papel picado e mel para alimentação. As gaiolas foram dispostas em estantes de alumínio com rodas, de forma a ficarem 3 gaiolas sobrepostas com espaço suficiente entre elas para colocar as unidades de parasitismo e para a entrada de luz, e mantidas em sala climatizada (26 ± 2°C; 70-80% de UR e fotofase de 14 horas com aproximadamente 12000 lux).

O parasitismo teve início no quinto dia de idade das fêmeas, sendo feito diariamente até o 15º dia. Para isso, larvas nuas (sem dieta) de *A. fraterculus*, no fim do terceiro ínstar, irradiadas com 40 Gy foram expostas ao parasitoide em unidades de parasitismo (UPs), as quais consistem em anéis de tubo de PVC de 10 cm de diâmetro com 1 cm de altura. O fundo da UP foi confeccionado em tecido voal colado no anel, e a tampa removível e feita de PVC. Cada UP acomodou de 20 a 25 ml de larvas, correspondendo acerca de 600-800 indivíduos. As larvas foram acondicionadas, as unidades tampadas e colocadas externamente na parte superior das gaiolas de adultos do parasitoide, onde ficaram por 30 minutos à disposição das fêmeas para o parasitismo. Da mesma forma, foi também montada uma UP com larvas não-irradiadas para o controle de qualidade.

As UPs foram retiradas do topo das gaiolas, cuidadosamente para não danificar o ovipositor das fêmeas, as larvas foram retiradas das unidades de parasitismo e colocadas em bandejas contendo vermiculita esterilizada para a formação dos pupários, os quais em 10 dias foram peneirados e volumetrados.

As pupas foram acondicionadas em novas gaiolas para emergência dos adultos e início da geração seguinte do parasitoide. Cada gaiola descrita anteriormente comportou de 4000 a 5000 adultos, de 250-300 ml de pupários parasitados, e foi mantida em produção por 10 dias (do 5º ao 15º) ou menos, conforme necessário. Diariamente colocou-se 25 unidades de parasitismo em cada gaiola, na proporção de 20 larvas/ fêmea.

4.2.2.3 Controle de qualidade rotineiro e periódico da criação

De cada lote de parasitismo, foram retiradas amostras de 100 pupários irradiados e não-irradiados para controle de qualidade avaliando-se os seguintes parâmetros:

- Taxa de parasitismo: determinada pela amostra de larvas não-irradiadas parasitadas, e que consistiu na razão entre nº de parasitoides emergidos/ (nº de parasitoides + nº de moscas).
- Emergência do parasitoide: razão entre nº de parasitoides/ nº total de pupários.
- Razão sexual: nº de fêmeas/ nº machos + nº fêmeas.

Os parâmetros acima descritos foram avaliados rotineiramente, em todos os lotes de parasitismo, entretanto outros parâmetros de qualidade foram avaliados periodicamente, tais como:

- Habilidade de voo: 100 pupas parasitadas (com 24 h antes da emergência) foram colocadas dentro de um anel de papel de aproximadamente 5 cm de diâmetro e 0,5 cm de altura, centrado em uma placa de Petri, no interior de um tubo preto (12 x 12 cm). A parte interna do tubo foi revestida com uma fina camada de talco neutro, para evitar a saída dos insetos por meio do caminhar, com distância de aproximadamente 1 cm acima da parte inferior do tubo, para fornecer locais de repouso para parasitoides recém-emergidos. Os tubos foram dispostos sobre uma mesa, dentro de uma sala fechada. Após a emergência, os parasitoides foram estimulados a voar mantendo-se as luzes acesas. A cada 4 horas os insetos emergidos foram aspirados, para evitar que retornassem ou caíssem dentro dos tubos. Depois de 3 dias foi contabilizado o conteúdo dos tubos, isto é, parasitoides que não apresentaram habilidade para voar, semi-emergidos, deformados e pupas não-emergidas (FAO/IAEA/USDA, 2003). A habilidade de voo foi expressa como taxa de voadores, calculada pela seguinte fórmula: $\text{n}^\circ \text{ de pupas} - (\text{pupas não-emergidas} + \text{semi-emergidas} + \text{não-voadores}) / \text{n}^\circ \text{ de pupas}$;
- Longevidade sob estresse: confinou-se 10 machos e 10 fêmeas, separadamente, em potes plásticos transparentes de 500 ml, sem alimento e água. Após a emergência dos adultos, iniciou-se a contagem diária da mortalidade;
- Tamanho e peso dos parasitoides: o tamanho dos parasitoides, da cabeça à extremidade do abdome, e do ovipositor das fêmeas, foram medidos em estereomicroscópio com ocular micrométrica. O peso foi determinado utilizando balança semi-analítica.

4.2.2.4 Análise dos dados

A escolha da melhor dose para não-emergência de moscas foi determinada analisando o número de moscas emergidas dos tratamentos por modelos lineares generalizados de regressão logística e ajuste para *over-dispersion* (CRAWLEY, 2007).

Para avaliar o efeito da radiação das larvas antes do parasitismo na emergência e razão sexual do parasitóide, os dados do controle de qualidade da

criação da 1ª a 51ª geração foram submetidos à regressão logística utilizando modelos lineares generalizados (GLM) ajustados para *over-dispersion* (CRAWLEY, 2007).

Os parâmetros de produção e qualidade do parasitoide produzido em larvas irradiadas de *A. fraterculus* (quantidade de pupas parasitadas e parasitoides produzidos, taxa de parasitismo, taxa de emergência e razão sexual) foram oriundos de 51 gerações, e determinados conforme o item 4.2.2. A duração do ciclo, taxa de voadores e a longevidade sob estresse foram obtidos de 20 amostras de diferentes lotes da 25ª geração. O tamanho e peso dos parasitoides foi determinado de 20 indivíduos dessa mesma geração.

Para comparar a duração do ciclo, taxa de voadores, tamanho e peso dos parasitoides produzidos em larvas de *A. fraterculus* com os produzidos em *C. capitata* tsl-Viena 8³, aplicou-se GLM, sendo que para tamanho e peso o modelo foi de regressão linear, para duração do ciclo foi regressão log-linear com ajuste para *over-dispersion*, e para taxa de voadores foi regressão logística com ajuste para *over-dispersion*. A longevidade sob estresse foi avaliada pela estimativa de Kaplan-Meier e as curvas comparadas aos pares pelo teste de log-rank (CRAWLEY, 2007). Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o programa estatístico R, versão 2.15.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009).

4.2.3 Resultados

4.2.3.1 Dose de radiação gama em larvas de *A. fraterculus* para não emergência dos adultos e respectivo efeito na emergência e razão sexual do parasitoide *D. longicaudata*

Houve efeito da dose de radiação gama, aplicada em larvas de terceiro ínstar, na emergência de moscas ($F_{(5, 24)} = 220,15$; $P < 0,001$), sendo que a menor dose que inibiu completamente a emergência foi de 40 Gy (Figura 4.1).

³ Parâmetros de produção e qualidade de *D. longicaudata* criado em larvas de *C. capitata* tsl-Viena 8. Capítulo 2, item 2.2.3.2.

Figura 4.1 – Doses de radiação gama aplicadas em larvas de *Anastrepha fraterculus* para não emergência dos adultos

Analisando os dados de controle de qualidade de 51 gerações do parasitoide em larvas de *A. fraterculus*, constatou-se efeito positivo da radiação das larvas (40 Gy) na emergência do parasitoide ($F_{(5, 518)} = 198,71$; $P < 0,001$) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Taxa de emergência e razão sexual do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* criado em larvas de *Anastrepha fraterculus* irradiadas e não irradiadas. Média $\pm$ erro padrão (n)

larvas hospedeiras	emergência	razão sexual
irradiadas	0,56 $\pm$ 0,01 (260) a	0,67 $\pm$ 0,01 (260) a
não-irradiadas	0,35 $\pm$ 0,01 (260) b	0,69 $\pm$ 0,01 (258) a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F ($P > 0,01$).

4.2.3.2 Parâmetros de produção e qualidade do parasitoide *D. longicaudata* criado em larvas de *A. fraterculus* em comparação à criação em *C. capitata* tsl-Viena 8

Logo na sexta geração, chegou-se a produção de aproximadamente 19 mil parasitoides/dia e 131 mil parasitoides na geração, indicando a fácil, ou talvez inexistente período de adaptação à troca de hospedeiro (Figura 4.2). A maior quantidade de parasitoides produzido foi de 5,7 litros de pupas parasitadas, correspondendo a 94 mil parasitoides, sendo 21,5 mil parasitoides/ dia. A média foi

de $1,82 \pm 0,16$ litros e $66,21 \pm 6,48$ mil parasitoides/ geração, sendo $12,96 \pm 0,5$ mil por dia.

Figura 4.2 - Produção de pupas de *Anastrepha fraterculus* parasitadas e adultos de *Diachasmimorpha longicaudata* ao longo de 51 gerações. Temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$; 70-80% UR; 14 horas de fotofase

A quantidade de parasitoides produzidos em *A. fraterculus* foi menor que a produzida em *C. capitata* tsl-Viena 8 (Figura 2.4), pois a demanda de parasitoides entre os anos de 2008 a 2012 foi menor que no período de produção em *C. capitata* tsl-Viena 8, de 2006 a 2008.

A taxa média de parasitismo ao longo das gerações foi de $0,81 \pm 0,01$ ($n=260$), a emergência de $0,55 \pm 0,01$ ($n=260$) e a razão sexual de $0,67 \pm 0,01$ sendo a maioria fêmeas (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Taxas de parasitismo e emergência de *Diachasmimorpha longicaudata* produzido em larvas irradiadas de *Anastrepha fraterculus* ao longo de 51 gerações. Temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$; 70-80% UR; 14 horas de fotofase

O tamanho do parasitoide criado em larvas irradiadas de *A. fraterculus* foi significativamente maior que o do parasitoide criado em *C. capitata* tsl-Viena 8 (Tabela 4.2). A taxa de voadores, de 0,89, foi maior que a obtida em parasitoides criados em *C. capitata* tsl-Viena 8 (Tabela 4.2).

A duração do ciclo do parasitoide neste hospedeiro durou cerca de 18,9 dias, com 89% de voadores em média (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Valores médios $\pm$ EP (n) de parâmetros morfológicos e biológicos para avaliação da qualidade de *Diachasmimorpha longicaudata* produzido em larvas irradiadas de *Anastrepha fraterculus*. Temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$; 70-80% UR; 14 horas de fotofase

Parâmetros	Hospedeiro		F	P
	<i>A. fraterculus</i>	<i>C. capitata</i> tsl-Viena 8		
Peso do macho (mg)	4,12 $\pm$ 0,11 (20)	2,70 $\pm$ 0,08 (20)	115,89	<0,0001 *
Peso da fêmea (mg)	5,01 $\pm$ 0,19 (20)	3,06 $\pm$ 0,09 (20)	84,87	<0,0001 *
Tamanho do macho (mm)	4,83 $\pm$ 0,09 (20)	4,44 $\pm$ 0,07 (20)	10,97	0,0020 *
Tamanho da fêmea (mm)	5,43 $\pm$ 0,08 (20)	4,55 $\pm$ 0,08 (20)	63,00	<0,0001 *
Tamanho do ovipositor (mm)	5,32 $\pm$ 0,09 (20)	4,87 $\pm$ 0,11 (20)	10,01	0,0030 *
Taxa de voadores ¹	0,89 $\pm$ 0,01 (10)	0,76 $\pm$ 0,01 (10)	56,31	<0,0001 *
Duração do ciclo (dias)	18,90 $\pm$ 0,22 (20)	14,62 $\pm$ 0,07 (20)	92,05	<0,0001 *

Asteriscos indicam diferença significativa entre os valores da mesma linha pelo teste F ($P < 0,01$)

¹ n° de parasitoides voadores/ total emergido

A longevidade sob estresse variou conforme o hospedeiro e o sexo dos parasitoides (Figura 4.4). Machos e fêmeas do parasitoide produzidos em *A. fraterculus* sobreviveram por mais tempo que os produzidos em *C. capitata* tsl-Viena 8 ($\chi^2=324$, gl=1, $P<0.0001$ para machos e $\chi^2=323$, gl=1, $P<0.0001$ para fêmeas), com médias de $3,11\pm0,03$ (n=2507) e $1,95\pm0,03$ (n=1267) dias, quando criados nos hospedeiros *A. fraterculus* e *C. capitata* tsl-Viena 8, respectivamente. Os machos, de ambos os hospedeiros, sobreviveram mais que as fêmeas ($\chi^2=11,6$; gl=1; $P=0,0007$ para *A. fraterculus* e $\chi^2=24,1$; gl=1; $P<0,0001$ para *C. capitata* tsl-Viena 8).

Figura 4.4 - Longevidade (dias) sob estresse de adultos do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* criado em grande escala em larvas irradiadas de *Anastrepha fraterculus*. Estimativa de Kaplan-Meier ($P<0,01$). Temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$; 70-80% UR; 14 horas de fotofase

4.2.4 Discussão

O parasitismo e a emergência superaram os valores obtidos por Ovruski et al. (2011) e Van Nieuwenhove; Ovruski (2011) em *A. fraterculus* sob condições experimentais, de 43,2% de parasitismo e 36,3% de emergência; e aproximadamente 50 % de emergência, respectivamente. Também superaram, significativamente, os respectivos valores obtidos do parasitoide criado em *C. capitata* tsl-Viena 8, onde o parasitismo médio foi de $0,73\pm0,02$ (n=375), emergência $0,18\pm0,01$ (n=416) e razão sexual $0,54\pm0,01$ (n=362).

A emergência do parasitoide está diretamente relacionada à umidade do solo onde ocorre a formação do pupário e permanência em pupa até a emergência dos adultos (BENTO et al., 2010), o que pode explicar a maior emergência de parasitoides produzidos em grande escala em *A. fraterculus* em relação aos valores obtidos em condições experimentais. Ovruski et al. (2011) colocaram lotes de 300 larvas nuas e parasitadas em potes com vermiculita seca, e Van Nieuwenhove e Ovruski (2011) observaram somente as larvas parasitadas em dieta que saem, por si sós, desse meio, para formarem pupários na vermiculita seca localizada abaixo do recipiente com dieta + larvas, portanto em ambas as situações a umidade do substrato de formação dos pupários foram baixa. Em criações de grande escala e massais, as larvas de *A. fraterculus* foram separadas da dieta por lavagem e foram mantidas em água até serem acondicionadas nas unidades de parasitismo. Dessa forma, as larvas parasitadas contém um pequeno volume de água na superfície e por isso não desidratam. Quando um volume grande de larvas parasitadas foi colocado em vermiculita, conforme acontece em grandes criações, o meio para a formação dos pupário ficou úmido, o que possivelmente evitou a morte dos parasitoides por desidratação.

A maior proporção de fêmeas é frequente em criações massais de parasitoides e reflete condições de criação favoráveis (HEIMPEL; LUNDGREN, 2000; ODE; HEINZ, 2002; MONTOYA et al., 2011). A baixa qualidade do hospedeiro e/ou grande quantidade de hospedeiro por parasitoide estão entre os fatores que resultam em menor quantidade de fêmeas que machos em criação massal (WAAGE et al., 1985; MONTOYA et al., 2011).

Parasitoides produzidos em larvas de *A. fraterculus* são significativamente maiores e com maior número de insetos capazes de voar (~90%) que os produzidos em *C. capitata* *tsl*-Viena 8. A taxa de voadores foi maior que em larvas de *A. ludens* (CANCINO et al., 2002).

A duração do ciclo foi maior que em larvas de *C. capitata* *tsl*-Viena 8, de linhagem bissexual, de 16 dias (PALADINO; PAPESCHI; CLADERA, 2010), e coincide com o ciclo em *A. suspensa*, de 18-19 dias (LAWRENCE; BARANOWSKI; GREANY, 1976). O tamanho e a duração do ciclo de *D. longicaudata* variam com o tamanho, idade e qualidade da larva hospedeira (LAWRENCE; BARANOWSKI; GREANY, 1976; LAWRENCE, 1990).

A longevidade média sob estresse dos adultos de *D. longicaudata* criado em larvas irradiadas de *A. fraterculus* foi maior que daqueles criados em *C. capitata* tsl-Viena 8 e inferior às obtidas em criação massal em larvas irradiadas de *A. ludens* (LÓPEZ et al., 2009). Esses autores também constataram que a longevidade sob estresse das fêmeas está diretamente relacionada ao tamanho do hospedeiro, o que possivelmente justifica a diferença nos valores, pois as larvas de *A. fraterculus* são visivelmente menores que as de *A. ludens*.

Ambas as espécies de Tephritidae, *C. capitata* linhagem tsl-Viena 8 e bissexual (OVRUSKI et al., 2011) e *A. fraterculus* foram hospedeiros adequados para criação do parasitoide *D. longicaudata*, mas a qualidade das fêmeas foi significativamente maior quando produzido massalmente em larvas irradiadas de terceiro ínstar de *A. fraterculus*.

4.2.5 Conclusões

Larvas de terceiro ínstar de *A. fraterculus* são melhores hospedeiros que larvas de *C. capitata* para produção em grande escala do parasitoide *D. longicaudata*, pois promovem maior emergência do parasitoide, maior quantidade e melhor qualidade de fêmeas.

Referências

- ALLINGHI, A.; CALCAGNO, G.; PETTIT-MARTY, N.; CENDRA, P.G.; SEGURA, D.; VERA, T.; CLADERA, J.; GRAMAJO, C.; WILLINK, E.; VILARD, J.C. Compatibility and competitiveness of a laboratory strain of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) after irradiation treatment. **Florida Entomologist**, Lanham, v. 90, n. 1, p. 27-32, 2007.
- BAUTISTA, R.C.; HARRIS, E.J. Effect of insectary rearing on host preference and oviposition behavior of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 83, p. 213-218, 1997.
- BENTO, F.M.M.; MARQUES, R.N.; COSTA, M.L.Z.; WALDER, J.M.M.; PARRA, J.R.P. Pupal development of *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) and *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) at different moisture values in four soil types. **Environmental Entomology**, College Park, v. 39, n. 4, p. 1315-1322, 2010.

BESS, H. A.; VAN den BOSCH, R.; HARAMOTO, F. H. Fruit fly parasites and their activities in Hawaii. **Proceedings of the Hawaiian Entomological Society**, Honolulu, v. 17, p. 367-378, 1961.

CANCINO, J.; VILLALOBOS, P.; DE LA TORRE, S. Changes in the rearing process to improve the quality of mass production of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). In: LEPPLA, N.C.; BLOEM, K.A.; LUCK, R.F. (Ed.). **Quality control for mass-reared arthropods**. Gainesville: Institute of Food and Agricultural Sciences; University of Florida, 2002. p. 74-82.

CANCINO, J.; RUIZ, L.; MONTOYA, P.; HARRIS, E. Biological attributes of three introduced parasitoids as natural enemies of fruit flies, genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 133, p. 181–188, 2009a.

CANCINO, J.; RUIZ, L.; LOPEZ, P.; SIVINSKI, J. The suitability of *Anastrepha* spp. and *Ceratitis capitata* larvae as hosts of *Diachasmimorpha longicaudata* and *Diachasmimorpha tryoni*: Effects of host age and radiation dose and implications for quality control in mass rearing. **Biocontrol Science and Technology**, Oxon, v. 19, n. S1, p. 81-94, 2009b.

CARVALHO, R.S.; NASCIMENTO, A.S.; MATRANGOLO, W.J.R. Controle biológico. In: MALVAZI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 113-117.

CENDRA, P.G.; SEGURA, D.; ALLINGHI, A.; CLADERA, J.; VILARDI, J. Comparison of longevity between a laboratory strain and a natural population of *Anastrepha fraterculus* under field cage conditions. **Florida Entomologist**, Lanham, v. 90, n. 1, p. 147-153, 2007.

CRAWLEY, M.J. **The R book**. West Sussex: John Wiley, 2007. 942 p.

GODFRAY, H.C.J. **Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology**. Princeton: Princeton University Press, 1994. 473 p.

GONZÁLEZ, P.I.; MONTOYA, P.; LACHAUD-PEREZ, G.; CANCINO, J.; LIEDO, P. Superparasitism in mass reared *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit flies (Diptera: Tephritidae), **Biological Control**, San Diego, v. 40, p. 320-326, 2007.

GUTIÉRREZ-RUELAS, J.M.; SANTIAGO, G. Situación actual de la campaña nacional contra moscas de la fruta en México. In: MEETING OF THE WORKING GROUP ON FRUIT FLIES OF THE WESTERN HEMISPHERE, 7., 2008, Mazatlán. **Proceedings...**Mazatlán: Meeting Publication, 2008. p. 11-13.

HEIMPEL, G.E.; LUNDGREN, J.G. Sex ratios of commercially reared biological control agents. **Biological Control**, San Diego, v. 19, p. 77–93, 2000.

HENDRICH, J.; BLOEM, K.; HOCH, G.; CARPENTER, J.E.; GREANY, P.; ROBINSON, A.S. Improving the cost-effectiveness, trade and safety of biological

control for agricultural insect pests using nuclear techniques. **Biocontrol Science and Technology**, Oxon, v.19, SI, p. 3-22, 2009.

KLASSEN, W.; CURTIS, C.F. History of the sterile insect technique. In: DYCK, V.A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A.S. (Ed.). **Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 3-36.

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

_____. **Principles of Insect parasitism analyzed from new perspectives: practical implications for regulating insect populations by biological means**. Washington: USDA, 1992. 337 p. (Agriculture Handbook, 639).

LAWRENCE, P.O. Intraspecific competition among first instars of the parasitic wasp *Biosteres longicaudatus*. **Oecologia**, Berlin, v. 74, p. 607-611, 1988.

_____. The biochemical and physiological effects of insect hosts on the development and ecology of their insect parasites: an overview. **Archives on Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 13, p. 217-228, 1990.

LAWRENCE, P.O.; BARANOWSKI, R.M.; GREANY, P.D. Effect of host age on development of *Biosteres longicaudatus*, a parasitoid of the Caribbean fruit fly *Anastrepha suspensa*. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 59, n. 1, p. 33-39, 1976.

LÓPEZ, O.P.; HENAUT, Y.; CANCELINO, J.; LAMBIN, M.; CRUZ-LOPEZ, L.; ROJAS, J.C. Is host size an indicator of quality in the mass-reared parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 92, n. 3, p. 441-449, 2009.

MESSING, R.H.; KLUNGNESS, L.M.; PURCELL, M.; WONG, T.T.Y. Quality control parameters of mass-reared opine parasitoids used in augmentative biological control of tephritid fruit flies in Hawaii. **Biological Control**, San Diego, v. 3, p. 140-147, 1993.

MONTOYA, P.; LIEDO, P.; BENREY, B.; CANCELINO, J.; BARRERA, J.F.; SIVINSKI, J.; ALUJA, M. Biological control of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in mango orchards through augmentative releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, San Diego, v. 18, n. 3, p. 216-224, 2000a.

MONTOYA, P.; LIEDO, P.; BENREY, B.; BARRERA, J.F.; CANCELINO, J.; ALUJA, M. Functional response and superparasitism by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit flies (Diptera: Tephritidae) **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 93, n. 1, p. 47-54, 2000b.

MONTOYA, P.; CANCELINO, J.; PÉREZ-LACHAUD, G.; LIEDO, P. Host size, superparasitism and sex ratio in mass-reared *Diachasmimorpha longicaudata*, a fruit fly parasitoid. **BioControl**, Dordrecht, v. 56, p. 11-17, 2011.

ODE, P.J.; HEINZ, K.M. Host-size dependent sex ratio theory and improving mass reared parasitoid sex ratios. **Biological Control**, San Diego, v. 24, p. 31–34, 2002.

OVRUSKI, S.M.; BEZDJIAN, L.P.; VA NIEUWENHOVE, G.A.; ALBOROZ-MEDINA, P.; SCHLISERMAN, P. Host preference by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) reared on larvae of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, Lanham, v. 94, n. 2, p. 195–200, 2011.

PALADINO, L.Z.C.; PAPESCHI, A.G.; CLADERA, J.L. Immature stages of development in the parasitoid wasp *Diachasmimorpha longicaudata*. **Journal of Insect Science**, Ludhiana, v. 10, n. 56, p. 1–13, 2010.

R CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2009. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 20 dez. 2012.

SIVINSKI, J.; PIÑERO, J.; ALUJA, M. The distributions of parasitoids (Hymenoptera) of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) along an altitudinal gradient in Veracruz, Mexico. **Biological Control**, San Diego, v. 18, p. 258–269, 2000.

SIVINSKI, J.; SMITTLE, B. Effects of gamma radiation on the development of the Caribbean fruit fly (*Anastrepha suspensa*) and the subsequent development of its parasite *Diachasmimorpha longicaudata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 55, p. 295–297, 1990.

SIVINSKI, J.; CALKINS, C.O.; BARANOWSKI, R.; HARRIS, D.; BRAMBILA, J.; DIAZ, J.; BURNS, R.E.; HOLLER, T.; DODSON, G. Suppression of Caribbean fruit fly (*Anastrepha suspensa* (Loew) Diptera: Tephritidae) population through releases of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, San Diego, v. 6, p. 177–185, 1996.

VAN NIEUWENHOVE, G.; OVRUSKI, S. M. Influence of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) larval instars on the production of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) progeny and their sex ratio. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 94, n. 4, p. 863–868, 2011.

VERA, T.; ABRAHAM, S.; OVIEDO, A.; WILLINK, E. Demographic and quality parameters of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) maintained under artificial rearing. **Florida Entomologist**, Lanham, v. 90, n. 1, p. 53–57, 2007.

VINSON, S.B.; HEGAZI, E.M. A possible mechanism for the physiological suppression of conspecific eggs and larvae following superparasitism by solitary endoparasitoids. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 44, p. 703–712, 1998.

WANG, X.G.; MESSING, R.H. Intra- and interspecific competition by *Fopius arisanus* and *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae), parasitoids of tephritid fruit flies. **Biological Control**, San Diego, v. 27, p. 251–259, 2003.

WHITE, I.M.; ELSON-HARRIS, M.M. **Fruit flies of economic significance:** their identification and bionomics. Wallingford: CAB International, 1992. 624 p.

ANEXO

ANEXO A - Aminograma de leveduras utilizadas como fonte proteica na alimentação de adultos de *Anastrepha fraterculus*

Aminoácidos	(g/ 100 g amostra)		
	Bionis YE MF®(T1)	Bionis YE NS®(T2)	YHE(T3)
Alanina	4,78	5,78	4,68
Arginina	4,13	5,02	4,04
Ácido aspártico	7,94	6,41	6,41
Glicina	3,31	3,03	3,21
Isoleucina	3,63	3,14	2,88
Leucina	5,05	4,30	4,36
Ácido glutâmico	8,36	11,05	8,78
Lisina	5,31	5,04	4,81
Cistina	0,77	0,96	-
Metionina	0,90	1,18	1,09
Fenilalanina	2,91	2,53	2,69
Tirosina	2,04	2,27	2,24
Treonina	3,46	2,90	2,88
Triptofano	0,61	0,47	0,64
Prolina	2,31	2,34	3,08
Valina	4,50	4,02	3,53
Histidina	1,41	1,30	1,60
Serina	3,14	2,72	3,08
TOTAL	64,56	64,46	60,00

Fonte: Certificados de controle de qualidade dos produtos fornecidos pelos fabricantes Biorigin e MP Biomedical LLC