

**ALINE CRISTIANE KAMIYA**

**Criação massal em dieta líquida e radioesterilização da mosca-sul-americana *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus* (Wied., 1830)  
(Diptera: Tephritidae)**

**Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. Julio Marcos Melges Walder**

**Piracicaba**

**2010**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Kamiya, Aline Cristiane

Criação massal em dieta líquida e radioesterilização da mosca-sul-americana *Anastrepha* sp. 1 *aff. fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae) / Aline Cristiane Kamiya; orientador Julio Marcos Melges Walder. - - Piracicaba, 2010.

71 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Controle biológico 2. Entomologia agrícola 3. Fruticultura 4. Mosca-das-frutas I. Título

CDU 595.773.4:632.937

**Dedico,**

aos meus pais,  
por todo amor e esperança  
que tiveram desde o passado  
até hoje.

**Ofereço,**

ao Pedro, e aos meus sobrinhos,  
por todo amor e esperança  
que tenho hoje  
e no futuro.

## AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que hoje olho ao meu redor e vejo que não completei esta jornada sozinha. São muitas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão desta importante etapa da minha vida. A elas, devo minha eterna gratidão.

Ao meu orientador, **Professor Júlio**, agradeço a forma acolhedora que me recebeu em 2008, por toda a atenção, paciência, confiança e principalmente pela liberdade, que proporcionou um mestrado muito além de disciplinas e experimentos. Agradeço também, ao grande empenho despendido na finalização deste trabalho. **OBRIGADA PROFESSOR!**

Ao **CENA/USP**, essa grande família hospitaleira, que só rendeu boas experiências profissionais e pessoais. Agradeço a cada funcionário, por toda a educação, esforço e dedicação que nunca me faltou. Por todo o carinho e boa energia que vocês me passaram, obrigada.

Agradeço à Professora **Adriana**, presidente da CPG-CENA, à toda **secretaria de Pós-graduação do Cena** e à **Marília**, bibliotecária chefe STB-CENA por toda compreensão, solidariedade, e paciência com uma mãe de primeira viagem.

A **CNEN** pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos companheiros de laboratório que convivi nestes anos, **Aline, Piauí, Queliabe, Léa, Leandro, Rafael, Karen, Quênia, Fernanda, Adrisse, Clarisse, Luís**, agradeço imensamente pela ajuda sempre que necessária e pelas boas conversas e risadas. Um agradecimento especial a **Lia**, pela amizade e carinho demonstrado e pela fundamental ajuda laboratorial.

Obrigada a todas **Anastrepha fraterculus**, a cada vida utilizada em prol desse pequenino passo rumo a um mundo mais equilibrado e menos poluído.

Agradeço a **minha família**. Aos meus pais, **Célia** e **Edson**, por todo o esforço, luta e sacrifício que me trouxeram até aqui e também por toda ajuda e carinho desde a chegada do nenê.

Aos meus irmãos, **Fran** e **Diego**, porque crescer junto deles não me deixou amargar nunca, e muito do que sou é devido a nossa maravilhosa convivência.

Ao **Matheus**, meu amor, meu orgulho, minha sorte maior. Obrigada por todo amor, cuidado, dedicação, paciência e preocupação. Obrigada por seguir ao meu lado sempre, me cercando de apoio e incentivo. Você não tem noção dá força que me dá.

Ao **Pedro**, meu bebezinho tão amado, que ainda tão pequenino pareceu entender e cedeu boas horas de seu colo por direito, à finalização deste trabalho. Obrigada meu filho, compensarei cada minuto em dobro, juro.

A **família Peres Chagas**, sempre de braços abertos, pela inestimável ajuda com o Pedro nesta fase final, em especial a Leila e Tunica que dispensaram cuidados dia e noite com tanto amor e carinho.

A minha amiga **Cristina**, que desde a graduação me dispensa carinho como irmã e ao seu marido e meu amigo **Tadeu**, que desde a graduação me agüenta como cunhada. Obrigada Tadeu, pelo “toques” e pela grande ajuda na estatística.

As pessoas maravilhosas com quem tive a imensa sorte de morar: **Gisele, Jujuba, Fabi, Aurélie, Chicó**, em especial **Vilinha** e **Pivete**, grandes amigas que ganhei em Piracicaba. E as pessoas maravilhosas a quem tive o prazer de conhecer e conviver, **Chico Chicote, Débora, Biba, Marta, Rogério, Maria, Moisés, Elisete** e tantas outras não citadas aqui nominalmente. Obrigada por tanto carinho e bons momentos!

**MUITO OBRIGADA!!!**

“A natureza, para ser comandada,  
tem que ser obedecida.”  
(Francis Bacon)

## RESUMO

KAMIYA, A. C. **Criação massal em dieta líquida e radioesterilização da mosca-sul-americana *Anastrepha sp.1 aff. fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae)**. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Tanto as técnicas de controle biológico quanto a Técnica do inseto estéril (TIE), são utilizadas em vários países para o controle, supressão e até mesmo erradicação de moscas-das-frutas e outras pragas da agricultura, pecuária e saúde pública. O uso de tais técnicas minimiza o emprego contínuo de inseticidas, protege o ambiente e se adequa aos padrões de segurança alimentar. No entanto, é necessário para a implementação de tais programas, tecnologia para produzir milhões de parasitóides e a própria praga em laboratório com qualidade biológica similar aos insetos encontrados na natureza e com custo competitivo com o controle químico. Os objetivos deste trabalho foi estabelecer protocolos para criação artificial de *A. sp. 1 aff. fraterculus* em dieta larval líquida que permita atingir níveis de criação massal, para uma possível diminuição no custo da criação e determinar a dose de radiação esterilizante para adultos de *A. sp. 1 aff. fraterculus* atendendo os parâmetros de qualidade exigidos pela Técnica do Inseto Estéril com insetos provenientes da criação do Laboratório de Radioentomologia do CENA/USP. Foram testadas sete dietas em relação à dieta convencional utilizada no laboratório de Radioentomologia do CENA/USP, que foi usada como controle. Todas as sete dietas tiveram em comum a exclusão do ágar na sua formulação. Somente duas das dietas testadas foram adequadas para o desenvolvimento larval da mosca, estas quando comparadas com a dieta padrão, apresentaram resultados inferiores com relação ao volume de larvas recuperadas, emergência e o peso das pupas, porém, não apresentaram diferenças significativas quanto aos períodos de desenvolvimento, recuperação pupal, razão sexual e longevidade sob estresse. Concluí-se que é possível a substituição da dieta com ágar por dietas líquidas para criação artificial de *A. sp.1 aff. fraterculus*, de custo reduzido e com maior praticidade de manejo, porém devidos aos seus parâmetros de qualidade inferiores aos da dieta padrão, são necessários maiores testes principalmente quanto à adaptabilidade do inseto ao novo meio. Para determinar a dose esterilizante o presente trabalho analisou a fertilidade, fecundidade, emergência, habilidade de vôo e longevidade sob estresse de *A. fraterculus* irradiadas com doses de 40, 50, 60, 70 e 80 Gy. A fonte de radiação gama foi um irradiador de Co-60 (Gammabeam-650) localizado no mesmo laboratório. Os testes foram realizados sob as seguintes condições ambientais:  $26 \pm 1$  °C,  $70 \pm 5\%$  RH, e fotofase de 12:12. A dose de radiação gama esterilizante para machos de *A. sp. 1 aff. fraterculus* foi determinada sendo 70 Gy. Fêmeas irradiadas, mesmo com a dose mais baixa de 40 Gy, não ovipositaram, possivelmente pela atrofia dos ovários causada pela radiação. A radiação não afetou os demais parâmetros de qualidade do inseto como emergência, longevidade e habilidade de vôo.

Palavras-chave: *Anastrepha fraterculus*. Moscas-das-frutas. Criação de insetos. Dieta artificial. Técnica do Inseto Estéril. Radiação gama.

## ABSTRACT

KAMIYA, A. C. **Mass production in liquid diet and radioesterilização of South American fruit fly *Anastrepha sp.1 aff. fraterculus* (Wied., 1830) (Díptera: Tephritidae)**. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Both the biological control techniques as the Sterile Insect Technique (SIT), are used in many countries to control, suppress and even eradicate fruit flies and other pests in agriculture and public health. The use of such techniques minimizes the continuous employment of insecticides, protects the environment and conforms to standards for food safety. However, it is necessary to implement such programs, technology to produce millions of parasitoids and the pest in its own laboratory with biological quality similar to the insects found in nature and cost competitive with chemical control. The objectives of this study was to establish protocols for artificial rearing of *A. sp. 1 aff. fraterculus* in liquid larval diet that will achieve levels of mass production for a possible reduction in the cost of establishing and determining the dose of radiation sterilization of adult *A. sp. 1 aff. fraterculus* meeting the quality parameters required by the Sterile Insect Technique with insects from the creation of Radioentomologia Laboratory of CENA / USP. Seven experimental diets compared to the conventional diet used in laboratory Radioentomologia of CENA / USP, which was used as control. All seven diets have in common the exclusion of agar in its formulation. Only two of the diets tested were suitable for larval development of the fly, they compared with the standard diet, showed inferior results with respect to the volume of recovered larvae, pupae and weight of emergency, however, no significant differences regarding the periods of development , pupal recovery, sex ratio and longevity under stress. It is possible to replace the diet with agar for liquid diets for artificial creation of *A. sp.1 aff. fraterculus*, reduced cost and greater convenience of handling, but due to their quality standards lower than the standard diet, more tests are needed especially regarding the adaptability of the insect to the new environment. To determine the sterilizing dose this study examined the fertility, fecundity, emergence, flight ability and longevity under stress in *A. fraterculus* irradiated with 40, 50, 60, 70 and 80 Gy. The radiation source was a gamma irradiator with a Co-60 (Gammabeam-650) located in the same laboratory. The tests were performed under the following environmental conditions:  $26 \pm 1$  °C,  $70 \pm 5\%$  RH and photoperiod of 12:12. The dose of gamma radiation sterilization for male *A. sp. 1 aff. fraterculus* was determined with 70 Gy. Irradiates females, even with the lower dose of 40 Gy, layed no eggs, possibly due to atrophy of the ovaries caused by radiation. The radiation did not affect the other quality parameters such as insect emergence, longevity and ability to fly.

Keywords: *Anastrepha fraterculus*. Fruit-flies. Insect rearing. Artificial diet. Sterile Insect Technique. Gamma radiation.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	12
1.1. Objetivos .....	14
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1. Mosca Sul Americana: <i>Anastrepha fraterculus</i> (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae) .....	15
2.1.1 Ciclo de Vida de <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	16
2.2. Criação em Dieta Artificial .....	17
2.2.1 Criações de Moscas-das-Frutas em Dietas Líquidas .....	18
2.2.2 Criação Artificial de <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	20
2.3. Técnica do Inseto Estéril .....	24
2.3.1 Radioesterilização em moscas-das-frutas.....	26
REFERÊNCIAS.....	29
<b>3. CAPÍTULO 1: Criação da Mosca-Sul-Americana <i>Anastrepha sp.1 aff. fraterculus</i> (Wied.,1830) (Diptera: Tephritidae) em Dieta Líquida</b> .....	36
3.1. Resumo .....	36
3.2. Abstract .....	37
3.3. Introdução .....	38
3.4. Material e Métodos.....	39
3.4.1 Insetos.....	39
3.4.2 Dietas .....	39
3.4.3 Coleta e incubação de ovos .....	41
3.4.4 Semeadura dos ovos/larvas à dieta .....	41
3.4.5 Manutenção das larvas nas diferentes dietas .....	43
3.4.6 Coleta das larvas de terceiro instar .....	43
3.4.7 Separação das pupas.....	43
3.4.8 Parâmetros de qualidade avaliados .....	43
3.4.9 Análise estatística .....	45
3.5. Resultados e Discussão.....	45
3.5.1 Desenvolvimento larval .....	45
3.5.2 Volume de larvas recuperadas.....	47
3.5.3 Recuperação pupal .....	48
3.5.4 Peso pupal (mg) .....	50

3.5.5 Período do desenvolvimento larval .....	51
3.5.6 Período do desenvolvimento pupal .....	51
3.5.7 Emergência de adultos.....	52
3.5.8 Razão sexual.....	54
3.5.9 Longevidade sob estresse.....	54
3.6. Conclusões.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
<b>4. CAPÍTULO 2: Radioesterilização da mosca-sul-americana <i>Anastrepha sp.1 aff. fraterculus</i> (Wied.,1830) (Diptera: Tephritidae) .....</b>	<b>57</b>
4.1. Resumo .....	57
4.2. Abstract .....	58
4.3. Introdução .....	59
4.4. Material e Métodos .....	60
4.4.1 Insetos.....	60
4.4.2 Fontes de Radiação .....	60
4.4.3 Efeito da irradiação sobre a fertilidade .....	60
4.4.4 Parâmetros de qualidade a serem avaliados .....	62
4.4.5 Análise estatística .....	64
4.5. Resultados e Discussão.....	65
4.5.1 Fertilidade.....	65
4.5.2 Fecundidade.....	68
4.5.3 Emergência de adultos.....	69
4.5.4 Longevidade sob estresse.....	70
4.5.5 Habilidade de vôo.....	71
4.6. Conclusões.....	71
REFERÊNCIAS.....	72

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil produz 43 milhões de toneladas de frutas tropicais, subtropicais e de clima temperado ao longo do ano. Dos 47% consumidos *in natura* apenas 2% foram direcionados à exportação, e a outra parte, 53%, foi destinada ao processamento, a maior parte, suco concentrado e congelado de laranja, com 29% comercializado ao mercado externo (IBRAF, 2010). Estes dados colocam o Brasil como o terceiro maior produtor mundial de frutas, porém, em 15º no ranking dos países exportadores de frutas, posição bem abaixo do potencial brasileiro poderia exercer no mercado internacional.

Para o Brasil se tornar mais competitivo e exportar mais, é necessário um produto de qualidade, diferenciado e que cumpra as exigências fitossanitárias e comerciais dos países importadores. Exigências cada vez mais intensificadas e crescentes com respeito à qualidade do produto, especialmente em relação à presença de resíduos químicos, medidas quarentenárias e boas práticas agrícolas, como o Sistema Integrado de Fruta (PIF). No caso das frutas, sua comercialização no mundo é drasticamente limitada pela ocorrência de moscas-das-frutas, esta praga faz com que países importadores imponham severas barreiras fitossanitárias que dificultam ou impedem as exportações.

Consideradas as principais pragas da fruticultura mundial, as moscas-das-frutas causam danos diretos e indiretos ao pomar, possuem um grande número de plantas hospedeiras e grande capacidade de adaptação. No Brasil, têm destaque os gêneros *Anastrepha* e *Ceratitis* da família Tephritidae, que possuem espécies como *Anastrepha fraterculus*, *Anastrepha obliqua* e *Ceratitis capitata*, todas de considerável importância econômica para a fruticultura brasileira (ZUCCHI, 2000).

Hoje no Brasil, o controle ainda é feito de forma desregrada pelos fruticultores que gastam grandes quantidades de inseticidas, sem o adequado conhecimento das espécies infestantes, dos níveis de infestação, da distribuição dos hospedeiros, do controle biológico, do impacto ambiental e não se preocupando com a qualidade final do produto. Porém, com a mudança do perfil do consumidor, consciente dos riscos da presença de resíduos de agrotóxicos em frutas, do PIF como exigência de mercados importadores e das barreiras fitossanitárias, a pesquisa científica tem buscado alternativas para o controle pragas. Um exemplo disso é o crescimento e

consolidação de técnicas de controle biológico e da Técnica do Inseto Estéril (TIE) para o combate de moscas-das-frutas (WALDER, 2000).

Tanto as técnicas de controle biológico quanto a TIE, são utilizadas em vários países para o controle, supressão e até mesmo erradicação de moscas-das-frutas e outras pragas da agricultura, pecuária e saúde pública. O uso de tais técnicas minimiza o emprego contínuo de inseticidas, protege o ambiente e se adequa aos padrões de segurança alimentar.

No entanto, é necessário para a implementação de tais programas, tecnologia para produzir milhões de parasitóides e a própria praga em laboratório com qualidade biológica similar aos insetos encontrados na natureza, devendo haver um controle de qualidade desses insetos com base, principalmente, em parâmetros biológicos. (CLARKE; McKENZIE, 1992; BIGLER, 1994). O sucesso destes insetos no campo são fundamentais para que tais técnicas se difundam entre os produtores. O baixo desempenho pode resultar numa “propaganda negativa” e comprometer todo um programa desenvolvido ao longo de muitos anos de pesquisa (PARRA, 2002).

Assim como a qualidade dos insetos, outro fator determinante para a implementação de um programa de controle que envolva a criação de insetos é o custo, determinando a viabilidade ou não da criação de muitas espécies. A relação custo-benefício deve ser atraente o bastante, para competir com o controle químico, uma vez que o custo, muitas vezes, é quem mais influência na decisão do produtor.

## 1.1 Objetivos

- Estabelecer protocolos para criação artificial de *A. sp. 1 aff. fraterculus* em dieta larval líquida que permita atingir níveis de criação massal (>1 milhão de adultos/geração), para uma possível diminuição no custo da criação.
- Determinar a dose de radiação esterilizante para adultos de *A. sp. 1 aff. fraterculus* atendendo os parâmetros de qualidade exigidos pela Técnica do Inseto Estéril com insetos provenientes da criação do Laboratório de Radioentomologia do CENA/USP.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Mosca Sul Americana: *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae)

As moscas-das-frutas são pragas que causam grande prejuízo à fruticultura mundial devido aos danos diretos e indiretos que causam à planta hospedeira. As larvas podem destruir totalmente a polpa dos frutos, tornando-os imprestáveis ao consumo. No orifício feito pelo ovipositor ocorre o apodrecimento, resultando em queda do fruto. Outro problema é a chamada “sucessão de hospedeiros”, ou seja, como atacam uma grande diversidade de frutíferas, elas passam de uma frutífera para outra à medida que estas vão frutificando em diferentes épocas do ano (MALAVASI; ZUCCHI, 2000).

Pertencem à ordem Diptera (com asas posteriores transformadas em balancins), à subordem Brachycera (com antenas, normalmente com três segmentos), série Schizophora (com fissura ptilinal) e à família Tephritidae (com nervura subcostal dobrada em ângulo) (ZUCCHI, 2000). Tefritídeos são cosmopolitas, com distribuição limitada pela disponibilidade de hospedeiros e condições climáticas extremas. As espécies desta família podem ser divididas em dois grandes grupos baseados em características fisiológicas e ecológicas. No primeiro grupo, incluem-se as espécies univoltinas com única geração anual e diapausa, ocorrendo em regiões temperadas, como o gênero *Rhagoletis*. No segundo grupo, encontram-se os gêneros *Anastrepha*, *Ceratitis* e *Dacus*, multivoltinos com mais de uma geração anual, sem diapausa e distribuídos em regiões tropicais (BATEMAN, 1972).

*Anastrepha fraterculus*, conhecida popularmente como a mosca sul-americana, é uma mosca-das-frutas de grande importância econômica. É uma praga primária, ou seja, sua flutuação populacional frequentemente atinge níveis de densidade que exigem controle. Multivoltina, podendo ter mais de seis gerações ao ano, o que possibilita sua presença em todos os meses do ano. *A. fraterculus* é considerada uma das espécies mais polífagas, atacando mais de 80 espécies frutíferas, incluindo manga, citrus, goiaba, maçã e café (DA SILVA et al., 1996; STECK, 1999). Devido à “sucessão de hospedeiros”, irá transferir-se de diversas frutíferas, cujas colheitas são feitas durante o verão, para variedades precoces de

outras culturas e por apresentar um ovipositor mais longo atacam indistintamente frutos verdes e maduros.

Distribui-se, exclusivamente, no continente americano, sendo encontrada da Argentina até o sul dos Estados Unidos. Porém, é representativa apenas em países como o Uruguai, Argentina, Paraguai e Brasil. (BLEICHER et al., 1982; CANAL et al., 1993; SALLES, 1995; NORA et al., 2000).

### **2.1.1 Ciclo de Vida de *Anastrepha fraterculus***

As moscas-das-frutas completam o seu desenvolvimento passando por 4 estágios: ovo, larva, pupa e adulto. As formas básicas de ovo, larva (tipo vermiforme) e pupas (tipo coarctada) assemelham-se, de modo geral, entre as diferentes espécies, já os adultos possuem uma ampla variação fenotípica.

As fêmeas emergem com os ovários ainda não totalmente desenvolvidos, consumindo alimentos ricos em proteínas, necessários para completar o desenvolvimento ovariano. Quando maduras reprodutivamente, são fecundadas e selecionam o fruto hospedeiro para depositar seus ovos (SALLES, 1992).

Os períodos de desenvolvimento podem variar de acordo com uma série de fatores, especialmente a temperatura. Estudando as exigências térmicas para o desenvolvimento de *A. fraterculus*, Machado et al. (1995) observaram que a temperatura base inferior para o ovo foi de 9,23°C, larva 10,27°C, pupa 10,78°C, e para o ciclo de vida foi de 10,72°C. A maior longevidade para estes animais ocorreu a 15°C, diminuindo drasticamente a 25°C. A faixa de temperatura ótima para o desenvolvimento biológico da *A. fraterculus* está entre 15,28°C e 26,79°C.



Figura 1 - A – *A. fraterculus* ovipositando em fruto, B – Ovos de *A. fraterculus* em fruta, C – larva de *A. fraterculus* deixando o fruto, D – pupas no solo, E – esquema de ciclo de vida das moscas-das-frutas, F – acasalamento de *A. fraterculus*, G – macho de *A. fraterculus*, H – fêmea de *A. fraterculus*

O ciclo de vida de *A. fraterculus* selvagem possui como principais eventos de sua biologia, a 25°C:

- período de pré-oviposição de 7 a 14 dias;
- oviposição até os 46-62 dias;
- fecundidade de até 40 ovos/fêmea/dia, com média de 25,2 ovos/fêmea/dia;
- período de incubação variando entre 1 e 3 dias;
- desenvolvimento larval de 12-14 dias;
- período pupal de 11 a 21 dias.

## 2.2 Criação em Dieta Artificial

A dieta nutricional preocupa-se com a proporção entre os nutrientes necessários para a espécie, bem como quanto do que foi ingerido pelo animal foi assimilado e convertido no crescimento do mesmo. Do ponto de vista alimentar e nutricional, as substâncias podem ser divididas em primárias e secundárias. As



primárias são aquelas que participam diretamente do metabolismo, influenciando diretamente a sobrevivência, o desenvolvimento, a reprodução e o comportamento (HSIAO, 1985). Estas substâncias são as proteínas, os carboidratos, os lipídeos, as vitaminas, os sais minerais, e para muitos autores a água.

As substâncias secundárias ou aleloquímicos, não participam do metabolismo, mas influenciam a fagoestimulação, e o aproveitamento das substâncias primárias (DADD, 1985). De acordo com Bernays (1985) para se conhecer as necessidades nutritivas de uma espécie, é importante conhecer o comportamento alimentar da mesma. Isto se deve ao fato de que os estímulos externos, e presentes nos alimentos, muitas vezes não têm relação com os aspectos nutritivos, mas são fundamentais para que a ingestão aconteça.

As necessidades nutricionais dos insetos dependem de fatores bióticos (fase de crescimento, reprodutiva ou de dispersão) e abióticos (temperatura, umidade relativa, etc). Se os insetos não conseguirem satisfazer suas necessidades nutricionais mínimas sofrerão conseqüências na performance, tais como: tempo prolongado de desenvolvimento redução na fecundidade e fertilidade, não sincronia com os hospedeiros, morte prematura, etc. (SLANSKY; SCRIBER, 1985; SIMPSON; SIMPSON, 1990). Além da performance, a quantidade e a qualidade dos alimentos ingeridos afetam também o comportamento alimentar dos insetos (STOFFOLANO, 1995). Alguns estudos demonstraram que as larvas de moscas-das-frutas preferem frutos maduros, provavelmente porque são mais ricos em açúcares, além de se desenvolverem mais rapidamente nestes do que em frutos mais verdes (CALKINS; WEBB, 1988).

A alimentação e principalmente o comportamento alimentar apresentam diferenças que refletem condições bióticas e abióticas em que as diferentes espécies de moscas-das-frutas estão inseridas (ZUCOLOTO, 2000). O conhecimento dessas diferenças é importante na estratégia de sua colonização e criação massal.

### **2.2.1 Criações de Moscas-das-Frutas em Dietas Líquidas**

O maior problema para a criação em uma dieta líquida é encontrar um substrato ideal para o desenvolvimento das larvas, especialmente de 1° e 2° instares. Agarose, algodão, papel, gel e toalhas de algodão já foram testados em

diversas espécies, porém sem resultados satisfatórios e com relatos de baixo rendimento e alta mortalidade.

Chang et al. (2004) pesquisaram o desenvolvimento de uma dieta líquida larval simples e todo um sistema de criação para diminuir custos e trabalho na manutenção de uma criação artificial de *Bactrocera cucurbitae*, a mosca do melão. Usou-se a dieta convencional (benzoato de sódio 0,11%, Nipagin 0,11%, açúcar 7,35%, levedura *Torula* 3,55%, farelo de trigo 31,19% e água 57,70%) como controle e também como base inicialmente para as proporções dos ingredientes para a nova dieta, substituindo a levedura *Torula* e o farelo de trigo pela mesma quantidade em levedura de cerveja. Ajustes nas proporções foram necessários devido à uma grande queda da recuperação pupal e, com os ajustes, chegou-se as seguintes proporções para a dieta líquida: benzoato de sódio 0,09%, Nipagin 0,09%, açúcar 5,96%, levedura de cerveja 11,51%, água 81,08% e ácido cítrico 1,26%. Os resultados da produção larval foram aproximadamente os mesmos para a dieta líquida e a convencional. Porém a recuperação pupal desde a criação larval na dieta líquida é significativamente mais baixa, 80% do controle. Concluiu-se que a dieta líquida é vantajosa no que se refere ao custo, trabalho e espaço utilizado, e se aperfeiçoada, pode-se chegar a uma viabilidade igual ou maior que a convencional.

Com uma dieta composta de 100 ml de solução conservante, 12 g levedura cervejeira, 2,7 g de sucrose, 4 g de soja hidrolisada, 2,75 ml de azeite de oliva e 2 ml de emulsificante, Mittler e Tsitsipis (1973) obtiveram com *Dacus oleae*, a mosca das oliveiras, um aumento de 10 vezes na produção pupal. Os ingredientes depois de batidos eram despejados em uma toalha de algodão e logo após os ovos eram incubados. A dieta além de se mostrar de mais fácil manuseio e confecção, diminuiu consideravelmente os custos de uma criação.

Fay e Wornoayporn (2002) testaram em pequena escala a substituição do farelo de trigo da dieta convencionalmente usada no Laboratório de Seibersdorf – Vienna/Áustria por diferentes substratos neutros reutilizáveis (cubos e folhas de esponja de alta e baixa densidade, carpete e panos de flanela) em dieta de *Ceratitis capitata*, sendo que a dieta convencional foi adotada como o controle do experimento. No primeiro experimento houve apenas a substituição do farelo pelo substrato neutro reutilizável, a recuperação pupal caiu pela metade, a duração do período larval se estendeu por mais dois dias e a média do tamanho pupal caiu 10%. A emergência dos adultos e habilidade de vôo não foram afetadas. Num segundo

experimento, além da substituição do farelo de trigo pelos outros substratos, houve também a adição de levedura ou base de farelo. A recuperação pupal mostrou-se semelhante à dieta controle no tratamento esponja em cubo de alta densidade com levedura, as dietas enriquecidas com a base de trigo mostraram resultados semelhantes à convencional nos seguintes substratos: esponja em cubo de alta densidade, esponja em folha de alta densidade e pano de flanela. Para todos os demais substratos os resultados foram inferiores aos da dieta convencional. A inclusão de levedura *Torula* e gérmen de trigo podem incrementar o desempenho da dieta no substrato de esponja em cubos de alta densidade, que mostrou bons resultados em todos os tratamentos.

Chang et al. (2006) desenvolveram uma metodologia para a criação de larvas de *Bractocera dorsalis* Hendel (Díptera: Tephritidae), mosca das frutas oriental, em dietas líquida sem um agente solidificante pela primeira vez em larga escala. Tecidos esponjosos de celulose foram usados como substratos para as larvas. Os experimentos foram conduzidos para identificar as características de duração larval, recuperação pupal, peso pupal, emergência, habilidade de vôo, acasalamento, eclosão, proporção sexual, produção de ovos e tempo de eclosão da criação massal em dieta líquida. O desempenho da criação na dieta líquida foi idêntica à convencional, e testes preliminares mostraram que a dieta líquida pode ser usada em criações de fábrica.

### **2.2.2 Criação Artificial de *Anastrepha fraterculus***

Martins (1986) avaliou diferentes temperaturas (20, 25 e 30°C), cinco dietas, diferentes condições de umidade na eclosão das larvas, influência de cor e tipo de receptáculo na postura (vermelha, verde e amarela) e influência do fotoperíodo. Dessas dietas apenas três foram favoráveis ao desenvolvimento completo do inseto e mesmo assim com baixas viabilidades. A melhor delas, contendo bagacilho de cana, germe de trigo e levedura, apresentou apenas 54%.

Para obter a oviposição em gaiolas, Alana (1999), testou um dispositivo de oviposição que consistia de uma malha parafinada de cor vermelha impregnada de suco de manga, em gaiolas (66 x 31 x 60 cm) com 3000 adultos. Entretanto, a viabilidade de ovos foi muito baixa (13%). Nas mesmas gaiolas, foram colocados 5

copos plásticos vermelhos com orifícios de 0,5 mm de diâmetro, preenchidos com papel de filtro negro umedecido e estando o copo invertido sobre placas de Petri com água, porém não foi observada boa disposição das fêmeas para oviposição.

Nuñez e Guzman (1999) relataram uma criação artificial na Colômbia (1994-1996) a partir de exemplares originários de frutos de café. As condições da sala de adultos foram 24°C, 70-80% de UR e fotofase de 10 h. As gaiolas (70 x 50 x 50 cm) de acrílico e malha na frente comportavam 6.700 adultos, contendo também água e dieta de adulto (40% de proteína hidrolisada da Bioserve Inc., 56% de açúcar, 2% de mistura fortificante de Vanderzant e 2% de sais de Wesson). A oviposição era feita em esferas de parafina com tela de algodão, vaselina (1 de parafina: 1 de vaselina) de cor amarela ou vermelha mais uma esponja umedecida por dentro. Os ovos eram removidos com uma solução de benzoato de sódio, sendo incubados em placas de Petri por 3-4 dias. A dieta larval era composta por torula tipo B (Bioserve Inc.) (6%), açúcar (6%), germe de trigo (6%), colesterol (0,05%), ágar (3%), nipagin (0,1%), benzoato de sódio (0,1%), água (70-80%) e HCl (0,5 mL) para manter o pH entre 3,7-4,0. Os ovos eram semeados levando-se em consideração 5 larvas/mg dieta. Depois de 10 dias, as larvas eram separadas do meio por lavagens e colocadas para pupar em vermiculita, permanecendo aí por 13 dias. Os resultados não foram satisfatórios, pois a viabilidade ovo-adulto foi apenas de apenas 9,5±4,9%, sendo também baixa a oviposição, além de altas perdas durante a incubação dos ovos e nos dois primeiros ínstares larvais.

Salles (1999) descreveu os procedimentos de criação adotados na Embrapa de Pelotas (Brasil). As gaiolas de adultos eram do tipo Peleg-Simon (200 x 60 x 35 cm), em salas a 25±2°C e 60-70% de UR. A dieta de adultos era composta de açúcar (100 g), proteína de milho (50 mL), água (300 mL) e mel (2 mL). Como substrato de oviposição utilizou "frutas artificiais" (8,5 g de Agar, 350 mL de água, 75 mL de suco de amora, 4 mL de Nipagin) no formato de bolas envoltas em película plástica. Coletados os ovos, estes eram incubados por 2 dias (±26°C) ou colocados imediatamente sobre a dieta larval (60g de germe de trigo, 60g de levedura de cerveja, 60g de açúcar, 1g de benzoato de sódio, 400 mL de água, 6 mL de ácido clorídrico a 37%, 8 mL de Nipagin a 10% em álcool, misturados com 10g de ágar em 400 mL de água quente) (SALLES, 1992). As pré-pupas eram retiradas com água corrente, cuja temperatura podia estar entre 10 e 35°C não se observando efeito negativo. As variações demográficas desta criação eram muito grandes devido a

uma série de problemas, sendo os resultados dessa forma de certo modo inconsistentes.

Jaldo et al. (2001) propõem um novo método para a criação em massa de *A. fraterculus* visando aumento da fertilidade e maior facilidade na criação, e o compara com quatro outros trabalhos: Nuñez e Guzman (1999), Salles (1992, 1999) e Gonzalez et al. (1971). Seu método alcança resultados superiores as demais dietas na eclosão de ovos (84%), na recuperação ovo-pupa (44%) e na quantidade de ovos por fêmea (625). Na emergência, Jaldo et al. (2001) não obtiveram resultado superior (68%) frente aos 99,5% de Gonzalez et al. (1971) e 76% de Nuñez e Guzman (1999). Porém este desempenho foi devido ao uso de diferentes ingredientes nas dietas larvais, enquanto Jaldo et al. (2001) usou levedura de cerveja, os demais utilizaram levedura *Torula*, deixando a dieta com um alto custo. A dieta de adulto era composta de proteína hidrolisada (10g), proteína de milho (10g), açúcar (40g), água (50 mL), vitaminas (500 mg) e, aminoácidos (1 mL). Depois de 10-14 dias iniciava-se a oviposição. Adultos eram mantidos nas gaiolas por 40 dias. O painel de oviposição era composto por tecido voal com 25 orifícios/cm, coberto com uma fina camada de silicone (0,55 mm de espessura) e uma espuma externa (0,01 x 0,9 x 0,6 m) umedecido com uma mistura de água e suco de pêssigo (3:1) evitando assim a desidratação e atraindo as fêmeas. Após 24 h, a espuma era removida e lavada para retirada dos ovos. Estes eram incubados em placas de Petri com papel de filtro úmido por 48 h a 23-26 °C. A dieta larval era a de Salles (1992), com a adição de estreptomicina (1g: 1000g). Eram semeados de 8 a 10 ovos/g dieta. Dezesesseis dias depois, a pupação ocorria em areia. A criação foi levada nessas condições por 18 gerações sem problemas. O controle de qualidade seguiu o padrão da FAO/IAEA/USDA (1998). A viabilidade total média foi de 44%.

Vera et al. (2007) seguiram as condições propostas por Jaldo et al. (2001), porém fixando a umidade relativa da sala de criação em 80% obteve melhor resultado na recuperação ovo-pupa. No mesmo trabalho, incorporou o bagaço de cana na dieta larval, mas não obteve resultado satisfatório como o do ágar. A colônia inicial foi estabelecida a partir de goiabas infestadas coletadas em 1997 e desde então, sem nenhuma introdução de material selvagem. A sala de adultos foi mantida em condições controladas ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $80\pm 10\%$  de UR e fotofase de 12hs). As gaiolas eram montadas com 10.000 pupas (aproximadamente 4.060 fêmeas) e providas de água e dieta. A coleta de ovos começa uma semana após a emergência dos adultos,

sendo os ovos coletados 3 vezes/semana com uma esponja. Em seguida, os ovos eram aerados em Becker (1:100) por 48hs, semeados na dieta larval (SALLES, 1992) numa densidade de 11 ovos/g dieta. Depois de 5 dias, bagaço de cana era adicionado à dieta para permitir a saída das pré-pupas (7º dia), e pupação em areia colocada ao redor das bandejas. A maturação das pupas levava 10-12 dias. A partir de junho de 2004, 90.000 ovos eram semeados por semana para se obter um número suficiente de pupas (60.000) para manutenção da colônia. A produção média de ovos era de 1 milhão/semana e de 2,4 mL de ovos/gaiola (1 mL ovos= 14.900 ovos). A viabilidade de ovos ficava em torno de 84%, viabilidade total de 56%, peso pupal (2 dias antes de emergência dos adultos) de 13 mg e proporção sexual de 0,93.

No CENA/USP, foi estabelecida uma colônia de *Anastrepha fraterculus* a partir de frutos uvaia (*Eugenia pyriformis*) (WALDER et al., 2006), utilizando como dieta larval a proposta por Salles (1992). As três primeiras gerações em laboratório foram obtidas sobre frutos de mamão. Nas gerações seguintes (F4 a F7), a produção média foi de 7.553 ovos/geração; viabilidade de ovos de 28,1%; recuperação de pupas menor que 10% e emergência de adultos em 59,5%. Fazendo algumas modificações na metodologia de criação, foi possível obter ganhos na produção. A produção de ovos/geração saltou de 5,45 mL na F10 para 60,8 mL na F17, porém a viabilidade permaneceu em 24 a 30%, e, quanto às pupas, de 10,5 mL na F10 para 3.000 mL na F17. A emergência de adultos manteve-se alta (80 a 93%) com razão sexual em 0,54 (WALDER et al., 2008).

Como *A. fraterculus* apresenta um alto índice de variabilidade entre populações devido a diferenças de aspectos morfológicos e genéticos (MALAVASI; MORGANTI, 1982, STECK, 1999), representando o “complexo *fraterculus*” (SELIVON; PERONDINI, 1998), optou-se por coletar espécimes de um único hospedeiro (uvaia – *E. pyriformis*) e de uma única planta. Este material permaneceu em pequenas gaiolas (30x30x30) desde 2005 para a “domesticação” em laboratório (WALDER et al., 2006). Em 2007, espécimes desta colônia foram enviados para o Instituto de Biociências da USP os quais foram identificados como sendo de uma única espécie críptica do complexo *fraterculus*: *A. sp.1 aff. fraterculus*. (WALDER et al., 2008).

Braga Sobrinho (2009) testou oito diferentes dietas para larvas de *A. fraterculus* com o objetivo de encontrar uma dieta eficiente e econômica. De oito,

cinco dietas foram testadas em maior escala, nessa fase, duas dietas tiveram como componente estrutural o farelo de trigo e fonte de proteína o levedo de cerveja e as outras três tiveram o bagaço de cana como componente estrutural e a proteína de soja como fonte de proteína. Como dieta controle foi utilizada a de Salles (1999). Seus resultados concluem que, dietas para larvas tendo como componente estrutural o bagaço de cana-de-açúcar e como fonte de proteína a proteína de soja, com percentual de 13 % apresentaram resultado semelhante as que continham 18 % de proteína. Sugeriu que o uso da dieta com 13 % de proteína atende perfeitamente ao desenvolvimento das moscas-das-frutas, por apresentarem resultados favoráveis de recuperação de pupas, peso de pupas e emergência e viabilidade de adultos.

### 2.3 Técnica do Inseto Estéril

A TIE - Técnica do Inseto Estéril (Sterile Insect Technique - *S.I.T.*) é considerada um tipo de controle biológico autocida ou genético, onde a praga é empregada para seu próprio controle, pois insetos estéreis competem no processo de acasalamento com os selvagens férteis e conseqüentemente causa, gradativamente, uma redução populacional, podendo chegar até a uma erradicação (KNIPLING, 1955).

A TIE é utilizada em vários países para o controle, supressão e até mesmo erradicação de pragas da agricultura, pecuária e saúde pública. A introdução desta técnica no controle de pragas contribuiu para o desenvolvimento e até mesmo a criação de novas áreas entomológicas tais como a de criação de insetos em meios artificiais (produção massal), ecologia e simulação populacional, controle de qualidade, radioentomologia, dentre outras (WALDER, 2000). É considerada como um dos mais significativos eventos deste século na área entomológica, juntamente com o isolamento e uso do patógeno *Bacillus thuringiensis* e a descoberta do inseticida DDT (RIDGWAY et al., 1992), sendo hoje uma técnica consagrada e difundida pelos muitos exemplos de sucesso obtidos (KLASSEN et al., 1994).

Como a TIE é baseada na liberação de expressiva quantidade de insetos estéreis (milhões), conclui-se daí que a estratégia de criação massal dos mesmos é fator limitante. A primeira aplicação com sucesso da TIE, erradicando a mosca da

bicheira (*Cochliomyia hominivorax*), só foi possível após anos de pesquisas para viabilizar sua criação massal por meios artificiais (MELVIN; BUSHLAND, 1941).

Segundo a International Plant Protection Convention (IPPC) (FAO, 2005), a Técnica do Inseto Estéril é definida como um “método de controle de pragas usando liberações inundativas de insetos estéreis em área-ampla visando reduzir a fertilidade de uma população selvagem da mesma espécie”. Em outras palavras, pode-se dizer que a TIE é composta de 3 etapas: (1) produção massal da espécie-alvo, (2) esterilização dos insetos, (3) liberação no campo. A transferência de esperma com mutações letais dominantes para as fêmeas selvagens inviabiliza a geração seguinte, os machos estéreis provocam uma gradativa diminuição da população selvagem.

A esterilização dos insetos nos programas que empregam a TIE tradicionalmente não é feita por meio de quimioesterilizantes, uma vez que estes podem causar problemas tóxicos e oncológicos aos organismos e aparecimento de resistência por parte dos insetos tratados, além do fato de que a liberação de milhões de insetos quimioesterilizados representaria uma verdadeira agressão ao ambiente (LaBRECQUE; SMITH, 1968).

O método de esterilização que vem sendo mais empregado mundialmente é o por radiação ionizante. Esta pode ser proveniente de radioisótopos como  $^{60}\text{Co}$  ou  $^{137}\text{Cs}$  (dois raios gama com energias de 1,17 e 1,33 MeV no Cobalto, e 0,66 MeV no Césio), elétrons gerados por aceleradores que operem com energia menor que 10 MeV, e raios-X gerados por feixe de elétrons de energia abaixo de 5 MeV (WALDER, 2000). Radiações geradas nessas faixas de energia (abaixo de 5 MeV para fótons e 10 MeV para elétrons) evitam a indução de radioatividade nos materiais irradiados (BAKRI et al., 2005a). Nêutrons são mais efetivos que raios-X e gama para a esterilização de insetos (HOOPER, 1971). Entretanto, pelo fato de nêutrons poderem facilmente induzir radioatividade e pela imobilidade e mais difícil disponibilidade de reatores nucleares (fonte usual de nêutrons), o seu uso não seria prático na maioria dos projetos envolvendo a TIE. Basicamente, quando um material biológico é irradiado, são formados radicais livres e provocando quebras nos cromossomos. Quando estas quebras ocorrem nas células germinativas, isso leva à indução de mutações letais dominantes nos óvulos e espermatozoides (LaCHANCE, 1967; CURTIS, 1971). Podem-se citar as seguintes vantagens ao se usar radiação para esterilizar insetos: o aumento de temperatura durante o processo é



insignificante, os insetos estéreis podem ser liberados imediatamente após terem sido tratados, a irradiação não deixa resíduos nocivos, e pode ser feita com os insetos já embalados (BAKRI et al., 2005b).

Pelo menos 20 programas de manejo integrado em área-ampla (Area-Wide Integrated Pest Management, ou AW-IPM) no mundo integram a TIE no controle de moscas-das-frutas (ENKERLIN, 2005). Eles podem ser agrupados, segundo a opção estratégica utilizada, em quatro grupos (FAO, 2003):

- (1) erradicação (consiste na eliminação de uma praga de uma determinada área),
- (2) supressão (redução da população da praga),
- (3) contenção (aplicação de medidas fitossanitárias e regulamentos em uma área infestada para evitar a dispersão da praga) e;
- (4) prevenção (aplicação de medidas fitossanitárias e regulamentos visando prevenir a introdução ou re-invasão da praga em uma área livre)

### **2.3.1 Radioesterilização de Moscas-das-Frutas**

Nos programas de TIE, moscas da família Tephritidae vêm sendo tradicionalmente irradiadas 1 ou 2 dias antes da emergência do adulto pois a irradiação em estádios pupais mais novos tende a gerar moscas de menor qualidade em relação à propensidade de acasalamento, vôo e produção de feromônio sexual (FLETCHER; GIANNAKAKIS, 1973). A cor do pigmento dos olhos da pupa de *C. capitata* pode ser utilizada como um indicador rápido e confiável do momento apropriado para a irradiação (RUHM; CALKINS, 1981), e técnicas como anoxia ou baixa temperatura são utilizadas durante a irradiação, para minimizar efeitos colaterais na biologia ou comportamento do inseto, principalmente sobre a longevidade, comportamento sexual e dispersão (LABRECQUE; KELLER, 1965).

Há biofábricas em operação na Argentina, Chile, Peru, Guatemala, México, Estados Unidos, Portugal, África do Sul, Tailândia e Espanha (KLASSEN; CURTIS, 2005). No Brasil, a Biofábrica Moscamed Brasil, localizada em Juazeiro, Bahia, foi inaugurada em agosto de 2006 com o objetivo de aplicar a TIE na supressão de *C. capitata*, *A. fraterculus*, *Cydia pomonella* e *Haematobia irritans* (MOSCAMED, 2006).

Doses de irradiação para atingir 99,9% da esterilidade de machos liberados foram determinadas para as larvas de: *Cochliomya hominivorax* (Coquerel) (KNIPLING, 1955); mosca-das-frutas do Mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (HOOPER, 1972; OHINATA et al., 1977; ZUMREOGLU et al., 1979; WILLIAMSON et al., 1985); *A. ludens* (RHODE et al., 1961), *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (GONZÁLEZ et al., 1971); mosca-das-frutas do Caribe, *Anastrepha suspensa* (Loew) (BURDITT et al., 1975); e *A. serpentina* (TOLEDO, 1992).

Geralmente, doses de irradiação para moscas do gênero *Anastrepha* são menores do que aquelas aplicadas para atingir 99,9% esterilidade em *C. capitata*, porém existem diferenças entre as espécies de *Anastrepha*, em relação aos requisitos de esterilização determinados. Este fato provavelmente pode ser atribuído às diferenças existentes em sua biologia básica e demografia (CELEDONIO-HURTADO et al., 1988; LIEDO; CAREY, 1996; ALUJA et al., 2000).

Atualmente, existe apenas um estudo publicado sobre os efeitos da irradiação em *A. obliqua* (TOLEDO, 1993). Este trabalho foi realizado utilizando moscas selvagens e indução à esterilidade de machos irradiados (teste de Fried) e em grupo de moscas não irradiadas, nada foi relatado. Em uma recente revisão sobre o comportamento de acasalamento da mosca-das-frutas do Mediterrâneo, no contexto da técnica do inseto estéril, Hendrichs et al. (2002) concluíram que, embora a mosca-do-mediterrâneo esterilizada e vinda de criações massais entre e compita nas agregações de acasalamento (leks), transferência de esperma, e induza as fêmeas à reação refratária e esterilidade na descendência, estas são claramente menos competitivas do que os machos selvagens. Mudanças comportamentais parecem ser causadas pelas condições de criação massal, pelo processo de irradiação e pelos anos em que uma estirpe é realizada na colonização (CAYOL, 2000). Em particular, altas doses de irradiação causam uma dupla redução no desempenho de machos estéreis, comparado com os machos não irradiados (MORENO et al., 1991; LUX et al., 2002a), enquanto as condições de criação massal, e o número de gerações de uma estirpe realizada na colonização, pode ou não ter um efeito sobre o desempenho no acasalamento de machos estéreis e características relacionadas (MORENO et al., 1991; CAYOL, 2000; LUX et al., 2002b).

É, portanto, necessário investigar não apenas quais doses de irradiação são necessárias para atingir 99,9% da esterilidade em machos de moscas de

*A. fraterculus*, mas também saber em que doses o desempenho de machos estéreis começa a ser afetado negativamente.

## REFERÊNCIAS

ALANA, D. Ensayos para determinar niveles de oviposición de *Anastrepha fraterculus* (Wied) sobre fruta y dispositivos artificiales. 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. 79-83. (TECDOC, 1064).

ALUJA, A.; PIÑERO, M. J.; JACOME, I.; DÍAZ-FLEISHER, F.; SIVINSKI, J. Behavior of flies in the genus *Anastrepha*. In: ALUJA, M.; NORRBOM, A. L. **Fruit flies (Tephritidae) phylogeny and evolution of behavior**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 375-406.

BAKRI, A.; MEHTA, K.; LANCE, D. R. Sterilizing insects with ionizing radiation. In: DYCK, V. A.; HENDRICHS, J.; ROBINSON, A. S. (Ed.). **Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management**. Berlin: Springer, 2005a. p. 233-269.

BAKRI, A.; HEATHER, N.; HENDRICHS, J.; FERRIS, I. Fifty years of radiation biology in entomology: lessons learned from IDIDAS. **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 98, n. 1, p. 1-12, 2005b.

BATEMAN, M. A. The ecology of fruit flies. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 17, p. 493-511, 1972.

BERNAYS, E. Regulation of feeding behavior. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. London: Pergamon Press, 1985. p. 1-45.

BLEICHER, J.; GASSEN, D. N.; RIBEIRO, L. G.; TANAKA, H.; ORTH, A. I. **A mosca-das-frutas em macieira e pessegueiro**. Florianópolis, SC EMPASC, 1982. 28 p. (Boletim Técnico, 19).

BRAGA SOBRINHO, R.; GUIMARÃES, J. A.; MESQUITA, A. L. M.; ARAÚJO, K. L. B. **Desenvolvimento de dietas para a criação massal de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009. 23 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 33).

BURDITT JUNIOR, A. K.; LOPEZ, D. F.; STEINER, L. F.; VON WINDEGUTH, D. L.; BARANOWSKI, R.; ANWAR, M. Application of sterilization techniques to *Anastrepha suspensa* Loew in Florida, USA. In: SYMPOSIUM ON THE STERILITY PRINCIPLE FOR INSECT CONTROL, Innsbruck, 1974, Vienna. **Proceedings...** Vienna: IAEA, 1975. p. 93-101.

CALKINS, C. O.; WEBB, J. C. Temporal and seasonal differences in movement of Caribbean fruit fly larvae in grapefruit and the relationship to detection by acoustics. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 77, p. 409-416, 1988.

CANAL DAZO, N.; KOVALESKI, A.; ZUCCHI, R. A. Levantamento de moscas-das-frutas (Diptera:Tephritidae) em pomares de maçãs em Vacaria, RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 14., 1993, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SEB; FEALQ, 1993. p. 24.

CAYOL, J. P. Changes in sexual behavior and life history traits of tephritid species caused by mass-rearing processes. In: ALUJA, M.; NORRBOM, A. L. **Fruit flies (Tephritidae) phylogeny and evolution of behavior**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000. p. 843-860.

CELEDONIO-HURTADO, H.; LIEDO, P.; GUILLEN, J.; BERRIGAN, D.; CAREY, J. Demography of *Anastrepha ludens*, *A. obliqua* and *A. serpentina* (Diptera: Tephritidae) in Mexico. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 71, p. 111–120, 1988.

CHANG, C. L.; CACERES, C.; JANG, E. B. A novel liquid larval diet and its rearing system for melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 97, p. 524-528, 2004.

CHANG, C. L.; VARGAS, R. I.; CACERES, C.; JANG, E.; CHO, I. K. Development and assessment of a liquid diet for *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 99, n. 6, p. 1191-1198, 2006.

CLARKE, G.M.; MCKENZIE, L.J. Fluctuating asymmetry as a quality control indicator for insect mass rearing processes. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, p. 2045-2050, 1992.

CURTIS, C. F. Induced sterility in insects. **Advances in Reproductive Physiology**, London, v. 5, p. 120-165, 1971.

DA SILVA, N. M.; SILVEIRA NETO, S.; ZUCCHI, R. A. The natural host plant of *Anastrepha* in the state of Amazonas, Brasil. In: MCPHERON, B. A.; STECK, 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. Nutrition: organisms. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. London: Pergamon Press, 1985. p. 313-389.

ENKERLIN, W. R. Impact of fruit fly control programmes. In: DYCK, V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. **Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management**. Berlin: Springer, 2005. p. 651-700.

FAY, H. A. C.; WORNOPORN, V. Inert reusable substrates as potential replacements for wheat bran in larval diets for Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wiede.) (Dipt, Tephritidae). **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v. 126, p. 92-96, 2002.

FAO/IAEA/USDA. **Manual for product quality control and shipping procedures for sterile mass-reared Tephritid fruit flies**. Version 5.0. Vienna, Austria: IAEA, 2003. 84 p.

FAO. **Glossary of phytosanitary terms**. Provisional additions. Rome: FAO/IPPC, 2005.

FLETHER B. S.; GIANNKAKIS A. Factors limiting the response of females of the Queensland fruit fly, *Dacus tryoni*, to the sex pheromone of the male. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 19, n. 5, p. 1147-1155, 1973.

GONZÁLEZ, B. J.; VARGAS, V. C.; JARA, P. B. Estudios sobre la aplicación de la técnica de machos estériles en el control de la mosca sudamericana de la fruta *Anastrepha fraterculus* (Wied.). **Revista Peruana de Entomología**, Lima, v. 14, p. 77-83, 1971.

HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S.; CAYOL, J. P.; ENKERLIN, W. Medfly area-wide sterile insect technique programmes for prevention, suppression or eradication: the importance of mating behaviour studies. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, p. 1-13, 2002.

HOOPER, G. H. S. Sterilization and competitiveness of the Mediterranean fruit fly after irradiation of pupae with fast neutrons. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 64, p. 1369-1372, 1971.

HOOPER, G. H. S. Sterilization of the Mediterranean fruit fly with gamma radiation effect on male competitiveness and change in fertility of females alternately mated with irradiated and untreated males. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 65, p. 1-6, 1972.

HSIAO, T. H. Feeding behavior. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. London: Pergamon Press, 1985. p. 471-512.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS - IBRAF. **Comparativo das Importações Brasileiras de Frutas Frescas 2008**. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br>. Acesso em: [http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est\\_frutas.asp](http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp)

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

KLASSEN, W.; LINDQUIST, D. A.; BUYCKS, E. J. Overview of the Joint FAO/IAEA Division's involvement in the fruit fly insect technique programs. In: CALKINS, C. O.; KLASSE, W.; LIEDO, P. (Ed.). **Fruit flies and the sterile insect technique**. Boca Raton, FL: CRS Press, 1994.

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**, College Park, v. 48, p. 459-462, 1955.

LA BRECCHE, G. C.; SMITH, C. N. **Principles of insect chemosterilization**. New York: Appleton Century Crofts, 1968. 353 p.

LABRECQUE, G. C.; KELLER J. C. **Advances in insects' population control by the sterile-male technique**. Vienna, Austria: IAEA, 1965. 43 p. (Technical Report Series, 44).

LACHANCE, L. E. The induction of DLM in insects by ionizing radiation and chemicals- as related to the sterile male technique of insect control. In: WRIGHT, J. W.; PAL, R. (Ed.). **Genetics of insect vectors of disease**. Amsterdam: Elsevier, 1967. p. 617-650.

LIEDO, P.; CAREY, J. R. Demography of fruit flies and implications to action programs. In: MCPHERON, B. A.; STECK, G. J. **Fruit fly pests a world assessment of their biology and management**. Delray Beach, FL: St. Lucie Press, 1996. p. 299-308.

LUX, S. A.; VILARDI, J. C.; LIEDO, P.; GAGGL, K.; CALCAGNO, G. E.; MUNYIRI, F. N.; VERA, M. T.; MANSO, F; Effects of irradiation on the courtship behavior of medfly mass reared for the sterile insect technique. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, p. 102–112, 2002a.

LUX, S. A.; MUNYIRI, F. N.; VILARDI, J. C.; LIEDO, P.; ECONOMOPOULOS, A. P.; HASSON, O.; QUILICI, S.; GAGGL, K.; CAYOL, J. P.; RENDON, P. Consistency in courtship pattern among populations of medfly *Ceratitidis capitata* comparison among wild strains and strains mass-reared for SIT operations. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, p. 113–125, 2002b.

MACHADO, A. E.; SALLES, L. A. B.; LOECK, A. E. Exigências térmicas de *nastrepha fraterculus* (Wied.) e estimativa do número de gerações em Pelotas, RS. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 24, p. 573-579, 1995.

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

MARTINS, J. C. **Aspectos biológicos de Anastrepha fraterculus (Wied., 1830). (Diptera-Tephritidae) em dieta artificial sob diferentes condições de laboratório**. 1986. 79 p. Tese (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1986.

MELVIN, R.; BUSHLAND, R. C. The nutritional requirements of screw-worm larvae. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 33, p. 850-852, 1941.

MITTLER, T. E.; TSITSIPIS, J. A. Economical rearing of larvae of the olive fruit fly, *Dacus oleae*, on a liquid diet offered on cotton toweling. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 16, p. 292-293, 1973.

MORENO, D. S.; SÁNCHEZ, M.; ROBACKER, D. C.; WORLEY, J. Mating competitiveness of irradiated Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 84, p. 1227–1234, 1991.

MOSCAMED. **Relatório Anual 2006**. Juazeiro, Bahia: Moscamed Brasil, 2006. 47 p.

NORA, I.; HICKEL, E. R.; PRANDO, H. O. Ocorrência de moscas-das-frutas em Santa Catarina. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: Conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000.

NUÑEZ, L.; GUZMAN, R. Avances sobre la cria artificial de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera:Tephritidae) en Colombia. 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. 85-94. (TECDOC, 1064).

OHINATA, K.; ASHRAF, M.; HARRIS, E. J. Mediterranean fruit flies sterility and sexual competitiveness in the laboratory after treatment with gamma irradiation in air, carbon dioxide, helium, nitrogen or partial vacuum. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 70, p. 165–168, 1977.

PARRA, J. R. P.. Criação massal de inimigos naturais. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Barueri: Manole, 2002. cap. 9, p. 143-161.

RIDGWAY, R. L.; INSCOE, M. N.; THORPE, K. W. Advances and trends in managing insects pesps. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Management of insect pests: nuclear and related molecular and genetic techniques**. Vienna, Austria: FAO/IAEA, 1992. p. 3-15.

RHODE, R. H.; LOPEZ, D. F., EGUISA, F., TELICH, J. Effect of gamma radiation on the reproductive potential of the Mexican fruit fly. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 54, p. 202–203, 1961.

RUHM, M. E.; CALKINS, C. O. Eye-color changes in *Ceratitis capitata* pupae, a technique to determine pupal development. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 29, p. 237-240, 1981.

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

SALLES, L. A. B. **Bioecologia e controle da mosca-das-frutas sul-americana**. Pelotas, RS: EMBRAPA, CPACT, 1995. 58 p.

SALLES, L. A. B. Rearing of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann). The South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Wied.); advances in artificial rearing,taxonomic status and biological studies. 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. 95-100. (TECDOC, 1064).

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**, Columbus, v. 91, p. 473-478, 1998.

SIMPSON, S. J.; SIMPSON, C. L. The mechanisms of compensation by phytophagous insects. In: BERNAYS, E. A. (Ed.). **Insect-plant interactions**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. v. 2, p. 111-160.

SLANSKY, F.; SCRIBER, J. M. Food consumption and utilization. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. London: Pergamon Press, 1985. p. 89-163.

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).

STOFFOLANO, J. G. Regulation of a carbohydrate meal in adult Diptera, Lepidoptera, and Hymenoptera. In: CHAPMAN, R. F.; BOER, G. de (Ed.). **Regulatory mechanisms in insect feeding**. London: Chapman & Hall, 1995. p. 210-247.

TOLEDO, A. J. **Dosis óptima de irradiación a pupas de *Anastrepha serpentina* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) para la obtención de adultos estériles sexualmente competitivos**. 1992. 68 p. Tesis (Maestría en Ciencias) - Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, México, 1992.

TOLEDO, A. J. Optimum dosage for irradiating *Anastrepha obliqua* pupae to obtain highly competitive sterile adults. In: ALUJA, M.; LIEDO, P. (Ed.). **Fruit flies: biology and management**. New York: Springer-Verlag, 1993. p. 301-304.

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

WALDER, J. M. M. **Técnica do Inseto Estéril - Controle genético**. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: Conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 151-158.

WALDER, J. M. M.; SILVA, L. C. S.; COSTA, M. L. Z.; MASTRANGELO, T. de A. Developing mass rearing system for *Anastrepha fraterculus* and *Anastrepha obliqua* for future SIT- AWIPM procedures in Brazil. In: RCM OF THE CO-ORDENATED RESEARCH PROJECT ON DEVELOPMENT OF MASS REARING FOR NEW-WORLD (*ANASTREPHA*) AND ASIAN (*BACTROCERA*) FRUIT FLY PESTS IN SUPPORT OF SIT, 2., 2006, Salvador, Bahia. **Papers...** Vienna, Austria: IAEA, 2006.

WALDER, J. M. M.; COSTA, M. L. Z.; ALCARDE, L. D.; COSTA, K. Z.; CANALE, R. A.; MASTRANGELO, T. de A.; LOPES, L. A.; KAMIYA, A. C. Desenvolvimento de sistema de criação massal para *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 22., 2008, Uberlândia. **Resumos...** Uberlândia: SBE, 2008. 1 CD-ROM.

WILLIAMSON, D. L.; MITCHELL, S.; SEO, S. T. Gamma irradiation of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) effects of puparial age under induced hypoxia on female sterility. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 78, p. 101-106, 1985.



ZUCCHI, R. A. Espécies de *Anastrepha*, sinónimas, plantas hospedeiras e parasitóides. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**: Conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 41-48.

ZUCOLOTO, F. S. **Alimentação e nutrição de moscas-das-frutas**. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**: Conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 67-80.

ZUMREOGLU, A.; OHINATA, K.; FUJIMOTO, M.; HIGA, H.; HARRIS, E. J. Gamma irradiation of the Mediterranean fruit fly effect of treatment of immature pupae in nitrogen or emergence, longevity, sterility, sexual competitiveness, mating ability and pheromone production of males. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 72, p. 173–176, 1979.

### 3. CAPITULO 1:

#### **Criação da Mosca-Sul-Americana *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus* (Wied.,1830) (Diptera: Tephritidae) em Dieta Líquida**

##### **3.1. Resumo**

Programas de controle de pragas, como a Técnica do Inseto estéril ou a liberação de parasitóides, só são possíveis quando a criação desses insetos em grandes quantidades apresenta viabilidade econômica, sendo o custo muitas vezes, fator decisivo na viabilidade ou não da implementação de um programa. A substituição do ágar é bastante estudada devido ao fato deste componente representar cerca de 60-70% do custo total da dieta. O objetivo deste trabalho foi estabelecer protocolos para criação artificial de *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus* em dieta larval líquida que permita atingir níveis de criação massal, para uma possível redução no custo da criação. Foram testadas sete dietas em relação à dieta convencional utilizada no laboratório de Radioentomologia do CENA/USP, que foi usada como controle. Todas as sete dietas tiveram em comum a exclusão do ágar na sua formulação, em substituição, usou-se um pano esponja vegetal sobre um telado plástico separando o pano e o fundo do recipiente da dieta. Das sete dietas testadas somente duas foram adequadas para o desenvolvimento larval da mosca-sul-americana. Cinco delas apresentaram problemas de ordem física por estarem excessivamente líquidas ou pegajosas, sendo o desenvolvimento das larvas nulo ou insuficiente. As duas dietas consideradas adequadas, quando comparadas com a dieta padrão apresentaram resultados inferiores com relação ao volume de larvas recuperadas, emergência e o peso das pupas, porém, não apresentaram diferenças significativas quanto aos períodos de desenvolvimento, recuperação pupal, razão sexual e longevidade sob estresse. Conclui-se que é possível a substituição da dieta com ágar por dietas líquidas para criação artificial de *A. sp.1 aff. fraterculus*, de custo reduzido e com maior praticidade de manejo. Embora seja possível obter um ciclo completo da mosca-sul-americana em dieta artificial líquida para larvas, seus parâmetros de qualidade avaliados foram inferiores aos da dieta padrão com ágar, portanto, são necessários para sua utilização, maiores testes futuros principalmente quanto à adaptabilidade do inseto ao novo meio.

Palavras-chave: *Anastrepha fraterculus*. Moscas-das-frutas. Criação de insetos. Dieta artificial.

### 3.2. Abstract

Pest control programs, such as the sterile insect technique or the release of parasitoids, are only possible when creating these insects in large quantities present economic feasibility, cost is often a decisive factor in the viability or otherwise of the implementation of a program. The substitution of agar is widely studied, because this component represents about 60-70% of the total diet. The aim of this study was to establish protocols for artificial rearing of *Anastrepha sp.1 aff. fraterculus* in liquid larval diet that will achieve levels of mass production, to a possible reduction in the cost of creation. Seven experimental diets compared to the conventional diet used in laboratory Radioentomologia of CENA / USP, which was used as control. All seven diets have in common the exclusion of the agar in the formulation; instead, he used a damp sponge plant on a plastic mesh separating the bottom of the dish cloth and diet. Of the seven diets tested only two were suitable for larval development of the South American fly. Five had physical ailments because they are excessively liquid or sticky, and the development of larvae invalid or insufficient. The two diets considered adequate when compared with the standard diet showed inferior results with respect to the volume of recovered larvae, pupae and weight of emergency, however, no significant differences regarding the periods of development, sex ratio and longevity under stress. It is possible to replace the diet with agar for liquid diets for artificial rearing of *A. sp.1 aff. fraterculus*, reduced cost and greater convenience of handling. Although it is possible to obtain a complete cycle of the South American fly in liquid artificial diet for the larvae, their quality parameters were lower than the standard diet with agar, therefore, are required to use, more especially as to future tests of adaptability insect to the new environment.

Keywords: *Anastrepha fraterculus*. Fruits fly. Insects rearing. Artificial diets.

### 3.3. Introdução

Para que programas de controle de pragas que envolvam a TIE ou o uso de inimigos naturais se torne viável a um número cada vez maior de pragas, é necessário primeiramente o desenvolvimento da criação massal da praga. No caso das moscas-das frutas, a criação massal tem obtido êxito para várias espécies pragas, porém, quando se tratam de criações massais, é de suma importância buscar facilidades na produção e redução nos custos, sendo o custo muitas vezes, fator decisivo na viabilidade ou não da implementação de um programa.

A criação de moscas-das-frutas através de uma dieta líquida tem sido objetivo de programas de criação massal de trefitídeos. Este tipo de dieta com um sistema de substrato reciclável aliviaria muitos problemas com a criação. A redução de espaço físico necessário numa biofábrica para estoque de substratos como o bagaço de cana e a redução do custo de produção no caso da substituição do ágar, são alguns exemplos das vantagens que uma dieta líquida poderia trazer (CHANG, 2006).

A substituição do ágar é bastante estudada devido ao fato deste componente representar cerca de 60-70% do custo total da dieta. Possíveis substitutos do ágar foram discutidos por Leppla (1989) onde vários agentes gelificantes como alginatos, gelatinas, gomas, glutinas, lecitina de soja foram e têm sido testados, mas nem sempre com sucesso. A carragininina, mais barata que o ágar, obteve maior sucesso entre eles e já substitui o ágar na composição de várias dietas. Parra (2001) cita que em algumas dietas pode-se substituir o ágar por bagacilho de cana, pó de serra, etc. Entretanto, podem surgir problemas com o conteúdo de água na dieta e no primeiro caso, com infestação de ácaros.

Chang et al. (2004) relata que o maior problema para a conversão para uma dieta totalmente líquida é encontrar um substrato para o desenvolvimento dos primeiro e segundo ínstaes. O uso de substratos como agarose, algodão, papel, ou toalha de algodão têm sido usados para dietas líquidas de insetos, porém com alta mortalidade e baixo rendimento relatados em alguns estudos (HALANDA, 1976; BRONW; SNOW, 1978; TSITSIPIS; KONTOS, 1983; OCHIENG et al., 1987; LETARDI; CAFFARELLI, 1990).

De acordo com Parra (2002), é fundamental que as atividades de produção e comercialização de insetos para programas de manejo de praga mantenham o respaldo técnico para ter credibilidade junto aos clientes e à comunidade, que ainda

têm pouco acesso a essa forma de controle de pragas. Na intenção de reduzir custos, a qualidade do produto não pode ser inferiorizada. A dieta deve ser adequada a produção de milhões de insetos com qualidade biológica similar aos encontrados na natureza. (CLARKE; McKENZIE, 1992; BIGLER, 1994). O sucesso destes insetos no campo é fundamental para que técnicas de controle biológico e a TIE se difundam entre os produtores e o baixo desempenho resultaria numa propaganda negativa e comprometeria todo um programa desenvolvido ao longo de muitos anos de pesquisa. (CLARKE; McKENZIE, 1992; PREZOTTI; PARRA, 2002). Assim, a qualidade dos insetos e o custo devem ser balanceados de modo a se criar uma relação custo-benefício atraente o bastante para competir com o controle químico.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer protocolos para criação artificial de *A. fraterculus* em dieta larval líquida que permita atingir níveis de criação massal (>1 milhão de adultos/geração) para uma possível redução no custo da criação.

### **3.4. Material e Métodos**

#### **3.4.1 Insetos**

Os insetos foram provenientes da colônia estabelecida no Laboratório de Radioentomologia do CENA/USP (WALDER et al., 2008) identificados com sendo *Anastrepha* sp. 1 *aff. fraterculus* e criadas em dieta semi-líquida por mais de 30 gerações até o presente trabalho

#### **3.4.2 Dietas**

Foram testadas sete dietas em relação à dieta convencional utilizada no laboratório de Radioentomologia do CENA/USP (WALDER et al., 2008), que foi usada como padrão ou controle. Todas as sete dietas tiveram em comum a exclusão do ágar na sua formulação.

As dietas testadas foram baseadas na dieta padrão (D2-D5) e na dieta líquida (D6 e D7) de Chang et al. (2004) desenvolvida para a mosca do melão (*Bactrocera cucurbitae*). Em todas as dietas testadas, o substrato utilizado em substituição ao ágar foi a esponja vegetal sobre um telado plástico que fez a separação entre o

pano e o fundo do recipiente da dieta, conforme metodologia de Chang et al. (2004).(Figura 3.1)

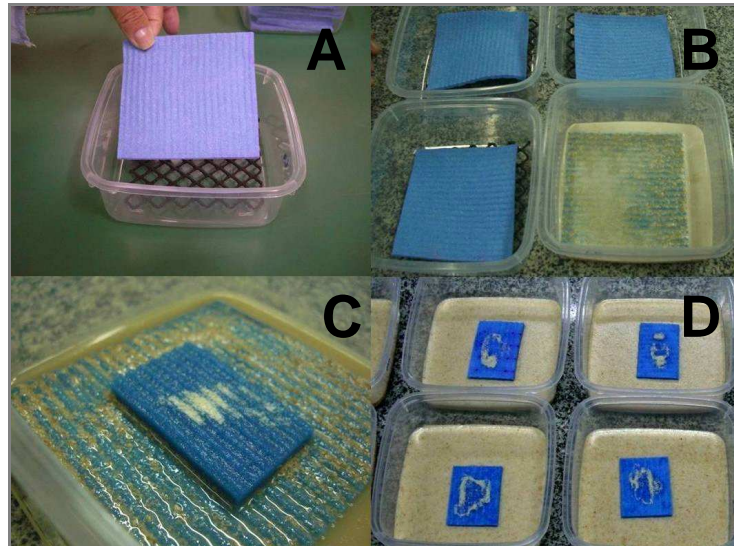


Figura 3.1 - (A) Recipiente de dieta com grade e pano esponja vegetal usados como suporte e substrato, respectivamente. (B) Recipiente com a dieta líquida. (C) Recipiente com a dieta líquida e ovos sobre a esponja vegetal (D) Dieta controle com ágar

Para cada dieta foram feitas 4 repetições em recipientes contendo 150 mL de dieta para 0,1 mL de larvas, aproximadamente 1.000 larvas. A descrição dos ingredientes das dietas consta da Tabela 3.1.

Com exceção da Dieta 1 utilizada como padrão, todas as demais foram preparadas adicionando-se todos os ingredientes em liquidificador e misturados por 3 minutos para homogeneização. Posteriormente, 150 mL foi despejado em cada recipiente de dieta ficando pronta para a sementeira dos ovos. No caso da padrão, Dieta 1, separou-se metade da água para a fervura e dissolução total do ágar e a outra metade para bater os demais ingredientes em liquidificador por 3 minutos, rapidamente misturou-se a solução com ágar aos demais ingredientes batidos e despejou-se 150 mL em cada recipiente de dieta. Em dietas a base de ágar como agente solidificante, foi necessário esperar o esfriamento da dieta para a adição dos ovos.

### 3.4.3 Coleta e incubação de ovos

Os ovos foram coletados de gaiolas matrizes mantidas em sala sob temperatura de 26-27 °C, umidade relativa do ar em 60-75% e iluminação externa de 10.000 lux com 10 horas fotofase (WALDER, 2002). A retirada dos ovos da tela de

oviposição da gaiola foi feita através de jatos suaves de água, sendo coletados em bandeja apropriada.. Logo após, estes ovos foram lavados para retirada de resíduos e desinfecção com solução de cloro a 5ppm por 2 min. e enxaguados novamente com água filtrada e deionizada. A incubação foi realizada em um frasco contendo água e ovos numa relação volumétrica de 60:1 em constante aeração por 48 horas, a 25-26°C, alcançando ao final uma eclosão parcial média de 35-40%. A eclosão das demais larvas foi completada somente após a semeadura na esponja vegetal sobre a dieta, podendo atingir índices de 70-80% de viabilidade (WALDER et al., 2010<sup>1</sup>).

#### **3.4.4 Semeadura dos ovos/larvas à dieta**

Para a semeadura de 0,1 mL de ovos/larvas ou cerca de 1000 ovos (WALDER et al., 2006) por recipiente com dieta (parcela), foram pipetados 3 mL de uma mistura homogenia de água (27 partes) e ovos (3 partes) em pleno processo de aeração. Esta alíquota foi depositada sobre a esponja vegetal úmida na superfície da dieta.

#### **3.4.5 Manutenção das larvas nas diferentes dietas**

Após a semeadura dos ovos/larvas, as dietas foram mantidas em ambiente controlado (B.O.D) em sob condições térmicas de 26-27 °C até a fase de pré-pupa e para isso, foram observadas diariamente para se definir o melhor dia de sua retirada da dieta.

---

<sup>1</sup> WALDER, J.M.M.; COSTA, M.L.Z.; MASTRANGELO, T; SELIVON. D.; ALCARDE, L.D.; COSTA, K.Z.; PARANHOS, B.J.; KAMIYA, A.C.; LOPES, L.A.; PARANHOS, L.G. Development of artificial rearing for *Anastrepha fraterculus* and *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) in Southeastern Brazil. **International Journal of Tropical Insect Science**, 2010. Enviado para publicação.

Tabela 3.1 – Composição das dietas utilizadas no experimento

Ingrediente (unidade)	Dieta 1		Dieta 2		Dieta 3		Dieta 4		Dieta 5		Dieta 6		Dieta 7		Dieta 8	
	pH=3,74		pH=4,01		pH=3,76		pH=3,70		pH=3,89		pH=4,10		pH=3,10		pH=3,10	
	Quant.	%	Quant.	%	Quant.	%	Quant.	%	Quant.	%	Quant.	%	Quant.	%	Quant.	%
<b>Gérmem (g)</b>	60,1	6,0	59,8	6,0	67,0	6,7	.	.	74,9	7,5	86,2	8,6	.	.	.	.
<b>Levedura (g)</b>	60,1	6,0	29,9	3,0	67,0	6,7	.	.	74,9	7,5	86,2	8,6	172,2	17,2	147,1	14,7
<b>Açúcar (g)</b>	60,1	6,0	59,8	6,0	67,0	6,7	88,0	8,8	74,9	7,5	86,2	8,6	103,0	10,3	88,0	8,8
<b>Extrato de levedura (g)</b>	.	.	29,9	3,0	.	.	147,0	14,7	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>Nipagin* (ml) (g)</b>	8,0	0,8	7,9	0,8	8,5	0,9	2,0	0,2	8,7	0,9	8,6	0,9	1,7	0,2	1,4	0,1
<b>Benzoato (g)</b>	1,0	0,1	1,0	0,1	1,0	0,1	2,0	0,2	1,2	0,1	1,4	0,1	1,7	0,2	1,4	0,1
<b>Ácido cítrico (ml)</b>	.	.	.	.	.	.	32,4	3,2	.	.	.	.	38,0	3,8	32,4	3,2
<b>Óleo de soja (ml)</b>	.	.	8,0	0,8	.	.	7,0	0,7	10,0	1,0	7,2	0,7	6,8	0,7	7,2	0,7
<b>Água (ml)</b>	800,8	80,1	797,6	79,8	783,0	78,3	721,0	72,1	749,1	74,9	718,4	71,8	675,1	67,5	721,0	72,1
<b>Antibiótico (g)</b>	.	.	.	.	.	.	1,0	0,1	.	.	.	.	1,3	0,1	1,1	0,1
<b>Ácido clorídrico (ml)</b>	6,0	0,6	6,0	0,6	6,5	0,7	.	.	6,2	0,6	5,7	0,6	.	.	.	.
<b>Ágar (g)</b>	3,6	0,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>TOTAL (ml)</b>	<b>1000</b>	<b>100</b>	<b>1000</b>	<b>100</b>	<b>1000</b>	<b>100</b>	<b>1000</b>	<b>100</b>	<b>1000</b>	<b>100</b>	<b>1000</b>	<b>100</b>	<b>1000</b>	<b>100</b>	<b>1000</b>	<b>100</b>

\* A medida de Nipagin para as dietas testadas baseadas na dieta padrão e a dieta padrão (D1-D5) tiveram sua medida em mililitros, enquanto que as dietas baseadas em Chang et al. (2004) (D6 e D7) tiveram suas medidas em gramas.



### 3.4.6 Coleta das larvas de terceiro instar

Ao final do ciclo larval, os recipientes com dieta receberam água deionizada para desmanchar a dieta e as larvas foram separadas por peneiramento. Após lavagem em água corrente, elas foram colocadas em vermiculita umedecida e levadas para sala escura e fria (21 °C) para pupação e maturação.

### 3.4.7 Separação das pupas

Após 12-14 dias as pupas foram separadas da vermiculita através de peneiramento suave para evitar danos na qualidade dos insetos. Foi feita a contagem do número de pupas recuperadas, pesagem em grupos de 100 pupas e acondicionamento em gaiolas para a emergência e avaliação dos parâmetros de qualidade dos insetos adultos.

### 3.4.8 Parâmetros de qualidade avaliados

- **Volume de larvas:** o volume de larvas foi medido em proveta graduada imediatamente após a separação das mesmas da dieta e o valor anotado em mL.
- **Recuperação pupal:** este parâmetro foi calculado levando em consideração o número de pupas recuperadas em cada lote, em função da quantidade estimada de ovos/larvas semeados, multiplicado por cem.
- **Peso pupal (mg):** amostra de 100 pupas pesadas em balança de precisão (METTLER PM 4000) 48 horas antes da emergência do adulto.
- **Desenvolvimento larval:** período em dias para desenvolvimento da larva, calculado a partir da semeadura na dieta até o dia da retirada das larvas de terceiro instar ou pré-pupas da dieta.

- **Desenvolvimento pupal:** período de amadurecimento da pupa, ou seja, a partir da colocação das pré-pupas na vermiculita para empuparem até o início da emergência dos adultos.
- **Emergência de adultos:** lotes de 100 pupas foram colocados em copos plásticos transparentes de 500mL com tampas perfuradas e deixados para que os adultos emergissem. Após total mortalidade foi feita a sexagem e classificação em normais, deformados e semi-emergidos.
- **Razão sexual:** Calculada a partir dos dados de emergência através da fórmula:  $rs = \text{fêmeas}/(\text{machos}+\text{fêmeas})$ .
- **Longevidade sob estresse:** lotes de pupas tratadas eram colocadas em gaiolas sem alimento nem água e, depois da emergência, 10 machos e 10 fêmeas foram transferidos para copos de 150mL com tampas perfuradas sem alimento nem água e mantidos lá até que todos morressem. Após esse período, foi anotado o máximo de dias que cada repetição alcançou com insetos vivos. Este teste de longevidade não foi aplicado da forma mais comumente utilizado, ou seja, fazendo-se a contagem de vivos e mortos após 48 h, pois o que se buscou neste parâmetro foi a longevidade máxima que as diferentes dietas poderiam fornecer ao inseto. Havia a possibilidade de que diferentes composições nutricionais pudessem fornecer mais ou menos reservas para se suportar situações de estresse.

#### 3.4.9 Análise estatística

Para as análises estatísticas fez-se primeiramente o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Se o resultado se apresentasse dentro da normalidade, era então aplicado o Teste de Levene para verificar a homogeneidade de variâncias baseados nas médias, isso determinaria o uso da Anova paramétrica, no caso de homogeneidade, ou Anova não-paramétrica (Kruskal-Wallis), no caso de não homogeneidade da médias. Posteriormente havendo diferença entre os tratamentos, foi aplicado o Teste de Tukey no caso da análise paramétrica ou Teste de posterioridade de Mann-Whitney no caso da não paramétrica.

No caso de não normalidade no teste de Shapiro-Wilk, os valores foram transformados em log, e após a transformação os dados seguiram a mesma sequência anteriormente descrita a partir do Teste de Levene. Para cada tratamento foram feitas quatro repetições.

### 3.5 Resultados e Discussão

#### 3.5.1 Desenvolvimento larval

Das oito dietas testadas somente três foram adequadas para o desenvolvimento larval da mosca-sul-americana (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Quantidades de larvas obtidas em cada uma das repetições das dietas testadas. Os valores não seguem a mesma unidade de medida devido à insuficiência ou ausência de larvas em algumas dietas

Repetição	Dieta 1		Dieta 2		Dieta 3		Dieta 4		Dieta 5		Dieta 6		Dieta 7		Dieta 8	
	Quant.	Unid.	Quant.	Unid.	Quant.	Unid.	Quant.	Unid.	Quant.	Unid.	Quant.	Unid.	Quant.	Unid.	Quant.	Unid.
1	15,0	ml	0,0	.	0,0	.	0,0	.	5	larvas	7	larvas	5,0	ml	8,0	ml
2	14,0	ml	0,0	.	0,0	.	0,0	.	0	.	13	larvas	4,0	ml	4,0	ml
3	13,0	ml	0,0	.	0,0	.	0,0	.	1	larva	15	larvas	6,0	ml	7,0	ml
4	20,0	ml	0,0	.	0,0	.	0,0	.	0	.	9	larvas	3,0	ml	7,0	ml
<b>TOTAL</b>	<b>62</b>	<b>ml</b>	<b>0</b>	<b>.</b>	<b>0</b>	<b>.</b>	<b>0</b>	<b>.</b>	<b>6</b>	<b>larvas</b>	<b>44</b>	<b>larvas</b>	<b>18</b>	<b>ml</b>	<b>26</b>	<b>ml</b>

Pelos resultados da Tabela 3.2, verifica-se que a dieta padrão (D1), juntamente com as dietas D7 e D8 foram as únicas que apresentaram valores suficientes para as medições de todos os parâmetros propostos (Figura 3.2). Nelas, o desenvolvimento e conseqüente recuperação larval foi satisfatório (Figura 3.2).

As dietas 2, 3 e 4 (Figura 3.3), apresentaram problemas de ordem física, relacionados com a suspensão dos componentes sólidos que conseqüentemente decantaram. A parte superficial das dietas ficaram aquosas, encharcado demais a espoja vegetal com ovos e larvas de primeiro instar, inviabilizando estas fases iniciais do ciclo evolutivo da mosca por afogamento (Figura 3.3-A). O mesmo efeito observou Chang et al. (2004) que concluiu que o estágio mais crítico de sobrevivência larval numa dieta líquida é durante o primeiro e segundo instares e

que cuidados devem ser tomados para que a esponja não encharque e provoque o afogamento dessas larvas.

As dietas 5 e 6, por conterem maior porcentagem de germe de trigo, levedura seca de cervejaria e açúcar, ficaram mais densas do que as primeiras minimizando o processo de decantação dos nutrientes sólidos e o encharcamento da esponja vegetal contendo ovo/larvas (Figura 3.4). Mesmo assim o desenvolvimento larval foi deficiente e a causa provável foi a dificuldade de movimentação das larvas numa dieta de consistência pegajosa. Braga Sobrinho et al. (2009) observaram também que larvas criadas em dieta com bagaço de cana-de-açúcar apresentavam maior mobilidade e se alimentavam com maior frequência que larvas criadas em dieta com farelo de trigo mais densa que dificultou a mobilidade das larvas, devido à sua consistência pastosa e com isto prejudicando a alimentação.

Embora tenham desenvolvidos indivíduos adultos, estas duas dietas (D5 e D6) não apresentaram número suficiente de pupas, demonstrando sérios os problemas já comentados no desenvolvimento larval (Tabela 3.2). De um número aproximado de 1.000 ovos colocados em cada recipiente, na dieta 5 obteve-se somente 6 pupas no total de todas as repetições, enquanto na dieta 6 foram recuperadas 30 pupas também no total das quatro repetições. Estes valores não atingiram o mínimo para se fazer as mensurações propostas na metodologia e, portanto seus dados não puderam ser trabalhados e as dietas foram descartadas.

A acidez das dietas foi verificada com o auxílio de potenciômetro e os valores de pH constam da Tabela 3.1. Os valores variaram de 3,70 a 4,10, não havendo, portanto disparidade entre a acidez das dietas o que poderia ser uma das causas de insucesso.

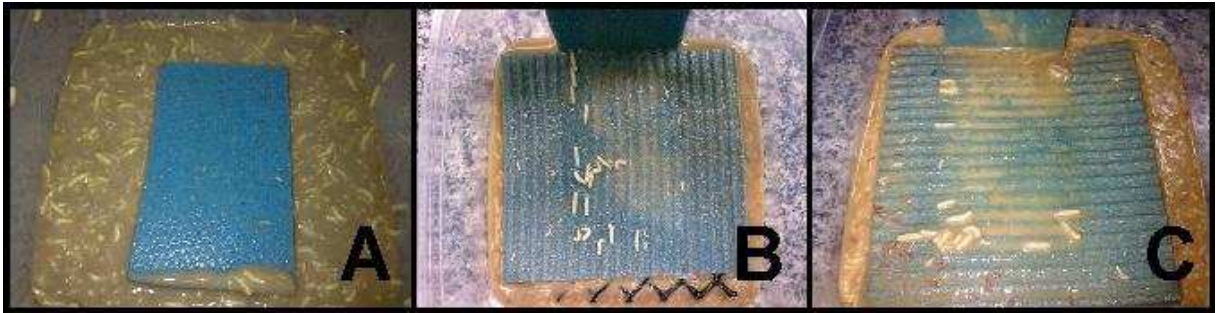


Figura 3.2 – Dietas que apresentaram recuperação ovo-adulto. (A) Dieta controle, (B) Dieta líquida 7, (C) Dieta líquida 8



Figura 3.3 – Dietas que não apresentaram recuperação larval suficiente. (A) Dieta 3 mostrada de lado, mostrando a separação da água da parte sólida da dieta, (B) Dieta líquida 2, (C) Dieta líquida 3 imediatamente após ser batida

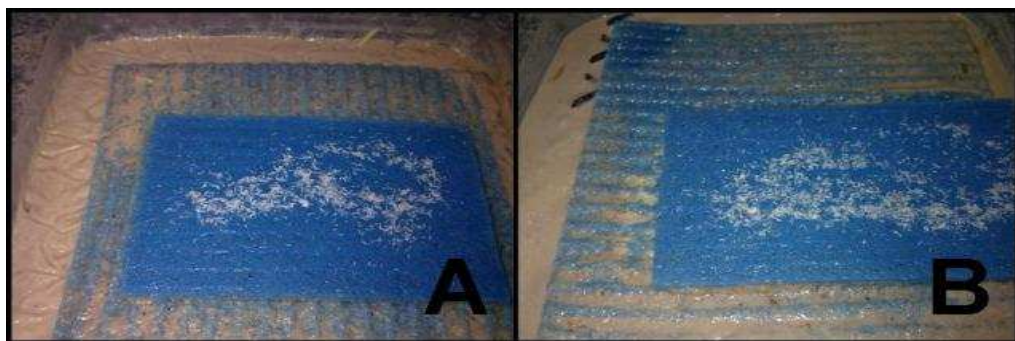


Figura 3.4 – Dietas que não obtiveram indivíduos suficientes para comparações (A) Dieta 5, (B) Dieta 6

### 3.5.2 Volume de larvas recuperadas

De acordo com os valores da Tabela 3.2, verifica-se que o maior volume de larvas recuperadas por dieta foi obtido na dieta padrão (D1), principalmente pelo fator adaptabilidade, pois o material biológico utilizado no experimento foi proveniente dessa dieta padrão que vem sendo utilizada por muitas gerações.

Houve grande diferença de volume médio de larvas recuperado entre as dietas D7 (4,5 mL) e D8 (6,5 mL) em relação a dieta padrão D1 (15,5 mL) atingindo valores menores do que a metade do obtido na dieta padrão (Figura 3.5). Por outro lado, como o volume de larvas é uma medida dependente não só do número de larvas, mas também do tamanho das larvas, este parâmetro biológico, isoladamente, não representa a qualidade obtida, não sendo possível afirmar que houve diferença no número de larvas.

Optou-se por não realizar a contagem individual das larvas, pois poderia haver danos que prejudicariam o desempenho do inseto ao longo de seu desenvolvimento.

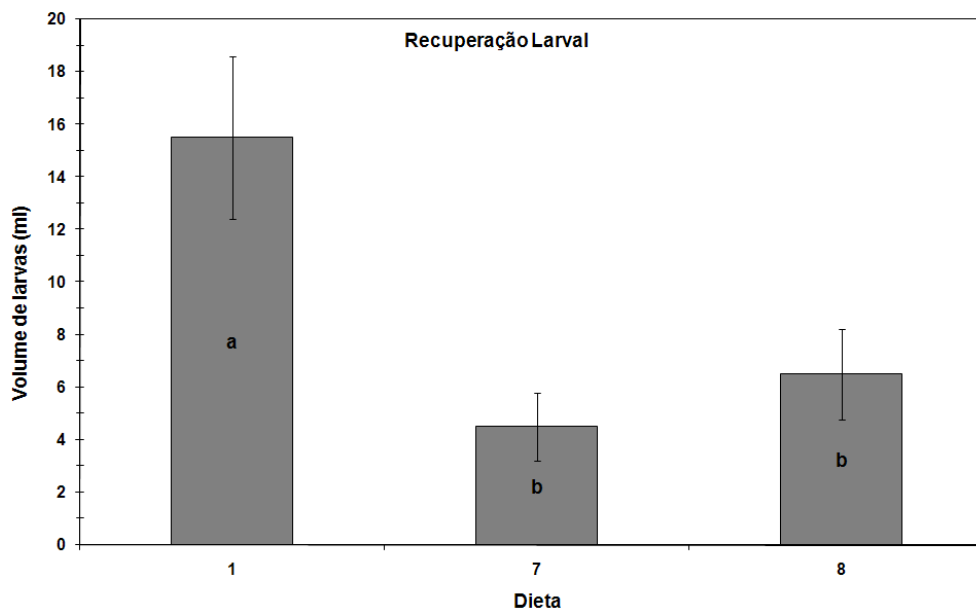


Figura 3.5 – Valores médios de recuperação larval ( $\pm$ EP), medida em volume de larvas, para as dietas D1 (padrão), D7 e D8 (líquidas). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey, ao nível de 5%)

### 3.5.3 Recuperação pupal

Os valores de recuperação pupal estão na Tabela - 3.3. Verifica-se que, em média, foram recuperadas 333 pupas na dieta padrão (D1), 203 pupas na D7 e 228 pupas na D8. Após análise estatística verificou-se não haver diferença entre os tratamentos para este parâmetro de avaliação (Figura 3.6). Considerando que a taxa de eclosão do material utilizado no presente experimento estava em torno de 70 %

(WALDER et al., 2010) a recuperação pupal atingiu índices de 30 a 48%, o que é satisfatório em criações artificiais (VERA et al., 2007; WALDER et al., 2010<sup>2</sup>).

Braga Sobrinho (2009), testando oito diferentes dietas com *A. fraterculus* alcança recuperação larval acima de 70% em 4 dos tratamentos testados. Resultados de outros trabalhos com dietas líquidas mostraram resultados bastante heterogêneos. Chang et al. (2004) obteve em sua dieta líquida para mosca do melão, recuperação pupal significativamente mais baixa que o controle, que foi de aproximadamente 80% da convencional, porém Mittler e Tsitsipis (1973) com a mosca da fruta das oliveiras, que um aumento 10 vezes maior na produção pupal por grama de dieta em comparação com a dieta sólida.

Tabela 3.3 – Quantidade de pupas recuperadas e peso médio em miligramas de uma pupa obtido em cada uma das repetições das dietas testadas que alcançaram este estágio do desenvolvimento do inseto

Repetição	Dieta 1		Dieta 5		Dieta 6		Dieta 7		Dieta 8	
	Quant.	Peso médio	Quant.	Peso médio	Quant.	Peso médio	Quant.	Peso médio	Quant.	Peso médio
1	340	14,40	4	15,00	7	11,43	235	9,90	282	10,80
2	248	14,80	0	0,00	3	13,33	187	9,30	141	10,70
3	282	14,50	1	0,00	11	12,73	249	10,10	244	10,10
4	465	15,20	0	0,00	9	15,56	142	8,70	248	9,90
<b>Total</b>	<b>1335</b>	<b>.</b>	<b>5</b>	<b>.</b>	<b>30</b>	<b>.</b>	<b>813</b>	<b>.</b>	<b>915</b>	<b>.</b>
<b>Média</b>	<b>333,75</b>	<b>14,73</b>	<b>.</b>	<b>.</b>	<b>7,50</b>	<b>13,26</b>	<b>203,25</b>	<b>9,50</b>	<b>228,75</b>	<b>10,38</b>
<b>±EP</b>	<b>95,39</b>	<b>0,36</b>	<b>.</b>	<b>.</b>	<b>3,42</b>	<b>1,72</b>	<b>48,71</b>	<b>0,63</b>	<b>60,93</b>	<b>0,44</b>

<sup>2</sup> WALDER, J.M.M.; COSTA, M.L.Z.; MASTRANGELO, T; SELIVON. D.; ALCARDE, L.D.; COSTA, K.Z.; PARANHOS, B.J.; KAMIYA, A.C.; LOPES, L.A.; PARANHOS, L.G. Development of artificial rearing for *Anastrepha fraterculus* and *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) in Southeastern Brazil. **International Journal of Tropical Insect Science**, 2010, Enviado para publicação.

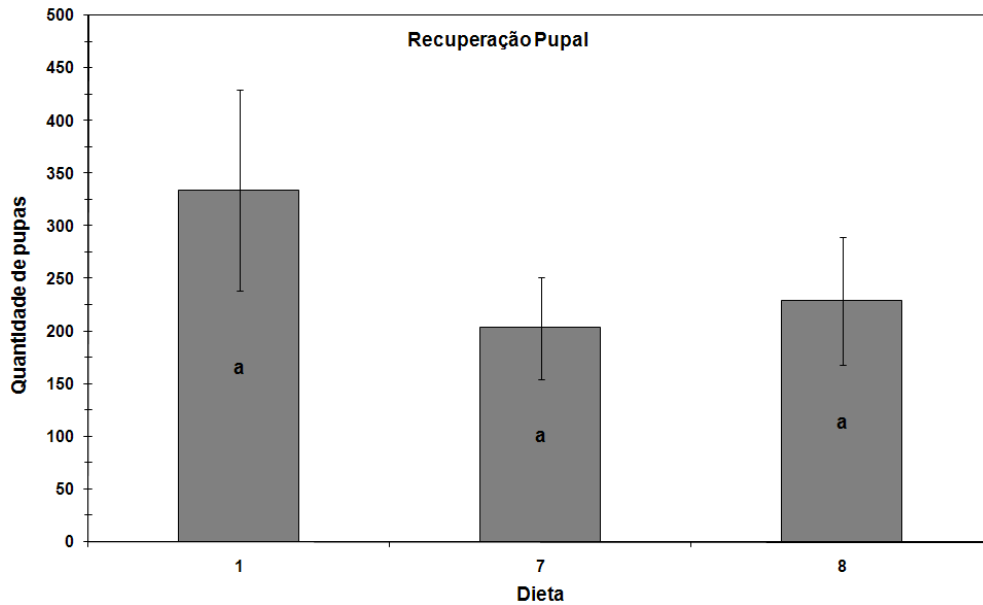


Figura 3.6 – Valores médios de pupas recuperadas ( $\pm$  EP) para as dietas D1 (padrão) e D7 e D8 (líquidas). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (Anova não paramétrica,  $p > 0.05$ )

### 3.5.4 Peso pupal (mg)

As pupas provenientes da dieta padrão (D1) foram mais pesadas que as provenientes das dietas líquidas (D7 e D8), as quais não diferiram entre si (Figura 3.7). Os valores, correspondentes ao peso de 100 pupas foram 1,47 g, 0,95 g e 1,04 g, respectivamente para D1, D7 e D8. Portanto os pesos médios de pupa, 48 horas antes da emergência foram respectivamente de 14,7 mg, 9,5 mg e 10,4 mg, o peso médio em cada uma das repetições das dietas testadas que alcançaram este estágio do desenvolvimento do inseto encontram-se descritos na Tabela – 3.3.

Também por este parâmetro de avaliação da qualidade da mosca sul americana criada em dieta artificial verifica-se que as dietas líquidas foram deficientes no desenvolvimento larval em relação a dieta padrão. Chang et al. (2004) também obteve na criação de mosca do melão, pupas mais leves em dieta líquida do que no controle. Braga Sobrinho et al. (2009), testando dietas sem ágar, mas não líquidas, para larvas de *A. fraterculus*, verificaram a redução de peso das pupas. Isto comprova que, havendo uma mudança física ou nutricional da dieta, ela afeta imediatamente o comportamento do inseto, reduzindo o padrão de qualidade. Com o uso contínuo dessa nova dieta o inseto tende a se adaptar ao meio e com isto retornar ao nível de qualidade esperado.



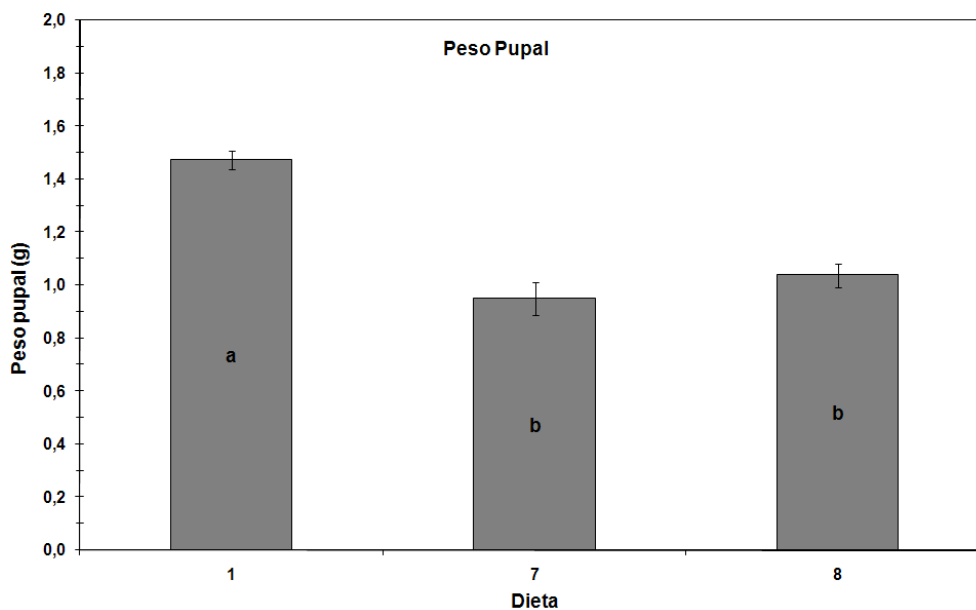


Figura 3.7 – Peso médio de 100 pupas provenientes das dietas padrão (D1) e das dietas líquidas (D7 e D8). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (Teste de Mann-Whitney, ao nível de 5%)

### 3.5.5 Período do desenvolvimento larval

Houve um alongamento na fase larval de 4 dias a mais nas dietas D7 e D8 (16 dias) com relação à dieta padrão (D1) (12 dias). Chang et al. (2004) estudando a criação larval na dieta líquida e convencional de mosca do melão encontrou aproximadamente os mesmos valores. Fay e Wornoyaporn (2002), encontraram em *Ceratitis capitata* (Wiedemann) um aumento na duração da fase larval na dieta líquida utilizando também esponja vegetal.

### 3.5.6 Período do desenvolvimento pupal

Quanto ao período de desenvolvimento pupal, a diferença em dias foi de apenas um dia a mais para as dietas 7 e 8 (19 dias) quando comparadas com o controle (18 dias). Os períodos de desenvolvimento, tanto larval como pupal, corroboram com os resultados de Machado et al. (1995) para o desenvolvimento de *A. fraterculus* a uma temperatura de 25°C.

Com estes resultados o período de desenvolvimento ovo-adulto para a dieta padrão (D1) foi de 30 dias, enquanto que para as dietas líquidas D7 e D8 este período durou 35 dias.

### 3.5.7 Emergência de adultos

A porcentagem de adultos emergidos a partir de 100 pupas para as dietas D7 e D8 (15,1% e 23,6 % respectivamente) diferiram estatisticamente da padrão (64,0%). Apesar de a dieta padrão apresentar maior taxa de emergência, esta foi baixa quando comparada a taxa de emergência normalmente atingida pelo laboratório de criação de *A. fraterculus* com valores superiores a 80% (WALDER et al., 2008). O baixo valor de emergência no controle pode ser em decorrência da difícil manutenção da umidade relativa da sala onde foi realizado o ensaio de emergência.

Em decorrência disso, pode-se afirmar que em melhores condições de umidade, os valores da taxa de emergência poderiam ser mais positivos, mesmo que ainda inferiores ao controle, com relação à dieta líquida.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as dietas com relação à adultos deformados e semi-emergidos (Tabela 3.4)

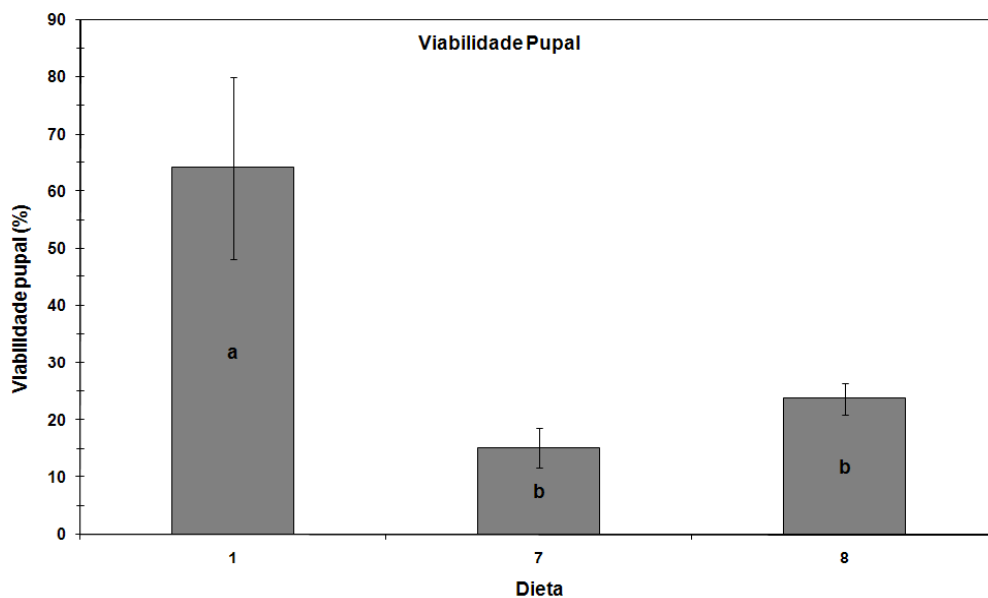


Figura 3.8 – Valores médios de emergência para insetos provenientes da dieta padrão (D1) e das dietas líquidas (D7 e D8). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (Teste de Mann-Whitney, ao nível de 5%)

Tabela 3.4 – Valores obtidos por repetição, médias e erro padrão do número de machos e fêmeas emergidos, deformados, semi-emergidos, emergidos e não-emergidos, porcentagem de viabilidade das pupas e razão sexual

	Rep.	n° ♂	n° ♀	def.	semi-e.	emerg.	não-e.	viab.	r.s.
Dieta 1	1	129	21	12	9	171	169	50,29	0,14
	2	87	81	16	9	193	55	77,82	0,48
	3	85	50	16	10	161	121	57,09	0,37
	4	192	156	28	12	388	77	83,44	0,45
	<b>Média</b>	<b>123,25</b>	<b>77</b>	<b>18</b>	<b>10</b>	<b>228,25</b>	<b>105,5</b>	<b>67,16</b>	<b>0,36</b>
	<b>±EP</b>	<b>50,12</b>	<b>58,09</b>	<b>6,93</b>	<b>1,41</b>	<b>107,34</b>	<b>50,45</b>	<b>15,96</b>	<b>0,15</b>
Dieta 5	1	.	2	.	.	2	2	50,00	1,00
	2	.	.	.	.	.	.	.	.
	3	.	1	.	.	1	0	100,00	1,00
	4	.	.	.	.	.	.	.	.
	<b>Média</b>	<b>.</b>	<b>1,5</b>	<b>.</b>	<b>.</b>	<b>1,5</b>	<b>1</b>	<b>75,00</b>	<b>1,00</b>
	<b>±EP</b>	<b>.</b>	<b>0,71</b>	<b>.</b>	<b>.</b>	<b>0,71</b>	<b>1,41</b>	<b>35,36</b>	<b>0,00</b>
Dieta 6	1	1	1	.	1	3	4	42,86	0,50
	2	.	1	.	.	1	2	33,33	1,00
	3	1	3	.	1	5	6	45,45	0,75
	4	1	4	.	.	5	4	55,56	0,80
	<b>Média</b>	<b>1</b>	<b>2,25</b>	<b>.</b>	<b>1</b>	<b>3,5</b>	<b>4</b>	<b>44,30</b>	<b>0,76</b>
	<b>±EP</b>	<b>0,00</b>	<b>1,50</b>	<b>.</b>	<b>0,00</b>	<b>1,91</b>	<b>1,63</b>	<b>9,14</b>	<b>0,21</b>
Dieta 7	1	23	16	3	6	48	187	20,43	0,41
	2	8	4	8	6	26	161	13,90	0,33
	3	19	20	6	12	57	192	22,89	0,51
	4	9	8	3	3	23	119	16,20	0,47
	<b>Média</b>	<b>14,75</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>6,75</b>	<b>38,5</b>	<b>164,75</b>	<b>18,35</b>	<b>0,43</b>
	<b>±EP</b>	<b>7,41</b>	<b>7,30</b>	<b>2,45</b>	<b>3,77</b>	<b>16,62</b>	<b>33,39</b>	<b>4,06</b>	<b>0,08</b>
Dieta 8	1	29	26	13	2	70	212	24,82	0,47
	2	14	11	3	9	37	104	26,24	0,44
	3	13	33	15	8	69	175	28,28	0,72
	4	29	32	3	2	66	182	26,61	0,52
	<b>Média</b>	<b>21,25</b>	<b>25,5</b>	<b>8,5</b>	<b>5,25</b>	<b>60,5</b>	<b>168,25</b>	<b>26,49</b>	<b>0,54</b>
	<b>±EP</b>	<b>8,96</b>	<b>10,15</b>	<b>6,40</b>	<b>3,77</b>	<b>15,76</b>	<b>45,74</b>	<b>1,42</b>	<b>0,12</b>

Rep. – Repetição, n° ♂ - número de machos emergidos, n° ♀ - número de fêmeas emergidas, def. – indivíduos deformados, semi-e – indivíduos semi-emergidos, emerg. – indivíduos emergidos no total (n° ♂ + n° ♀ + def. + semi-e), não-e. – indivíduos não emergidos, viab. – porcentagem de viabilidade e r.s. – razão sexual.

### 3.5.8 Razão sexual

Apesar dos resultados demonstrarem grandes diferenças entre as médias, 0,36 para o controle, enquanto 0,43 e 0,54 para as dietas D7 e D8 (Tabela 3.4), respectivamente, estes valores não diferiram estatisticamente.

### 3.5.9 Longevidade sob estresse

Não houve diferença significativa entre a longevidade sob estresse nos tratamentos (Tabela 3.5). Possivelmente uma forma de melhor se avaliar a influência de uma dieta na longevidade de um inseto seria com a privação apenas do alimento do adulto e não da água. A influência da dieta pode não ter sido observada em razão da privação de água ter antecipado a morte dos insetos por sua falta e não pela falta de outros componentes nutricionais, portanto a falta de água pode ter mascarado o resultado da influência de diferentes dietas larvais na longevidade do adulto.

Tabela 3.5 – Quantidade de dias de cada repetição referente à longevidade máxima observada nos adultos desenvolvidos nas diferentes dietas larvais e colocados em situação de estresse (ausência de água e alimento)

Repetição	Dieta 1	Dieta 5	Dieta 6	Dieta 7	Dieta 8
	Dias	Dias	Dias	Dias	Dias
1	4	3	3	4	4
2	3	0	3	3	4
3	4	3	3	4	4
4	3	0	3	4	3
<b>Média</b>	<b>3,50</b>	<b>1,50</b>	<b>3,00</b>	<b>3,75</b>	<b>3,75</b>
<b>±EP</b>	<b>0,58</b>	<b>1,73</b>	<b>0,00</b>	<b>0,50</b>	<b>0,50</b>

### 3.6 Conclusão

A substituição da dieta gelatinosa com ágar, atualmente utilizada para a criação artificial de *A. fraterculus*, pode ser realizada por dietas líquidas, de custo reduzido e com maior praticidade de manejo.

Como os resultados deste trabalho demonstraram, foi possível obter um ciclo completo da mosca-sul-americana em dieta artificial líquida para larvas, embora seus parâmetros de qualidade avaliados fossem inferiores aos da dieta padrão com ágar.

É, portanto possível a utilização de dieta larval líquida, dependendo de maiores testes futuros, principalmente quanto à adaptabilidade do inseto ao novo meio.

### REFERÊNCIAS

- BIGLER, F. Quality control of mass reared arthropods. In: WORKSHOP IOBC GLOBAL WORKING GROUP "QUALITY CONTROL OF MASS REARED ARTHROPODS", 1991, Wageningen. **Proceedings...** Wageningen: OILB/IOBC, 1991. p. 25-29.
- BRAGA SOBRINHO, R.; GUIMARÃES, J. A.; MESQUITA, A. L. M.; ARAÚJO, K. L. B. **Desenvolvimento de dietas para a criação massal de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009. 23 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 33).
- BROWN, H. E.; SNOW, J. W. Protein utilization by screwworm larvae (Diptera: Calliphoridae) reared on liquid medium. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 14, p. 531-533, 1978.
- CHANG, C. L.; CACERES C.; JANG, E. B. A novel liquid larval diet and its rearing system for melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 97, p. 524-528, 2004.
- CHANG, C. L.; VARGAS, R. I.; CACERES, C.; JANG, E.; CHO, I. K. Development and assessment of a liquid diet for *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 99, n. 6, p. 1191-1198, 2006.
- CLARKE, G. M.; MCKENZIE, L. J. Fluctuating asymmetry as a quality control indicator for insect mass rearing processes. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 85, p. 2045-2050, 1992.

FAY, H. A. C.; WORNOAYPORN, V. Inert reusable substrates as potential replacements for wheat bran in larval diets for Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiede.) (Dipt, Tephritidae). **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v. 126, p. 92-96, 2002.

HALANDA, S. Use of a liquid artificial diet as a medium for testing systemic insecticidas. **Ustav Experimentalnej Fytopatologie a Entomologie SAV**, Ivanka pri Dunaji, Czechoslovakia, v. 12, p. 225-232, 1976.

LEPPLA, N. C.; ASHLEY, T. R. Quality control in insect mass production: a review and model. **Bulletin of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 35, p. 33-44, 1989.

LETARDI, A.; CAFFARELLI, V. Influence of the utilization of liquid artificial larval diet for rearing *Chrysoperla carnea* Steph. *Planipennia Chrysopidae*. **Redia**, Firenze, v. 73, p. 79-88, 1990.

MACHADO, A. E.; SALLES, L. A. B.; LOECK, A. E. Exigências térmicas de *nastrepha fraterculus* (Wied.) e estimativa do número de gerações em Pelotas, RS. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 24, p. 573-579, 1995.

MITTLER, T. E.; TSITSIPIS, J. A. Economical rearing of larvae of the olive fruit fly, *Dacus oleae*, on a liquid diet offered on cotton toweling. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 16, p. 292-293, 1973.

OCHIENG, R. S.; G. W. OLOO; E. O. AMBOGA. Anartificial diet for rearing the phytoseiid mite amblyseius-teke Pritchard and Baker. **Experimental and Applied Acarology**, New York, v. 392, p. 169-174, 1987.

PARRA, J. R. P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. 6. ed. rev. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 2001. 134 p.

\_\_\_\_\_. Criação massal de inimigos naturais. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Barueri: Manole, 2002. cap. 9, p. 143-161.

PREZOTTI, L.; PARRA, J. R. P. Controle de qualidade em criações massais de parasitóides e predadores. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Barueri: Manole, 2002. cap. 17, p. 295-308.

TSITSIPIS, J. A.; KONTOS, A. Improved solid adult diet for the olive fruit fly, *Dacus oleae*. **Entomologica Hellenica**, Athens, v. 1, p. 24-29, 1983.

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

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.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo, Manole, 2002. p. 181-190.

WALDER, J. M. M.; SILVA, L. C. S.; COSTA, M. L. Z.; MASTRANGELO, T. de A. Developing mass rearing system for *Anastrepha fraterculus* and *Anastrepha obliqua* for future SIT- AWIPM procedures in Brazil. In: RCM OF THE CO-ORDENATED RESEARCH PROJECT ON DEVELOPMENT OF MASS REARING FOT NEW-WORLD (*ANASTREPHA*) AND ASIAN (*BACTROCERA*) FRUIT FLY PESTS IN SUPPORT OF SIT, 2., 2006, Salvador, Bahia. **Papers...** Vienna: IAEA, 2006. 6 p.

WALDER, J. M. M.; COSTA, M. L. Z.; ALCARDE, L. D.; COSTA, K. Z.; CANALE, R. A.; MASTRANGELO, T. de A.; LOPES, L. A.; KAMIYA, A. C. Desenvolvimento de sistema de criação massal para *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 22., 2008, Uberlândia. **Resumos...** Uberlândia: SBE, 2008. 1 CD-ROM.

## 4. CAPÍTULO 2:

### Radioesterilização da mosca-sul-americana *Anastrepha sp.1 sff.* *fraterculus* (Wied.,1830) (Diptera: Tephritidae)

#### 4.1 Resumo

As moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) são consideradas as principais pragas da fruticultura mundial, e entre as medidas de controle, a Técnica do Inseto Estéril (SIT) tem se destacado em diversos países. Para a aplicação da SIT é necessário encontrar doses que esterilizem e ao mesmo tempo alterem o mínimo possível as qualidades biológicas do inseto para o seu sucesso em campo. O presente trabalho analisou a fertilidade, fecundidade, emergência, habilidade de vôo e longevidade sob estresse e de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann), a mosca-sul-americana, irradiados com doses de 40, 50, 60, 70 e 80 Gy. Os insetos utilizados foram provenientes da colônia do Laboratório de Radioentomologia do CENA/USP, identificados com sendo *Anastrepha sp. 1 aff. fraterculus*. A fonte de radiação gama foi um irradiador de Co-60 (Gammabeam-650) localizado no mesmo laboratório. Os testes foram realizados sob as seguintes condições ambientais:  $26 \pm 1$  °C,  $70 \pm 5\%$  RH, e fotofase de 12:12. A dose de radiação gama esterilizante para machos de *A. sp. 1 aff. fraterculus* foi determinada sendo 70 Gy. Fêmeas irradiadas, mesmo com a dose mais baixa de 40 Gy, não ovipositaram, possivelmente pela atrofia dos ovários causada pela radiação. A radiação não afetou os demais parâmetros de qualidade do inseto como emergência, longevidade e habilidade de vôo.

Palavras-chave: Técnica do Inseto Estéril. Mosca-das-frutas. *Anastrepha fraterculus*.



## 4.2 Abstract

The fruit-flies (Diptera: Tephritidae) are considered major pests in fruit growing worldwide, and the measures of control, the Sterile Insect Technique (SIT) has been highlighted in several countries. For the application of SIT is necessary to find doses that sterilize while changing as little as possible the biological qualities of the insect to its success in the field. This study examined the fertility, fecundity, emergence, flight ability and longevity under stress and *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann), the fly-South American, irradiated with doses of 40, 50, 60, 70 and 80 Gy. The insects used were from the colony Radioentomologia Laboratory of CENA / USP, being identified with *Anastrepha* sp. 1 aff. *fraterculus*. The radiation source was a gamma irradiator with a Co-60 (Gammabeam-650) located in the same laboratory. The tests were performed under the following environmental conditions:  $26 \pm 1$  °C,  $70 \pm 5\%$  RH and photoperiod of 12:12. The dose of gamma radiation sterilization for male *A.* sp. 1 aff. *fraterculus* was determined with 70 Gy. Irradiated females, even with the lower dose of 40Gy, layed no eggs, possibly due to atrophy of the ovaries caused by radiation. The radiation did not affect the other quality parameters such as insect emergence, longevity and ability to fly.

Keywords: Fruit fly. Sterile insect technique. *Anastrepha fraterculus*.

### 4.3. Introdução

A TIE - Técnica do Inseto Estéril (Sterile Insect Technique - S.I.T.) é considerada um tipo de controle biológico autocida ou genético, onde a praga é empregada para seu próprio controle, pois insetos estéreis competem no processo de acasalamento com os selvagens férteis e conseqüentemente causa, gradativamente, uma redução populacional, podendo chegar até a uma erradicação (KNIPLING, 1955).

A TIE é utilizada em vários países para o controle, supressão e até mesmo erradicação de pragas da agricultura, pecuária e saúde pública. A introdução desta técnica no controle de pragas contribuiu para o desenvolvimento e até mesmo a criação de novas áreas entomológicas tais como a de criação de insetos em meios artificiais (produção massal), ecologia e simulação populacional, controle de qualidade, radioentomologia, dentre outras (WALDER, 2000). A técnica é considerada como um dos mais significativos eventos deste século na área entomológica, juntamente com o isolamento e uso do patógeno *Bacillus thuringiensis* e a descoberta do inseticida DDT (RIDGWAY et al., 1992), sendo hoje uma técnica consagrada e difundida pelos muitos exemplos de sucesso obtidos (KLASSEN et al., 1994).

Vários países já utilizam a TIE para o controle, supressão e até mesmo erradicação de moscas-das-frutas e outras pragas da agricultura, pecuária e saúde pública. Esta expansão de uso tem provado sucesso em proteger áreas de produção contra a infestação da mosca-do-mediterrâneo e embargos em bilhões de dólares em programas de exportação. A TIE para moscas-das-frutas é usada para minimizar o emprego contínuo de inseticidas, proteger o ambiente e se adequar aos padrões de segurança alimentar. Há biofábricas em operação na Argentina, Chile, Peru, Guatemala, México, Estados Unidos (Texas, Havaí), Portugal (Ilha da Madeira), África do Sul, Tailândia, Espanha (KLASSEN; CURTIS, 2005) e Brasil (MOSCAMED, 2006).

O presente trabalho teve como objetivo determinar a dose de radiação esterilizante para adultos de *A. sp.1 aff. fraterculus* atendendo os parâmetros de qualidade exigidos pela Técnica do Inseto Estéril, uma vez que indivíduos submetidos a este tratamento devem perder apenas a fertilidade, com mínimo efeito colateral ao comportamento do inseto.

## 4.4 Material e Métodos

### 4.4.1 Insetos

Os insetos foram provenientes da colônia estabelecida no Laboratório de Radioentomologia do CENA/USP, identificados com sendo *Anastrepha* sp. 1 *aff. fraterculus*, e criados em dieta semi-líquida e condições controladas segundo Walder et al, 2008 por mais de 30 gerações até o presente trabalho. Os testes foram realizados sob as seguintes condições ambientais:  $26 \pm 1$  ° C,  $70 \pm 5\%$  RH, e fotofase de 12 h.

### 4.4.2 Fontes de Radiação

A fonte de radiação gama foi um irradiador de Co-60 (Gammabeam-650) localizado no Laboratório de Radioentomologia do CENA/USP. Sua atividade no começo dos testes era de 28,8.1012 Bq (778,6 Ci) (Figura 4.1).

### 4.4.3 Efeito da irradiação sobre a fertilidade

Segundo Allinghi et al. (2007), para *A. fraterculus* a melhor idade é 48 h antes da emergência pois seus resultados não indicam diferenças na porcentagem de eclosão entre ovos de indivíduos irradiados em diferentes idades dentro do intervalo de 24-96 h antes da emergência. Então levou-se em consideração o que se deduziu ser a idade ideal dentro deste período para a produção de machos estéreis com melhor chance de maior competitividade.

Como afirmado por Hooper (1972) a irradiação de pupas em fases iniciais de desenvolvimento é altamente prejudicial devido à alta atividade metabólica e alterações morfológicas durante o processo de metamorfose. Se a radiação é aplicada em pupas 24-48 h antes da emergência, a metamorfose está quase concluída e os efeitos nocivos da radiação sobre os órgãos com baixa taxa metabólica é minimizado.

Ainda com relação ao melhor momento para aplicar um tratamento de radiação em pupas de moscas-das-frutas, estudos sobre outras espécies de tefritídeos como *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett), *Bactrocera*

*oleae* (Gmelin), *C. capitata*, *A. ludens*, *Anastrepha obliqua* (Macquart), e *A. supensa* demonstram que pupas irradiadas 24-48 h antes da emergência exibem altos níveis de esterilidade (VELASCO; ENKERLIN, 1982; HOOPER, 1972; WALDER; CALKINS, 1993; TOLEDO, 1993), portanto as pupas irradiadas neste trabalho tinham idade de 48 h antes da emergência.

As pupas foram irradiadas com as seguintes doses de radiação, 0, 40, 50, 60, 70 e 80 Gy.

As pupas assim que irradiadas, eram contadas e separadas de acordo com os testes a serem realizados Para os estudos com adultos, as pupas de cada tratamento eram colocadas em uma placa-de-petri dentro de uma gaiola contendo água e alimento *ad libitum* para os adultos. Estes, eram sexados e separados dentro das primeiras horas para assegurar a virgindade dos mesmos.

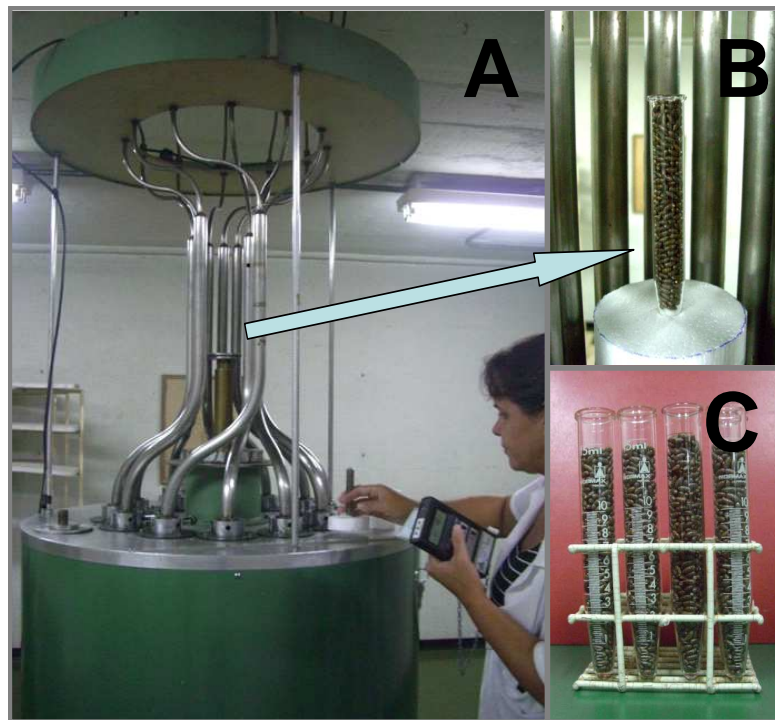


Figura 4.1 – (A) – Irradiador Gammabeam 650 do CENA/USP (B) – Local onde as pupas eram colocadas para a irradiação (C) – Quantidade de pupas irradiadas por tratamento a cada repetição (15mL)

Após a emergência foram realizados os cruzamentos previstos de machos irradiados com fêmeas não-irradiadas, machos não-irradiados com fêmeas irradiadas e machos não-irradiados com fêmeas não-irradiadas para cada dose estudada. Os casais, em número de 15, foram confinados em gaiolas (baleiros plásticos de 2 L adaptados) com um lado coberto por uma tela de voal vermelha revestida com silicone para a oviposição (Figura 4.2 A e B), alimentados *ad libitum* com uma mistura de levedura, germe de trigo e açúcar (1:1:3) e água que foi fornecida em pequenos potes com algodão.

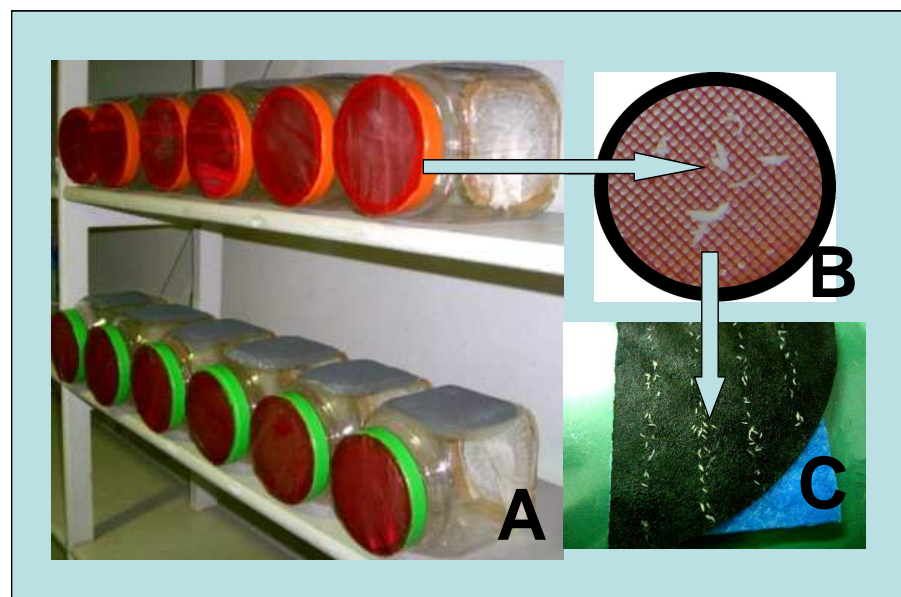


Figura 4.2 – (A) Gaiolas utilizadas para os cruzamentos, (B) detalhe do tecido voal vermelho siliconado com ovos, (C) ovos coletados e enfileirados sobre papel filtro preto para posterior contagem da viabilidade

#### 4.4.4 Parâmetros de qualidade a serem avaliados

Os parâmetros de controle de qualidade foram baseados no protocolo da FAO/IAEA/USDA (2003) para moscas-das-frutas criadas massalmente, irradiadas e utilizadas em programas de aplicação da Técnica do Inseto Estéril.

- **Fertilidade e fecundidade** : após o início da oviposição, as três primeiras coletas de ovos foram descartadas e somente a partir do quarto dia de oviposição, os ovos foram reservados para o estudo. As coletas foram diárias por um período de cinco dias consecutivos. Das coletas diárias de ovos foram retiradas amostras de 100 ovos, estes

eram alinhados sobre papel filtro umedecido negro (Figura 4.2.C) dentro de uma placa-de-petri e incubados a  $26 \pm 1$  ° C em B.O.D. Ao final de 4 dias, contavam-se os ovos viáveis e não viáveis para a determinação da taxa de eclosão e conseqüentemente da fertilidade. A fecundidade foi calculada através do número de ovos por fêmea por dia.

- **Emergência de adultos:** grupos de 100 pupas foram contados e colocados em copos plásticos com tampa perfurada, capacidade de 500mL. Esses lotes foram deixados para que os adultos emergissem e após total mortalidade o índice de emergência era então calculado através da contagem de todos os adultos em função do número de pupas colocadas inicialmente. Também foram feitas contagens separando as características: não-deformados, deformados, semi-emergidos.
- **Longevidade sob estresse:** amostras de pupas tratadas eram colocadas em gaiolas sem alimento nem água e, no primeiro dia da emergência, 10 machos e 10 fêmeas eram colocados em copos de 200mL com tampas furadas, sem alimento nem água por 48 h. Após esse período, os insetos vivos eram contados e a porcentagem de sobrevivência calculada.

**Habilidade de vôo:** a habilidade de vôo foi avaliada, colocando-se 100 pupas de cada tratamento (com 24 horas antes da emergência) 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 (9 cm de diâmetro x10cm de altura). Juntamente com este anel, foi colocada uma tira de papel dobrada em sanfona (1,5 cm de altura) para servir de descanso para as moscas recém emergidas expandirem suas asas. A parte interna do tubo, lisa, foi revestida com uma fina camada de talco neutro, com distância de aproximadamente 1,5 cm acima da parte inferior do tubo também para fornecer local de repouso para moscas recém-emergidas O talco serve para evitar a saída das

moscas através do caminhar. Os tubos foram colocados individualmente dentro de gaiola de acrílico (40 x 20 x 40 cm). Após emergência, as moscas foram estimuladas a voar mantendo-se as luzes do ambiente acesas. No interior das gaiolas foram colocadas tiras amarelas com adesivo para atrair e capturar as moscas voadoras e com isto evitar que retornassem ou caíssem dentro dos tubos novamente (Figura 4.3). Durante 5 dias a partir da emergência, as moscas que saíram dos tubos foram contadas como voadoras e o material que permaneceu no interior dos tubos, foi classificado de acordo as seguintes categorias: 1) não-emergidas (pupas cheias), 2) semi-emergidas (parte do adulto preso ao puparium), 3) deformadas (moscas com asas deformadas) 4) não-voadoras (moscas que parecem normais, mas não são capazes de voar).

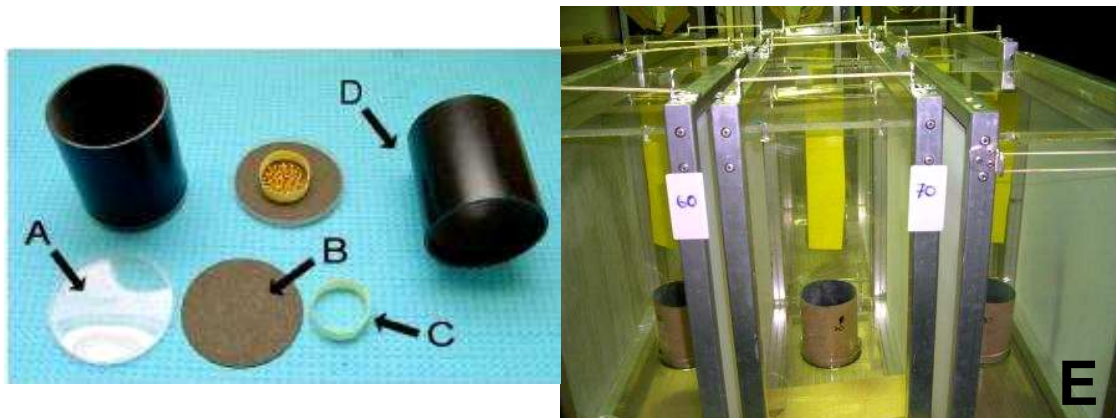


Figura – 4.3 (A) – Placa-de-petri, (B) – Papel preto, (C) – Disco de papel branco, (D) – Tubo preto de superfície interna lisa com talco neutro e (E) – Gaiolas de teste de voo

#### 4.4.5 Análise estatística

Para as análises estatísticas fez-se primeiramente o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Se o resultado se apresentasse dentro da normalidade, era então aplicado o Teste de Levene para verificar a homogeneidade de variâncias baseados nas médias, isso determinaria o uso da Anova paramétrica, no caso de homogeneidade, ou Anova não-paramétrica (Kruskal-Wallis), no caso de não

homogeneidade da médias. Posteriormente havendo diferença entre os tratamentos, foi aplicado o Teste de Tukey no caso da análise paramétrica ou Teste de posterioridade de Mann-Whitney no caso da não paramétrica.

No caso de não normalidade no teste de Shapiro-Wilk, os valores foram transformados em log, e após a transformação os dados seguiram a mesma sequência anteriormente descrita a partir do Teste de Levene. Para cada tratamento foram feitas cinco repetições.

## 4.5. Resultados e Discussão

### 4.5.1 Fertilidade

Os valores de fertilidade dos diferentes cruzamentos e doses de radiação estão na Tabela 4.1 e representados graficamente na Figura 4.4.

Tabela 4.1 – Fecundidade média por dia por gaiola ( $\pm$ EP) e fertilidade média de cada tratamento ( $\pm$ EP) de *A. sp.1 aff. fraterculus*

Dose	Fecundidade		Fertilidade	
	♂ irradiados	♀ irradiados	♂ irradiados	♀ irradiados
	x	x	x	x
	♀ não-irradiados	♂ não-irradiados	♀ não-irradiados	♂ não-irradiados
<b>0 Gy</b>	841,2 $\pm$ 214,5 n=4206	882,4 $\pm$ 364,1 n=4412	76,6 $\pm$ 8,5	71,24 $\pm$ 7,1
<b>40 Gy</b>	813,2 $\pm$ 273,3 n=4066	0 n=0	7,88 $\pm$ 2,4	0
<b>50 Gy</b>	924,4 $\pm$ 335,3 n=4622	0 n=0	5,3 $\pm$ 2,0	0
<b>60 Gy</b>	842,2 $\pm$ 344,3 n=4211	0 n=0	1,92 $\pm$ 1,0	0
<b>70 Gy</b>	695,4 $\pm$ 195,3 n=3477	0 n=0	0,76 $\pm$ 0,2	0
<b>80 Gy</b>	902,2 $\pm$ 326,3 n=4511	0 n=0	0,64 $\pm$ 0,6	0



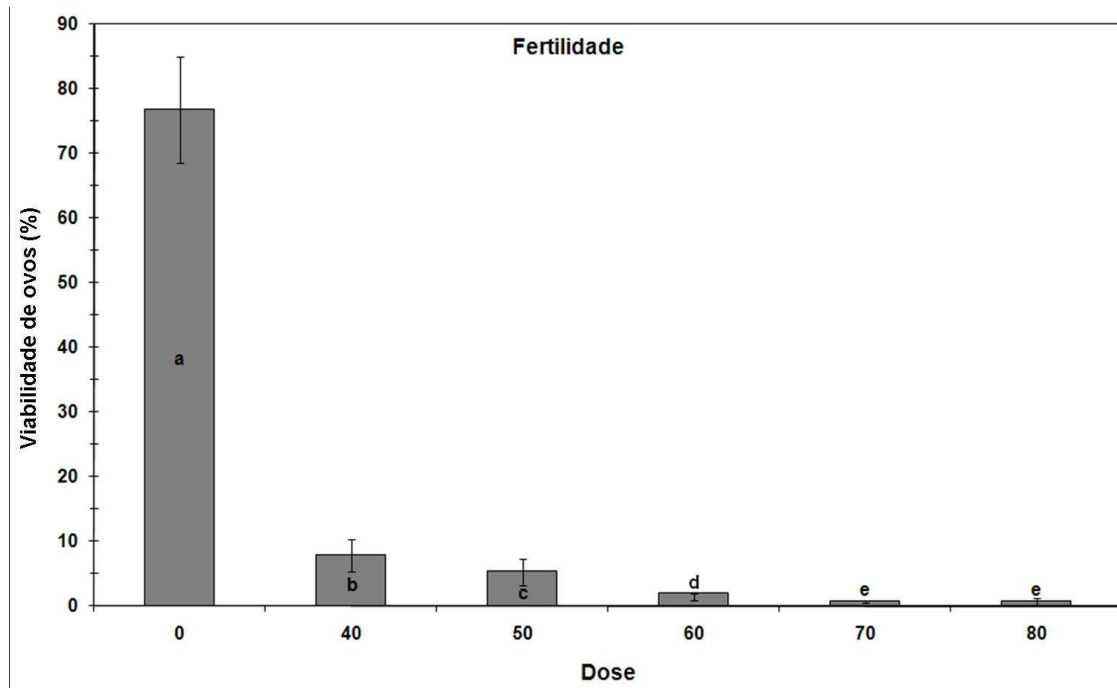


Figura 4.4 - Índices de fertilidade de ovos de *A. fraterculus* provenientes de cruzamentos de fêmeas não-irradiadas com machos irradiados. Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si (Teste de Mann-Whitney, ao nível de 5%)

Pode-se verificar que *A. sp. 1 aff. fraterculus* é bastante sensível à radiação, pois a menor dose (40 Gy) utilizada no experimento foi responsável uma esterilização da ordem de 92,12 %, ou seja, a viabilidade dos ovos provenientes dos cruzamentos de machos irradiados com fêmeas normais foi, em média, 7,88%. O aumento gradativo da dose de radiação provocou um decréscimo da fertilidade e os menores valores foram obtidos com as doses de 70 e 80 Gy. Estas doses forma responsáveis por valores inferiores a 1%, enquanto o controle exibiu uma fertilidade de 76,84%. Em nenhum tratamento obteve-se 100% de esterilidade, o que não é necessário num programa de TIE, pois para se atingir a esterilidade plena, dose elevadas de radiação são necessárias, acarretando efeitos colaterais negativos no comportamento e competitividade dos insetos estéreis a serem liberados (WALDER, 2000). Os resultados aqui obtidos são compatíveis com os de Allinghi et al. (2007) e Mastrangelo (2009) que obtiveram 99% da redução de fertilidade utilizando uma dose de 60 e 62,7 Gy, respectivamente para uma linhagem argentina de *A. fraterculus*.

Resultados semelhantes foram encontrados para outras espécies do gênero, Rull et al. (2007), demonstraram que doses entre 40-80 Gy induziam 95% de

esterilidade nos machos irradiados de *A. ludens*. Walder e Calkins (1993), demonstraram que 50 Gy de raios gama induziam 100% de esterilidade em machos de *A. suspensa* (Loew) e Toledo et al. (2004) verificaram 99,5% de esterilidade em *A. obliqua* aplicando uma dose de 40 Gy.

Para *A. fraterculus*, os resultados de outros autores chegam a doses que alcançam 100% de esterilidade em machos, González et al. (1971), observaram a esterilidade a 40 Gy e Allinghi et al. (2007), afirma que 70 Gy alcança a esterilidade de 100% para machos e fêmeas. Neste trabalho a esterilidade de 100% em machos não foi alcançada nem com a maior dose utilizada (80Gy). Tais diferenças podem ser explicadas por pequenas diferenças na metodologia entre os trabalhos citados, como por exemplo, no caso da viabilidade de ovos, Allinghi et al. (2007) as verificou 72 h depois da oviposição, já presente esta verificação foi feita após 92 h. Outra explicação poderia ser o alto índice de variabilidade entre populações devido a diferenças de aspectos morfológicos e genéticos que *A. fraterculus* apresenta (MALAVASI; MORGANTI, 1982, STECK, 1999), representando o “complexo *fraterculus*” (SELIVON; PERONDINI, 1999). Os trabalhos foram realizados em três diferentes países, podendo ser todas linhagens diferentes entre si e apresentar cada uma sua dose de esterilização de 100%.

No caso das fêmeas irradiadas, a esterilização foi de 100% em todos os tratamentos, uma vez que não houve postura em nenhum tratamento. Apenas as moscas do tratamento controle (0 Gy) efetuaram posturas normalmente ao longo dos dias de coletas, alcançando uma taxa de eclosão de 71,4 %.

#### **4.5.2 Fecundidade**

A fecundidade de fêmeas normais cruzadas com machos irradiados com diferentes doses de radiação não se alterou (Tabela 4.2), apresentando uma média de 11,4 ovos por fêmea por dia durante o período de 5 dias

As fêmeas irradiadas com doses de 40 Gy até 80 Gy não ovipositaram durante o período observado. A explicação para este fato é a atrofia completa dos ovários a partir da dose de 40 Gy (WALDER; CALKINS, 1993). O mesmo foi observado por Allinghi et al. (2007) e Mastrangelo (2009) que obtiveram oviposição de fêmeas irradiadas apenas em doses de 20 Gy e 35 Gy respectivamente. Com dose igual ou superiores a 40 Gy não foi verificado oviposição.

O fato de ainda não haver uma linhagem sexual genética ou um método viável de sexagem em larga escala que permita apenas a liberação de machos de *A. fraterculus*, faz com que a dose de esterilidade de 100% para fêmeas seja de suma importância. A fertilidade residual nos machos é de menor importância, ela somente reduz a velocidade na qual a população será suprimida, já para fêmeas, uma fertilidade residual de 2%, por exemplo, seguindo uma razão de liberação de 100 insetos estéreis para 1 selvagem, na verdade dobraria o número de insetos da próxima geração (ROBINSON, 2005), o risco do aumento de picadas em frutos por estas fêmeas também fica eliminado (ALLINGHI et al., 2007).

#### 4.5.3 Emergência de adultos

A emergência dos adultos não foi alterada em relação aos tratamentos. Portanto as doses de radiação empregadas não interferiram neste parâmetro de controle de (Tabela 4.3). Foram feitas as seguintes contagens além da emergência de adultos, deformidades em machos e fêmeas, adultos semi-emergidos, e não emergidos. Nenhuma diferença estatística foi encontrada também nestes itens.

Tabela 4.3 – Porcentagem média de emergência e sobrevivência sob estresse de *A. fraterculus* irradiadas com diferentes doses de radiação

Doses (Gy)	Emergência (%±EP)	Sobrevivência (%±EP)
0	66,2±10,2 a	68±5,0 a
40	65,6±11,8 a	56±4,1 a
50	67,0±15,8 a	63±5,3 a
60	59,0± 7,1 a	61±4,3 a
70	63,0±11,7 a	60±4,3 a
80	61,8±13,4 a	74±4,0 a

\*Não há diferença entre médias seguidas pela mesma letra (Tukey, 1%), nas colunas

A média de emergência do controle ficou em 66,2% e, de acordo com Walder et al. (2008), a criação do Laboratório de Entomologia do CENA/USP, a mesma de onde foram retirados os indivíduos do experimento, tem uma taxa de emergência acima de 80%. Vera et al. (2007) relata também emergência superior a 80%. O baixo valor de emergência em todos os tratamentos pode ser decorrente da

difícil manutenção da umidade relativa da sala onde foram desenvolvidos alguns ensaios, entre eles o de emergência de adultos

Apesar da emergência abaixo da esperada, o fato de todos os tratamentos inclusive o controle não apresentarem diferença de valores, descarta a possibilidade de tal resultado ser decorrente da irradiação.

#### 4.5.4 Longevidade sob estresse

O parâmetro de longevidade não foi afetado significativamente pelas doses de radiação aplicada (Tabela 4.3). As porcentagens de indivíduos vivos após 48h de todos os tratamentos apresentam valores acima de 55%. Mastrangelo (2009) apesar de utilizar outras doses (15, 30, 60, 90 e 120 Gy) também não encontra diferença na sobrevivência dos indivíduos entre os tratamentos, porém suas porcentagens de sobrevivência são superiores a 60%. As porcentagens mínimas pós-irradiação de sobreviventes aceitáveis segundo a FAO/IAEA/USDA (2003) para *A. ludens* é de 55% e para *A. obliqua* de 40% após 72 h.

#### 4.5.5 Habilidade de vôo

As porcentagens de cada tratamento para cada uma das categorias (Não-emergidas, Semi-emergidas, Deformadas, Não-voadoras, e Voadoras) não foram afetadas pelas doses aplicadas (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Médias, em porcentagem, de todas as categorias observadas no teste de vôo de *A.sp1.aff. fraterculus* irradiadas com diferentes doses de radiação antes da emergência (média±erro padrão)

Doses (Gy)	Voadoras	Não-voadoras	Deformadas	Semi-emergidas	Não-emergidas
0	56,5±11,6	3,3±1,7	6,0±2,9	3,0±2,7	31,8± 8,8
40	57,8±12,8	4,5±0,6	7,0±3,8	3,0±0,8	31,3±13,8
50	53,5±11,8	3,0±1,6	7,8±3,0	4,0±3,2	31,5±18,3
60	48,8±10,2	5,0±4,1	7,3±2,1	3,8±2,1	37,3± 7,4
70	51,5±13,1	3,3±2,6	7,8±2,6	3,5±1,9	35,5±11,6
80	49,3±14,1	5,0±2,3	4,3±1,0	4,3±1,0	36,5±13,0

Mastrangelo (2009) não encontrou valores com diferenças significativas entre as doses e as porcentagens de voadoras foram superiores a 52%. As porcentagens

mínimas pós-irradiação que são aceitáveis segundo a FAO/IAEA/USDA (2003) são de 60% de voadoras para genetic sexing strains (GSS) de *C. capitata*, 80% para *A. suspensa*, e 72% para *A. obliqua*, não há relatos no manual da FAO a respeito de índices para *A. fraterculus*.

#### 4.5 Conclusões

Com base nos resultados obtidos nos bioensaios de radiobiologia deste trabalho, pode-se concluir que:

(1) Os parâmetros de fecundidade (de fêmeas férteis cruzadas com machos irradiados), emergência de adultos, porcentagem voadores e sobrevivência sob estresse não foram afetados pelas doses aplicadas.

(2) Todas as doses utilizadas (40, 50, 60, 70 e 80 Gy) foram suficientes para completa atrofia dos ovários das fêmeas, com conseqüente ausência de oviposição.

(3) Nenhuma dose de radiação utilizada (40, 50, 60, 70 e 80 Gy) causou a esterilização de 100% em machos de *A. sp 1 aff. fraterculus*, porém a partir de 60 Gy foi possível obter queda na fertilidade de 98%.

(4) A dose recomendada para a esterilização de machos de *A. sp.1 aff. fraterculus* foi determinada como sendo de 70 Gy, por ser a menor dose que conferiu mais de 99% de esterilidade.

#### REFERÊNCIAS

ALLINGHI, A.; CALCAGNO, G.; PETIT-MARTY, N.; CENDRA, P. G.; SEGURA, D.; VERA, T.; CLADERA, J.; GRAMAJO, C.; WILLINK, E.; VILARDI, J. C. Compatibility and competitiveness of a laboratory strain of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) after irradiation treatment. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 90, n. 1, p. 27-32, 2007.

FAO/IAEA/USDA. **Product quality control and shipping procedures for sterile mass-reared tephritid fruit flies**. Version 5.0. Vienna: IAEA, 2003. 85 p.

GONZÁLEZ, B. J.; VARGAS, V. C.; JARA, P. B. Estudios sobre la aplicación de la técnica de machos estériles en el control de la mosca sudamericana de la fruta *Anastrepha fraterculus* (Wied.). **Revista Peruana de Entomología**, Lima, v. 14, p. 77–83, 1971.

HOOPER, G. H. S. Sterilization of the Mediterranean fruit fly with gamma radiation effect on male competitiveness and change in fertility of females alternately mated with irradiated and untreated males. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 65, p. 1–6, 1972.

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.

KLASSEN, W.; LINDQUIST, D. A.; BUYCKS, E. J. Overview of the Joint FAO/IAEA Division's involvement in the fruit fly sterile insect technique programs. In: CALKINS, C. O.; KLASSE, W.; LIEDO, P. (Ed.). **Fruit flies and the sterile insect technique**. Boca Raton: CRS Press, 1994. p. 3-26.

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

MALAVASI, A.; MORGANTI, J. S. Genetic variation in natural populations of *Anastrepha* (Diptera:Tephritidae). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 5, p. 263-278, 1982.

MASTRANGELO, T. A. **Esterilização de moscas-das-frutas (Diptera:Tephritidae) com raios-X para Programas de Técnica do Inseto Estéril**. 2009. 91 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MOSCAMED BRASIL. **Relatório Anual 2006**. Juazeiro, Bahia, 2006. 47 p.

RIDGWAY, R. L.; INSCOE, M. N.; THORPE, K. W. Advances and trends in managing insect pests. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Management of insect pests: nuclear and related molecular and genetic techniques**. Vienna, Austria: FAO/IAEA, 1992. p. 3-15.

ROBINSON, A. S. Genetic basis of the Sterile Insect Technique. In: DYCK, V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. **Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management**. Berlin: Springer, 2005. p. 95-114.

RULL, J.; DIAZ-FLEISCHER, F.; ARREDONDO, J. Irradiation of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) Revisited: Optimizing Sterility Induction. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 100, n. 4, p. 1153-1159, 2007.

SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P. Egg-shell morphology in two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 91, p. 473-478, 1999.

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, Austria, 1999. p. 13-20.

TOLEDO, A. J. Optimum dosage for irradiating *Anastrepha obliqua* pupae to obtain highly competitive sterile adults. In: ALUJA, M.; LIEDO, P. **Fruit flies biology and management**. New York: Springer, 1993. p. 301-304.

TOLEDO, A. J.; RULL, J.; OROPEZA, A.; HERNÁNDEZ, E.; LIEDO, P. Irradiation of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) Revisited: Optimizing Sterility Induction. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 97, n. 2, p. 383–389, 2004.

VELASCO, H.; ENKERLIN, D. Determinación de la dosis óptima de irradiación relativa a la competitividad del macho estéril de *Anastrepha ludens* (Loew); su atracción a trampas de color y al atrayente sexual. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Sterile insect technique and radiation in insect control**. Vienna, Austria, 1982. p. 323-339. (Proceedings Series).

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

WALDER, J. M. M.; CALKINS, C. O. Effects of gamma radiation on the sterility and behavioral quality of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 50, p. 157-165, 1993.

WALDER, J. M. M. Técnica do Inseto Estéril - Controle genético. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**. Conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 151-158.

WALDER, J. M. M.; COSTA, M. L. Z.; ALCARDE, L. D.; COSTA, K. Z.; CANALE, R. A.; MASTRANGELO, T. de A.; LOPES, L. A.; KAMIYA, A. C. Desenvolvimento de sistema de criação massal para *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 22., 2008, Uberlândia. **Resumos...** Uberlândia: SBE, 2008. 1 CD-ROM.