



MARIANA MACEDO DE SOUZA

**INTERAÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS
COM O PARASITOIDE *Diachasmimorpha longicaudata*
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE) PARA O CONTROLE DE
Ceratitis capitata (DIPTERA: TEPHRITIDAE)**

**LAVRAS – MG
2020**

MARIANA MACEDO DE SOUZA

**INTERAÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS COM O
PARASITOIDE *Diachasmimorpha longicaudata* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)
PARA O CONTROLE DE *Ceratitis capitata* (DIPTERA: TEPHRITIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Alcides Moino Junior
Orientador

**LAVRAS – MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Souza, Mariana Macedo de.

Interação de nematoides entomopatogênicos com o parasitoide
Diachasmimorpha longicaudata (Hymenoptera: Braconidae) para o
controle de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) / Mariana
Macedo de Souza. - 2020.

61 p. : il.

Orientador(a): Alcides Moino Junior.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Moscas-das-frutas. 2. Agentes de biocontrole. 3. Associação.
I. Moino Junior, Alcides. II. Título.

MARIANA MACEDO DE SOUZA

**INTERAÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS COM O
PARASITOIDE *Diachasmimorpha longicaudata* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)
PARA O CONTROLE DE *Ceratitidis capitata* (DIPTERA: TEPHRITIDAE)**

**INTERACTION OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES WITH THE
PARASITOID *Diachasmimorpha longicaudata* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)
FOR THE CONTROL OF *Ceratitidis capitata* (DIPTERA: TEPHRITIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM: 06 de Fevereiro de 2020.

Prof. Dr. Elton Lucio de Araujo

UFERSA

Profa. Dra. Rosangela Cristina Marucci

UFLA

Prof. Dr. Alcides Moino Junior
Orientador

**LAVRAS – MG
2020**

À família Macedo
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente, por me dar saúde e forças para superar todas as adversidades e por tudo que eu conquistei até agora, mas peço a Ele para me dar sabedoria para conquistar muito mais;

À toda minha família, em especial à minha mãe, Cleilda Macedo (Uá), à minha tia Claudete Macedo (Detinha) e aos meus avós, Maria Tereza de Macedo (Didiga) e Antônio Deocleciano de Macedo (Antônio Aurora) pela compreensão, ao serem privados em muitos momentos da minha companhia e atenção, pelo esforço que fizeram para que eu pudesse superar cada obstáculo em meu caminho em busca dos meus sonhos e, principalmente, pelo amor imenso que vocês têm por mim;

Ao professor Alcides Moino Junior pela confiança depositada na minha proposta de projeto e pela orientação, dedicação, paciência, disponibilidade e esclarecimentos necessários para o meu desempenho durante o mestrado;

À banca examinadora, composta pelos professores Elton Lucio de Araujo, Rosangela Cristina Marucci pela disponibilidade de participar e pelas contribuições pessoais acerca da dissertação;

À Clarice Diniz Alvarenga Corsato e a Elania Clementino Fernandes por ter tirado um tempo em suas atividades para o preparo e envio das populações de insetos utilizadas neste trabalho;

À Marvin Mateou Pec Hernández pela paciência, preocupação, disponibilidade, dedicação e preciosa ajuda nas análises estatística, e principalmente pelo carinho e amizade;

A Universidade Federal de Lavras (UFLA) que me proporcionaram as condições necessárias para que eu alcançasse meus objetivos;

Aos professores do Departamento de Entomologia da UFLA os quais eu tive a honra de poder compartilhar de seus conhecimentos, seja durante as disciplinas que cursei, os seminários e palestras que assisti ou mesmo nas conversas pelos corredores;

À secretária do departamento, Isabel Cristina Nogueira Alves de Melo, por sempre resolver os meus problemas com todo empenho e dedicação;

Aos membros do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos pela ajuda nos trabalhos realizados, pela amizade, carinho, apoio, momentos de descontração, e principalmente, pelas trocas de conhecimentos;

Aos membros do Núcleo de Estudos em Entomologia (NEENTO) pelos conhecimentos e experiências compartilhadas que me ajudarão durante a minha vida profissional;

À Marcelo da Silva Santos por está ao meu lado no momento mais importante da minha vida, a sua ajuda foi fundamental no meu processo de transição e adaptação a nova vida em Minas Gerais;

Aos meus amigos de Assú/Mossoró pela amizade sincera mesmo com a distância, estiveram ao meu lado sempre que precisei;

Aos meus novos amigos de Lavras por toda a vivência e companheirismo durante esse ciclo de pós-graduação;

À Yoshiki Fujiwara por ser um exemplo de pessoa que sempre me apoio nos meus estudos;

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À todos, muito Obrigada!

*Eu me lembro muito bem do dia que eu cheguei
Jovem que desce do Norte para cidade grande
Os pés cansados e feridos de andar léguas tiranas
De lágrimas nos olhos de ler o Pessoa
E de ver o verde da cana
Em cada esquina que eu passava um guarda me parava
Pedia os meus documentos e depois sorria
Examinando o 3x4 da fotografia
Estranhando o nome do lugar de onde eu vinha*

(Fotografia 3x4 - Belchior)

RESUMO

Ceratitis capitata (Diptera: Tephritidae) é considerada uma das principais pragas da fruticultura mundial, devido aos danos ocasionados pelas larvas, que consomem a polpa dos frutos tornando-os impróprios para a comercialização. Atualmente, o Manejo Integrado de Pragas tem sido bastante empregado devido às preocupações ambientais e a saúde humana, utilizando um somatório de estratégias para controlar as moscas-das-frutas. O controle biológico tem sido o mais utilizado a partir de liberações do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). No entanto, em alguns casos, apenas o uso do parasitoide não é o suficiente, sendo necessário adotar outro agente de biocontrole. Nesse contexto, os nematoides entomopatogênicos (NEP) mostram-se promissores no controle de *C. capitata*, pois esta possui uma fase do seu ciclo de vida no solo. A associação entre os agentes biológicos pode aumentar a eficácia do controle das pragas, mas também pode produzir interação antagônica. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a compatibilidade dos NEP com o parasitoide *D. longicaudata* no controle associado de *C. capitata*, em condições de laboratório. Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da Universidade Federal de Lavras – UFLA, em condições controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$, 12h de fotofase). Para avaliar a patogenicidade dos NEP sobre larvas de *C. capitata* parasitadas e não parasitadas por *D. longicaudata* foram aplicados 1mL de suspensão contendo 100 juvenis infectantes (JI)/inseto de isolados nativos e exóticos de NEP. Foi avaliado, também, o efeito das concentrações e o tempo de infecção do isolado *Heterorhabditis* sp. Alho em larvas parasitadas e não parasitadas. Por fim, avaliou-se o comportamento de NEP em distinguir os tipos de larvas em uma arena com chance de escolha. Verificou-se que todos os NEP foram virulentos a larvas parasitadas e não parasitadas, sendo o isolado *Heterorhabditis* sp. Alho aquele que ocasionou a menor mortalidade das larvas parasitadas (79,6%). A mortalidade das larvas foi proporcional ao aumento da concentração dos juvenis infectantes, sendo necessário uma concentração menor de juvenis para provocar uma elevada mortalidade de larvas parasitadas, pois a CL_{50} e CL_{90} de larvas parasitadas foi de apenas 19,88 e 93,54 JI/larva, respectivamente, enquanto que das larvas não parasitadas foi de 45,20 e 181,86 JI/larva, respectivamente. Em teste de opção de escolha, houve preferência dos NEP por larvas parasitadas, provocando uma mortalidade de 91,67%. A infecção dos nematoides ocorre com até 12h e após esse período, não há acréscimo na mortalidade independentemente do tipo de larvas. Com isso, conclui-se as larvas parasitadas são mais susceptíveis aos NEP do que as larvas não parasitadas, havendo uma interação antagônica entre o parasitoide *D. longicaudata* e os NEP, sendo necessário estabelecer estratégias de liberação quando os dois agentes forem utilizados para o controle de *C. capitata*.

Palavras-chave: Moscas-das-frutas. Agentes de biocontrole. Associação.

ABSTRACT

Ceratitis capitata (Diptera: Tephritidae) is considered one of the main pests of fruit production worldwide, due to the damage caused by the larvae which consume the pulp of the fruits, making them unsuitable for commercialization. Currently, Integrated Pest Management has been widely used due to environmental concerns and human health, using a sum of strategies to control fruit flies. Biological control has been the most used since releases of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). However, in some cases, just using the parasitoid is not enough, and it is necessary to adopt another biocontrol agent. In this context, entomopathogenic nematodes (EPN) are promising in the control of *C. capitata*, as it has a phase in its life cycle in the soil. The association between biological agents can increase the effectiveness of pest control, but it can also produce antagonistic interaction. Thus, the objective of this work was to evaluate the compatibility of EPN with the parasitoid *D. longicaudata* in the associated control of *C. capitata*, under laboratory conditions. The bioassays were conducted at the Laboratory of Pathology and Microbial Control of Insects at the Federal University of Lavras - UFLA, under controlled conditions (25 ± 2 ° C, UR $70 \pm 10\%$, 12h photophase). To evaluate the pathogenicity of EPN on larvae of *C. capitata* parasitized and not parasitized by *D. longicaudata*, 1mL of suspension containing 100 juvenile infective (IJ)/insect from native and exotic EPN isolates were applied. The effect of the concentrations and the time of infection of the isolate *Heterorhabditis* sp. Alho in parasitized and non-parasitized larvae. Finally, the behavior of EPN in distinguishing the types of larvae in an arenas with a chance of choice was evaluated. It was found that all EPN were virulent to parasitized and non-parasitized larvae, with the isolate *Heterorhabditis* sp. Alho the one that caused the lowest mortality of parasitized larvae (79.6%). Larval mortality was proportional to the increase in the concentration of juvenile infectors, requiring a lower concentration of juveniles to cause a high mortality of parasitized larvae, since the LC_{50} and LC_{90} of parasitized larvae was only 19.88 and 93.54 IJ/larva, respectively, while the non-parasitized larvae were 45.20 and 181.86 IJ/ larva, respectively. In the choice test, the EPN favored parasitized larvae, causing a mortality of 91.67%. Nematode infection occurs within 12 hours and after this period, there is no increase in mortality regardless of the type of larvae. Thus, it is concluded that parasitized larvae are more susceptible to EPN than non-parasitized larvae, with an antagonistic interaction between the parasitoid *D. longicaudata* and the EPN, and it is necessary to establish release strategies when the two agents are used for control *C. capitata*.

Keywords: Fruit flies. Biocontrol agents. Association.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Larvas de terceiro ínstar de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) (A) Larvas não parasitadas; (B) Larvas parasitadas..... 38
- Figura 2:** Larvas de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) com a sintomatologia de infecção por nematoides entomopatogênicos (A) Sintomas ocasionados por nematoides do gênero *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae); (B) Sintomas ocasionados por nematoides do gênero *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae)..... 38
- Figura 3:** Larva de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) parasitada por *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). 42
- Figura 4:** Mortalidade das larvas de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) em diferentes concentrações de Juvenis Infectantes (JI) de *Heterorhabditis* sp. Alho (Rhabditida: Heterorhabditidae). (A) Mortalidade das larvas não parasitada; (B) Mortalidade das larvas parasitadas por *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). 44
- Figura 5:** Mortalidade em larvas de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) parasitadas e não parasitadas por *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) ocasionada por diversas concentrações de *Heterorhabditis* sp. Alho (Rhabditida: Heterorhabditidae)..... 45
- Figura 6:** Análise de regressão para a mortalidade confirmada de larvas de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) submetidas a diferentes concentrações de *Heterorhabditis* sp. Alho (Rhabditida: Heterorhabditidae). 45
- Figura 7:** Larva do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) que conseguiram eclodir dentro da larva de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) infectada por *Heterorhabditis* sp. Alho (Rhabditida: Heterorhabditidae)..... 47
- Figura 8:** Mortalidade de larvas de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) em teste de preferência do isolado de *Heterorhabditis* sp. Alho (Rhabditida: Heterorhabditidae) por larvas parasitadas ou não parasitadas por *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae)..... 47
- Figura 9:** Mortalidade das larvas de *Ceratitis capitata* parasitadas e não parasitadas por *Diachasmimorpha longicaudata* em diferentes tempos de exposição aos Juvenis Infectantes (JI) de *Heterorhabditis* sp. Alho..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da dieta artificial fornecida para larvas de <i>Ceratitis capitata</i> (Diptera: Tephritidae).....	34
Tabela 2: Isolados de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae e Steinernematidae) utilizados nos bioensaios.....	35
Tabela 3: Composição da dieta artificial fornecida para lagartas de <i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera: Pyralidae).....	36
Tabela 4: Mortalidade confirmada (\pm Erro Padrão) por nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae e Steinernematidae) em larvas de <i>Ceratitis capitata</i> (Diptera: Tephritidae) parasitadas e não parasitadas por <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> (Hymenoptera: Braconidae).....	43
Tabela 5: Tabela: concentração de Juvenis Infectantes (JI) de <i>Heterorhabditis</i> sp. Alho (Rhabditida: Heterorhabditidae) necessária para causar mortalidade de larvas de <i>Ceratitis capitata</i> (Diptera: Tephritidae) parasitadas e não parasitadas por <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> (Hymenoptera: Braconidae).....	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	GERAL.....	18
2.2	ESPECÍFICOS.....	18
3	HIPÓTESES	19
3.1	GERAL.....	19
3.2	ESPECÍFICOS.....	19
4	REVISÃO DE LITERATURA	20
4.1	Fruticultura.....	20
4.2	Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae)	21
4.2.1	<i>Ceratitis capitata</i>	22
4.2.2	Danos	23
4.3	Métodos de controle de moscas-das-frutas	23
4.3.1	Controle Biológico.....	25
4.3.1.1	Parasitoides	26
4.3.1.1.1	<i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	27
4.3.2	Controle Microbiano	28
4.3.2.1	Nematoides entomopatogênicos.....	29
4.4	Interação nematoides e parasitoides	30
5	METODOLOGIA	33
	Local dos experimentos	33
	Criação de <i>Ceratitis capitata</i>	33
	Criação do parasitoide <i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	34
	Obtenção dos Nematoides Entomopatogênicos	35
	Criação de <i>Galleria mellonella</i>	35

Multiplicação e manutenção de nematoides entomopatogênicos.....	36
Bioensaio 1: Patogenicidade de isolados de nematoides entomopatogênicos sobre larvas de <i>C. capitata</i> parasitadas e não parasitadas por <i>D. longicaudata</i>	37
Bioensaio 2: Efeito de concentrações de isolados de nematoides entomopatogênicos sobre larvas de <i>C. capitata</i> parasitadas por <i>D. longicaudata</i>	39
Bioensaio 3: Teste de infecção com chance de escolha por larvas de <i>C. capitata</i> parasitadas ou não parasitadas por <i>D. longicaudata</i>	39
Bioensaio 4: Tempo de exposição de larvas de <i>C. capitata</i> parasitadas e não parasitadas por <i>D. longicaudata</i> a nematoides entomopatogênicos	40
Análise Estatística.....	40
6 RESULTADOS	42
Bioensaio 1: Patogenicidade de isolados de nematoides entomopatogênicos sobre larvas de <i>C. capitata</i> parasitadas e não parasitadas por <i>D. longicaudata</i>	42
Bioensaio 2: Efeito de concentrações de isolados de nematoides entomopatogênicos sobre larvas de <i>C. capitata</i> parasitadas por <i>D. longicaudata</i>	43
Bioensaio 3: Teste de infecção com chance de escolha por larvas de <i>C. capitata</i> parasitadas ou não parasitadas por <i>D. longicaudata</i>	46
Bioensaio 4: Tempo de exposição de larvas de <i>C. capitata</i> parasitadas e não parasitadas por <i>D. longicaudata</i> a nematoides entomopatogênicos	48
7 DISCUSSÃO	49
8 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

A fruticultura brasileira reúne atrativos e condições favoráveis para produzir e exportar frutas ao longo do ano. Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, com produção anual em torno de 37 milhões de toneladas (MALISZEWSKI, 2019). Apesar de ocupar uma posição relevante no cenário mundial, a exportação dessa produção ainda é pequena, devido às exigências fitossanitárias impostas pelos países importadores que fazem uma série de restrições quarentenárias, visando proteger-se de organismos praga (COSTA et al., 2007). A infestação por moscas-das-frutas é um dos principais entraves à exportação de frutas *in natura*.

A mosca-das-frutas *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae) é considerada a espécie mais nociva à fruticultura mundial, devido à ampla distribuição no mundo, capacidade de adaptar-se a diferentes condições climáticas e ampla variedade de hospedeiros (THOMAS et al., 2001; ZUCCHI; MORAES, 2012; SZYNISZEWSKA; TATEM, 2014).

Além de ser um dos maiores entraves às exportações, as moscas-das-frutas podem causar danos consideráveis à produção (ARAUJO; ZUCCHI, 2003). Os danos estão relacionados com a oviposição pelas fêmeas, que inserem seu ovipositor na casca do fruto e depositam os ovos, causando lesões que reduzem a qualidade e o valor comercial das frutas. Após a eclosão, as larvas consomem a polpa dos frutos, tornando-os impróprios para o consumo humano (ARAUJO et al., 2013; AZEVEDO et al., 2013). Os prejuízos ocasionados por esses tefritídeos também estão relacionados ao monitoramento da praga nos pomares e aos elevados custos de produção, devido às constantes aplicações de inseticidas (AZEVEDO et al., 2013).

O controle químico ainda é a forma mais tradicional de controle dessa praga, principalmente através da aplicação de inseticidas na parte aérea da planta, nas formas de cobertura total ou iscas tóxicas (CAMARGOS; COSTA; MIRANDA, 2017). No entanto, o uso constante de inseticidas pode acarretar problemas de desequilíbrio ambiental e a saúde humana.

Em virtude disso, o Manejo Integrado de Praga (MIP) combina uma variedade de táticas para gerenciar a população de moscas-das-frutas, de modo que essas práticas sejam ecologicamente sustentáveis, rentáveis e seguras para o agricultor e consumidor (TIMPRASERT; DATTA; RANAMUKHAARACHCHI, 2014). Normalmente, o MIP inclui uma combinação do controle químico e controle biológico (AKMAN; COMAR;

HROZENCIK, 2018), pois apesar do uso de inseticida apresentar resultados satisfatórios, a maioria das moléculas são registradas apenas para os adultos. As larvas e as pupas ficam protegidas nos frutos de muitas plantas hospedeiras e no solo, respectivamente e não são atingidas pelas pulverizações (RAGA; SATO, 2016). Desta forma, o controle biológico constitui o principal mecanismo nas fases larval e pupal de moscas-das-frutas.

Em todo o mundo, programas de controle biológico de moscas-das-frutas são baseados em métodos inundativos a partir de liberação de inimigos naturais, produzidos em criações massais, visando uma supressão populacional da praga (CARVALHO; NASCIMENTO; MATRANGOLO, 2000; CAMARGOS; COSTA; MIRANDA, 2017).

Dentre os inimigos naturais das moscas-das-frutas, os parasitoides são os mais relevantes, uma vez que o parasitismo pode ocorrer nas diversas fases de desenvolvimento da praga (MOHAMED; RAMADAN; EKESI, 2016). Atualmente, *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead, 1905) (Hymenoptera: Braconidae) é o parasitoide mais utilizado no controle biológico de tefritídeos praga em todo o mundo, em virtude da facilidade de criação massal e fácil adaptação às várias espécies de moscas-das-frutas de importância econômica (GARCIA; RICALDE, 2013; MEIRELLES; REDAELLI; OURIQUE, 2015; CAMARGOS; COSTA; MIRANDA, 2017). Esses opíneos são endoparasitoides solitários, coinobiontes, parasitando facilmente os três ínstares de *C. capitata* (ROHR; JAHNKE; REDAELLI, 2019).

Porém, nas regiões onde *C. capitata* é predominante, apenas a utilização de parasitoides não é o suficiente para seu controle, devendo adotar-se, sempre que possível, pelo menos um agente para cada estágio do ciclo de vida da mosca para reduzir a sua população nos pomares (PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019).

Dessa forma, o controle microbiano é uma opção viável a ser incorporado no manejo de moscas-das-frutas. Nesse contexto, os nematóides entomopatogênicos (NEP) pertencentes aos gêneros *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae) e *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) mostram-se promissores no controle desses insetos-pragas (CARVALHO; NASCIMENTO; MATRANGOLO, 2000). Vários estudos já foram realizados para avaliar a eficiência de nematóides steinernematídeos e heterorhabditídeos contra *C. capitata* (SHAURUB et al., 2015). Eles atuam quando as larvas penetram no solo ou na serapilheira, após abandonar o fruto, para a formação dos pupários (PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019).

É essencial que a aplicação de NEP não interfira na população dos parasitoides que aumentam a resiliência dos sistemas de cultivo por meio de sua presença contínua. Desta forma, os diferentes agentes de controle adicionais devem ser compatíveis a fim de conservar

suas populações (GONZALEZ et al., 2016). No entanto, existe o risco das aplicações em altas densidades de NEP, impactar negativamente os parasitoides, produzindo uma interação antagônica entre os dois grupos, resultando em predação intraguilda (EVERARD; GRIFFIN; DILLON, 2009; MBATA; SHAPIRO-ILAN, 2010).

A predação intraguilda ocorre quando duas espécies que compartilham um hospedeiro, estabelecem uma interação (predação ou parasitismo) entre si (EVERARD; GRIFFIN; DILLON, 2009). Sabe-se que os NEP têm um efeito adverso no desenvolvimento de alguns parasitoides (MRÁČEK; SPITZER, 1983; EVERARD; GRIFFIN; DILLON, 2009; LORDAN et al., 2014), por meio de infecção, produção de fatores tóxicos, ou até mesmo pela morte do hospedeiro antes que o parasitoide complete seu desenvolvimento (MAGALHÃES; MINNERAT; ALVES, 1998). Entretanto, é provável que esses efeitos colaterais potenciais variem significativamente, dependendo do tipo de inimigo natural (GONZALEZ et al., 2016).

Como ambos os agentes de biocontrole podem ser aplicados simultaneamente dentro de um programa de controle de pragas, a compatibilidade entre NEP e o parasitoide *D. longicaudata* deve ser verificada antes de serem usados conjuntamente no controle de *C. capitata*.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Verificar a compatibilidade entre o parasitoide *D. longicaudata* e os NEP no controle associado da mosca-das-frutas *C. capitata*, em condições de laboratório.

2.2 ESPECÍFICOS

a) Verificar se NEP provocam a morte das larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata*.

b) Identificar o isolado de nematoides que ocasiona a menor mortalidade de larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata*.

c) Definir a concentração da suspensão de nematoides compatível com *D. longicaudata*.

d) Determinar a CL₅₀ e a CL₉₀ para larvas de *C. capitata* parasitadas e não parasitadas.

e) Testar a capacidade dos NEP em distinguir entre hospedeiros parasitados e não parasitados.

f) Mensurar o tempo que os NEP penetram nas larvas de *C. capitata* parasitadas e não parasitadas por *D. longicaudata*.

3 HIPÓTESES

3.1 GERAL

O parasitoide *D. longicaudata* e o NEP podem apresentar uma interação antagônica quando são utilizados simultaneamente no controle da mosca-das-frutas *C. capitata*.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) As larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata* são susceptíveis aos NEP.
- b) Há pelo menos um isolado de nematoides que ocasiona a menor mortalidade de larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata*.
- c) A concentração da suspensão de nematoides compatível com *D. longicaudata* é baixa e ocasiona uma alta mortalidade da praga.
- d) As concentrações letais (CL₅₀ e a CL₉₀) para larvas de *C. capitata* parasitadas e não parasitadas deve ser baixa.
- e) Os NEP têm capacidade em distinguir entre hospedeiros parasitadas e não parasitadas por *D. longicaudata*.
- f) O tempo gasto pelos NEP penetrarem nas larvas de *C. capitata* deve ser maior nas larvas parasitadas por *D. longicaudata*.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Fruticultura

Em valores correntes, o Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio brasileiro atingiu um valor de U\$ 1.441.758 em 2018. No período de janeiro a setembro de 2019 houve um crescimento de 0,21%, pressionado pelo elevado custo de produção da safra 2019 e pelo menor preço médio dos produtos do segmento, em comparação ao mesmo período de 2018 (CEPEA, 2019a).

A queda do preço das commodities agrícolas fez com que houvesse uma redução no valor das exportações agropecuárias mundiais nos últimos anos. No entanto, foi compensada pela elevação da quantidade exportada com preços mais baixos (MAPA, 2017a). Em 2019, o volume exportado pelo agronegócio brasileiro foi superior ao verificado no ano anterior (CEPEA, 2019b).

Mesmo diante deste cenário da economia brasileira, a fruticultura é um setor em expansão, devido à sua importância na inserção de uma alimentação saudável. As frutas são a base da saúde e bem-estar das pessoas por apresentar qualidades funcionais importantes na prevenção de doenças, além da evolução na qualidade dos produtos, cada vez mais saborosos e bem apresentados para os consumidores (ABRAFRUTAS, 2018; KIST et al., 2018).

No contexto econômico, o setor hortifruti apresenta grande potencial produtivo, alto valor agregado por área e um grande número de empregos, na comparação com outras culturas. A fruticultura, geralmente, é desenvolvida em pequenas áreas, no entanto, apresenta uma produtividade entre 30 a 80 toneladas por hectare e representa 6 milhões de empregos diretos, ou 27% do total gerado pela produção agrícola nacional, ocupando apenas 2,4 milhões de hectares (KIST et al., 2018).

A área de frutas cresceu 3,2% em 2019, sobretudo pelos investimentos em manga e mamão (HFBRASIL, 2020), com destaque para os Estados do Rio Grande do Norte, Ceará, Pernambuco, Bahia, Goiás e Minas Gerais que apresentaram crescimento de produção em razão das condições climáticas e relevo, uso de tecnologias, valor da terra, incentivos e a própria expansão da demanda (KIST et al., 2018).

Apesar de ocupar uma posição relevante no cenário mundial, apenas 2,5% da produção total de frutas são exportadas por ano, colocando o Brasil na vigésima terceira posição no ranking dos exportadores mundiais, ficando atrás de outros países latino americanos produtores como o Chile e, mais recentemente, o Peru (MAPA, 2017b).

No primeiro semestre de 2019, houve um aumento significativo de 12% nas exportações de frutas impulsionado pela tendência do mercado internacional por frutas tropicais tradicionais como manga, melão, melancia, mamão, e pelas crescentes demandas pelo abacate, uvas de mesa, maçãs e a lima ácida (limão tahiti) (ABRAFRUTAS, 2018; CEPEA, 2019b). Com isso, de abril a junho de 2019 foram exportadas 429.706 toneladas de frutas, com um aumento de 21% em volume e 15% em valor comparado ao mesmo período do ano anterior, com destaque para a uva, banana, manga e melões (ABRAFRUTAS, 2019).

Esse aumento de trânsito internacional leva a um incremento na probabilidade de disseminação de pragas de frutas serem introduzidas indevidamente, associadas às próprias frutas e/ou a materiais de embalagem. As consequências disso incluem, dentre outras, a redução de acesso ao mercado, principalmente no caso em que a praga possui importância quarentenária para os mercados de destino, como é o caso de diversas espécies de tefritídeos (MAPA, 2017b).

4.2 Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae)

Os membros da família Tephritidae estão entre as pragas de frutíferas mais importantes do mundo. A maioria das espécies desta família possui o comprimento do corpo variando de 1 a mais de 20 mm e possui asas com listras ou manchas amarelas, marrons ou pretas, ou combinações entre elas, em posições características ou com manchas claras ou hialinas em um campo mais escuro (CHRISTENSON; FOOTE, 1960).

As moscas-das-frutas apresentam uma grande diversidade de espécies distribuídas nas regiões temperadas, subtropicais e tropicais do mundo (CHRISTENSON; FOOTE, 1960). Já foram descritas mais de 4 mil espécies e subespécies de tefritídeos (NORRBOM, 2004), porém, aproximadamente 250 espécies foram relatadas infestando frutas e vegetais produzidos comercialmente (WHITE; ELSON-HARRIS, 1992).

No Brasil, as espécies de importância econômica e quarentenária pertencem aos gêneros *Anastrepha* Schiner e *Ceratitis* MacLeay, sendo *C. capitata*, a única espécie desse gênero existente no país (ZUCCHI; MORAES, 2012). As espécies de *Anastrepha* são amplamente distribuídas no Brasil e engloba a maior diversidade de espécies de moscas-das-frutas. Devido a intensificação dos estudos realizados a partir de 1970, já foram catalogadas aproximadamente 120 espécies de *Anastrepha*, porém apenas sete espécies possui importância econômica para o Brasil (ZUCCHI; MORAES, 2008).

4.2.1 *Ceratitis capitata*

A mosca-do-mediterrâneo é considerada uma das pragas de maior importância econômica do mundo. Originária da África Subsaariana, esta praga possui ampla distribuição pelo mundo devido à sua capacidade de adaptar-se a diferentes condições climáticas, estando presente, atualmente, em 43 países e 500 localidades únicas. Apesar de tolerar uma ampla gama de climas, as áreas mais adequadas para o estabelecimento de *C. capitata* estão localizadas na América do Sul, leste e sul da África e leste da Ásia (THOMAS et al., 2001; SZYNISZEWSKA; TATEM, 2014).

No Brasil, a mosca-do-mediterrâneo foi detectada pela primeira vez em 1901 na cidade de São Paulo – SP, e desde então se espalhou por todo território brasileiro. Chegou na região Nordeste em 1993, na região Norte em 1998 e na Região Centro-Oeste em 2004. Das 26 unidades federativas do Brasil, apenas os Estados do Amapá, Amazonas e Sergipe ainda não tiveram registros de *C. capitata* (ZUCCHI; MORAES, 2012).

Ceratitis capitata pode ocorrer durante todo o ano nos pomares comerciais, pois se trata de uma espécie multivoltina, tendo várias gerações durante o ano. Além disso, esta espécie é altamente polífaga, sendo capaz de desenvolver-se em uma grande variedade de frutos, permitindo assim, uma sucessão hospedeira (MONTES et al., 2011), onde já foi registrada infestando mais de 300 espécies de frutos hospedeiros distribuídas em 69 famílias botânicas (NAVA; BOTTON, 2010; SZYNISZEWSKA; TATEM, 2014).

O ciclo de vida de *C. capitata* é influenciado diretamente por diversos fatores bióticos e abióticos, sendo a disponibilidade de hospedeiros e estágios de maturação dos frutos os principais fatores que influenciam na incidência de moscas-das-frutas. Os frutos são selecionados para a oviposição de acordo com o conteúdo de carboidratos e proteínas dos frutos, pois fornece o melhor desenvolvimento das larvas (MONTES et al., 2011; LEITE et al., 2019).

Em condições favoráveis, uma fêmea de *C. capitata* deposita de 1 a 10 ovos sob a casca dos frutos hospedeiros, em cada local de oviposição. As larvas eclodem e passam por três instares, com duração larval de 6 a 10 dias. No final do terceiro instar, as larvas abrem um orifício de saída dos frutos e pupam no solo. A duração da fase de pupa é de 6 a 13 dias (SHAURUB et al., 2015).

O adulto é uma mosca que mede de 4 a 5 mm de comprimento por 10 a 12 mm de envergadura, sendo capaz de voar por curtas distâncias, mas os ventos permitem que elas se locomovam por maiores distâncias. Os adultos machos atingem sua maturidade sexual quatro

dias após a emergência, enquanto que as fêmeas estão prontas pra acasalar somente de seis a oito dias após a emergência (THOMAS et al., 2001).

4.2.2 Danos

As moscas-das-frutas são insetos-pragas que causam enormes prejuízos a uma ampla variedade de culturas, acarretando perdas na produção (ARAUJO; ZUCCHI, 2003). Os danos diretos iniciam-se no momento em que a fêmea perfura a casca dos hospedeiros e insere o seu ovipositor, reduzindo a qualidade e o valor comercial dos frutos (BADII et al., 2015). Essas cicatrizes também permitem a penetração de bactérias, iniciando o processo de podridão do fruto (ZUCCHI et al., 2004).

Após a eclosão, as larvas imediatamente começam a se alimentar, sendo o consumo da polpa proporcional ao desenvolvimento das larvas, onde as larvas de terceiro ínstar são as que ocasionam as maiores reduções no rendimento (BADII et al., 2015). As galerias formadas pela alimentação das larvas também possibilitam a penetração de microrganismos, tornando o fruto inaproveitável (ZUCCHI et al., 2004).

Além das perdas diretas, o custo do controle de moscas-das-frutas e as perdas do mercado exterior, acarretam um prejuízo de U\$ 242 milhões anuais (OLIVEIRA et al., 2012). Vale ressaltar que os danos variam de acordo com as espécies hospedeiras e as diferentes espécies de mosca-das-frutas (PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019).

4.3 Métodos de controle de moscas-das-frutas

Atualmente, novas técnicas de controle de *C. capitata* estão sendo estudadas, com foco no controle biológico, seguido de tratamentos químicos, controle comportamental com a utilização da técnica do inseto estéril e medidas quarentenárias (DIAS et al., 2018; SCJARRETTA et al., 2018). Apesar dos avanços nos estudos, o método mais tradicional é a aplicação de inseticidas (DOLINSKI; LACEY, 2007).

O controle químico das moscas-das-frutas geralmente é realizado com o uso de iscas tóxicas ou pulverização em cobertura total (RAGA; SATO, 2016; CAMARGOS; COSTA; MIRANDA, 2017). Inicialmente, eram utilizados produtos organoclorados, organofosfatos e carbamatos, seguidos pela introdução de piretróides, espinosade e outros compostos (VONTAS et al., 2011).

A maioria das moléculas registradas para o controle de *C. capitata* tem como alvo apenas adultos por ação de contato e/ou ingestão, pois as larvas estão protegidas de inseticidas

não sistêmicos no interior do fruto e as pupas por uma camada de solo. Os produtos sistêmicos são evitados, a fim de diminuir os riscos dos frutos tratados apresentarem níveis de inseticidas acima do limite máximo de resíduo durante as etapas de comercialização e consumo (RAGA; SATO, 2016).

Para uma controle eficiente, é necessário fazer estudos de definição e delimitação da distribuição espacial e temporal das populações de moscas adultas, através de monitoramento da dinâmica populacional no pomar e nas áreas adjacentes (SCIARRETTA et al., 2018). A redução populacional de moscas-das-frutas é limitada devido às suas características intrínsecas, como alta fecundidade, elevada fertilidade, polifagia, migração e a existência de outros nichos para abrigo e alimentação (RAGA; SATO, 2016). Além disso, as aplicações em cobertura limitam-se a matar apenas os adultos que estão no interior dos pomares, fazendo com que os adultos imigrantes ou presentes nas áreas adjacentes consigam realizar as atividades de alimentação, cópula e postura normalmente (RAGA; SATO, 2016; SCIARRETTA et al., 2018).

Para minimizar as pulverizações, os inseticidas são frequentemente aplicados seletivamente, por meio de iscas tóxicas compostas de uma substância atraente e um inseticida, aplicados na copa das árvores ou em dispositivos específicos (SCIARRETTA et al., 2018). A eficiência dessa técnica depende essencialmente da disponibilidade comercial de proteínas atrativas de qualidade e fagoestimulantes, e que o inseticida utilizado não seja repelente aos adultos (RAGA; SATO, 2016).

O uso excessivo e incorreto do controle químico pode ocasionar efeitos adversos no ecossistema agrícola e na saúde humana, como surtos de pragas secundárias, populações resistentes, contaminação ambiental, diminuição da biodiversidade e risco de segurança ao ser humano devido aos resíduos no produto final (DOLINSKI; LACEY, 2007; SHAURUB et al., 2015). Além disso, os inseticidas são caros, aumentando os custos de produção e em alguns casos, os agricultores não têm acesso por falta de recursos (MURIITHI et al., 2016).

Desta forma, o uso continuado de inseticidas está cada vez mais limitado, sendo necessária, a utilização de outras estratégias de controle no manejo de moscas-das-frutas (DIAS et al., 2018). Nesse contexto, o uso do controle biológico faz parte das modernas técnicas de controle de pragas dentro do MIP, sendo uma opção viável para atender aos anseios da sociedade na busca constante por soluções sustentáveis.

4.3.1 Controle Biológico

O controle biológico é um fenômeno natural que consiste na regulação da população insetos-pragas por inimigos naturais, como parasitoides, predadores e entomopatógenos, os quais constituem os agentes de mortalidade biótica (ABREU; ROVIDA; CONTE, 2015). As práticas de controle biológico são vantajosas, pois os inimigos naturais são capazes de localizar as pragas-alvo e promover a regulação de sua população nas fases larval e pupal (BADII et al., 2015).

Baseando nos aspectos agrícolas, existe três tipos de controle biológico: o Controle Biológico Natural, que refere-se à população de inimigos que ocorrem naturalmente, sendo responsáveis pela manutenção do nível de equilíbrio da praga no agroecossistema; o Controle Biológico Clássico, quando organismos benéficos são importados e colonizados visando o controle de pragas exóticas; e, o Controle Biológico Aplicado, onde é feita uma liberação massal do agente benéfico visando o controle imediato da praga (PARRA et al., 2002).

Os agentes de biocontrole podem ser liberados de forma inoculativa, construindo uma população que deve agir por gerações, ou inundativa, onde se espera que os organismos liberados gerem reduções imediatas (BAKER; GREEN; LOKER, 2020).

Vários países produzem e liberam parasitoides em larga escala, buscando controlar e reduzir as populações a níveis economicamente aceitáveis (OVRUSKI et al., 2000; CARVALHO, 2005; GARCIA; RICALDE, 2013). No entanto, para estabelecer um programa bem-sucedido, os parasitoides exóticos devem ser capazes de sobreviver no novo ambiente e reduzir a população da praga, além disso, os parasitoides devem se adaptar a novos hospedeiros (HARBI et al., 2018). Desta forma, é necessário reforçar o agroecossistema por meio da diversificação de plantas e preservação de espécies nativas para propiciar a maior diversidade e densidade populacional dos inimigos naturais (CARVALHO, 2006).

Programas de controle biológico de moscas-das-fruta são realizados em diversos países, como Guatemala, México, Estados Unidos, Peru e Costa Rica (OVRUSKI et al., 2000; CARVALHO, 2005; GARCIA; RICALDE, 2013). No caso do Brasil, o desenvolvimento de programas de controle biológico aplicados, incluindo produção em massa e liberação de parasitoides, pode ser bem-sucedido, com base nas atividades clássicas de controle biológico já realizadas e nas informações disponíveis sobre parasitoides (PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019).

4.3.1.1 Parasitoides

A história do controle biológico clássico de moscas-das-frutas no Brasil inclui liberações inundativas de parasitoides produzidos em criação massal (CARVALHO, 2006; GARCIA; RICALDE, 2013; CAMARGOS; COSTA; MIRANDA, 2017).

Os parasitoides são considerados por muitos pesquisadores como os mais importantes inimigos naturais das moscas-das-frutas, em diversas partes do mundo, pois são bastantes específicos para certas espécies/gêneros, além de ser capazes de localizar e parasitar as larvas das moscas-das-frutas no interior dos frutos (OVRUSKI et al., 2006; MOHAMED; RAMADAN; EKESI, 2016).

Ao encontrar o hospedeiro, a fêmea deposita seus ovos e a larva se alimenta do corpo desse hospedeiro, matando-o após determinado tempo. Deste modo, apenas os estágios imaturos são parasitas típicos, enquanto que os adultos possuem vida livre e se alimentam de néctar e pólen, sendo denominado parasitas protelianos (VINSON, 1976).

Os parasitoides possuem tamanho inferior ao seu hospedeiro e exigem apenas um indivíduo para completar o seu desenvolvimento (OLIVEIRA et al., 2006). Eles são classificados de acordo com o local de deposição dos ovos, sendo endo ou ectoparasitoides; do número de indivíduos que se desenvolvem a partir de um único hospedeiro, onde podem ser solitários ou gregários; e, quanto ao modo de ataque do hospedeiro, podendo ser idiobiontes, cessando o desenvolvimento do hospedeiro após ser parasitado, ou cenobiontes, que permitem o desenvolvimento do hospedeiro até a próxima fase (PARRA et al., 2002).

Os himenópteros são o grupo mais relevante de inimigos naturais, pois são capazes de parasitar ovos, larvas e pupas de tefritídeos (OVRUSKI et al., 2006; MOHAMED; RAMADAN; EKESI, 2016). Estima-se que há mais de 100 espécies pertencentes à família Braconidae, onde a grande maioria dos registros pertence à subfamília Opiinae (OVRUSKI et al., 2000; BADI et al., 2015; WHARTON; YODER, 2020). No Brasil, foram relatados parasitoides das famílias Braconidae, Figitidae, Pteromalidae e Diapriidae associados a moscas-das-frutas, tendo cerca de 25 espécies já registradas no país, mas é provável que esse número seja ainda maior, uma vez que muitas espécies ainda não foram descritas (PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019).

O interesse na utilização de parasitoides para o controle de moscas-das-frutas iniciou-se em 1900, quando foram feitos esforços iniciais para localizar inimigos naturais no oeste da Austrália e intensificado no Havaí (EUA) após a introdução de *C. capitata* e *Bactrocera dorsalis* (Hendel, 1972) (Diptera: Tephritidae) (WHARTON; YODER, 2020). Na

ocasião, foram enviados para a região, cerca de oitenta espécies de parasitoides, com destaque para a espécie *D. longicaudata*, um endoparasitoide cenobionte de várias espécies de tefritídeos, inclusive de *C. capitata* (CARVALHO; NASCIMENTO, 2002; MEIRELLES; REDAELLI; OURIQUE, 2015).

4.3.1.1.1 *Diachasmimorpha longicaudata*

O parasitoide *D. longicaudata* foi introduzido no Brasil, em 1994, pelo Estado da Bahia e foi distribuído para diversos estados brasileiros, com o objetivo de avaliar o seu potencial em diferentes ecossistemas a fim de ser utilizado no controle biológico de moscas-das-frutas *C. capitata* e do gênero *Anastrepha* (CARVALHO; NASCIMENTO; MATRANGOLO, 2000; CARVALHO, 2006).

Esta é a espécie de parasitoide de moscas-das-frutas mais estudada em todo o mundo, devido à sua boa adaptação ao ambiente e ao laboratório, procedimentos fáceis de criação em condições artificiais, comportamento intenso de forrageamento em frutos caídos na natureza, alta capacidade das fêmeas de explorar os recursos disponíveis e por ser uma espécie generalista, atacando um grande número de tefritídeos (GARCIA; RICALDE, 2013; PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019).

Diachasmimorpha longicaudata possui antenas longas, asas claras, olhos castanhos e o corpo marrom-avermelhado, com o comprimento dos machos de 2,8 a 4,0 mm e o das fêmeas de 3,6 a 5,4 mm, sem incluir o ovipositor. O ovipositor tem ponta preta e é mais longo que o corpo inteiro da fêmea (THOMPSON, 2001).

Esses parasitoides são atraídos pelos voláteis liberados pelas frutas e pelas vibrações produzidas quando as larvas se alimentam ou se movimentam (GARCIA; RICALDE, 2013). As fêmeas desse parasitoide são capazes de localizar seus hospedeiros, mesmo quando são encontrados em baixas densidades, independente se os frutos estão na copa das árvores ou caídos no chão (HARBI et al., 2018).

Geralmente os parasitoides possuem um ínstar preferencial ou único, pois procuram se especializar em relação às espécies que usam como hospedeiros e podem ser especializados em certos estágios do mesmo. Porém, estudos demonstram a plasticidade de *D. longicaudata* no momento da seleção do hospedeiro, tanto em relação à espécie quanto ao ínstar do hospedeiro, apresentando taxas de parasitismo semelhantes nos três ínstares larval de *C. capitata* (ROHR; JAHNKE; REDAELLI, 2019).

A seleção do hospedeiro interfere diretamente na razão sexual e no ciclo de vida dos parasitoides. Quando diferentes ínstaes da mesma espécie hospedeira foram oferecidos concomitantemente, o maior parasitismo ocorreu no segundo e no terceiro ínstar, emergindo um número maior de fêmeas. Além disso, as larvas quando são parasitadas no terceiro ínstar, apresentam uma viabilidade pupal maior, emergindo um maior número de parasitoides (ROHR; JAHNKE; REDAELLI, 2019).

Os parasitoides apresentam tamanhos diferentes de acordo com o hospedeiro em que se desenvolveram, influenciando a eficiência de busca do hospedeiro e a proporção entre os sexos, mesmo que as diferenças no tamanho ou na qualidade do hospedeiro possam não necessariamente influenciar nos parâmetros reprodutivos (MEIRELLES; REDAELLI; OURIQUE, 2013).

O uso de *D. longicaudata* em programas de controle biológico pode atingir níveis de parasitismo de até 50% em condições de campo, quando comparado com outros parasitoides de moscas-da-frutas (HARBI et al., 2016), porém esses índices podem estar subestimado, uma vez que a remoção dos frutos do campo durante a amostragem reduz o período em que as larvas estão disponíveis ao parasitoide (GARCIA; RICALDE, 2013). Além disso, a taxa de parasitismo varia significativamente de acordo com as espécies hospedeiras da mosca da fruta (PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019).

A eficácia desse parasitoide pode ser aumentada quando for utilizado em conjunto com outras táticas de controle, desde que sejam feitos estudos a respeito das interações entre as diferentes táticas (GARCIA; RICALDE, 2013). Por essa razão, o controle microbiano representa uma estratégia complementar para o controle de moscas-das-frutas (GONZALEZ et al., 2016). Já há relatos de que os parasitoides podem interagir sinergicamente com entomopatógenos (DOLINSKI; LACEY, 2007).

4.3.2 Controle Microbiano

Além dos entomofágos (parasitoides e predadores), outros agentes de controle biológico já foram utilizados contra os tefritídeos como nematóides, bactérias, protozoários e fungos (BADII et al., 2015). A utilização de agentes de controle microbiano de forma inundativa é a estratégia mais utilizada para empregar entomopatógenos no controle de pragas (LACEY et al., 2015).

A especificidade e seletividade dos entomopatógenos minimiza os impactos sobre organismos não-alvo, podendo ser utilizado de forma conjunta e simultânea, ou simplesmente intercalada com as demais técnicas de controle (ALVES, 1998; ROSSI-ZALAF et al., 2008).

Estudos com fungos entomopatogênicos comprovam a sua patogenicidade em moscas-das-frutas indicando sua utilização de diferentes modos de aplicação, como pulverização de cobertura ou iscas (DIAS et al., 2018). Os principais fungos entomopatogênicos utilizados são *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Vuill.) (BISSOLLI; BARCELOS; BARBOSA, 2014). Além dos fungos, os NEP também se mostram bastantes promissores para o controle da moscas-das-frutas.

4.3.2.1 Nematoides entomopatogênicos

A descoberta e a descrição de espécies de NEP possibilitou a utilização de mais uma alternativa biológica para o MIP, pois eles possuem habilidade de associarem-se a diferentes espécies de insetos consideradas importantes pragas agrícolas e causar-lhes a morte, constituindo, assim, agentes de biocontrole de grande potencial, principalmente daqueles que apresentam pelo menos uma fase do ciclo de vida no solo (FUGA; FERNANDES; LOPES, 2012; JAMES; MALAN; ADDISON, 2018)

Os nematoides *Heterorhabditis* spp. e *Steinernema* spp. já foram utilizados no controle de várias espécies de moscas-das-frutas (DIAS et al., 2018; JAMES; MALAN; ADDISON, 2018), pois ao final do terceiro instar, as larvas desses insetos deixam os frutos e penetram no solo ou na serapilheira para o desenvolvimento da pupa, tornando-se um alvo para esses agentes (SHAURUB et al., 2015; CHERGUI et al., 2019; PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019).

O terceiro estágio do ciclo de vida dos NEP, conhecida como Juvenil Infectante (JI) apresenta vida livre e é facilmente encontrada no solo (ALMENARA et al., 2011; LACEY et al., 2015). Ao encontrar um hospedeiro, os JI penetram em seu interior através da boca, ânus, espiráculos e, em alguns casos, pela própria cutícula mole de alguns insetos (DOLINSKI; LACEY, 2007).

Esses nematoides matam seus hospedeiros através da simbiose mutualística com as bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* (em espécies da família Steinernematidae e Heterorhabditidae, respectivamente) alojadas em seu tubo digestivo, e liberadas na hemocele do inseto, onde se proliferam e melhoram as condições para o desenvolvimento e reprodução dos nematoides, fornecendo os nutrientes necessários e

impedindo o crescimento de outras bactérias (AKHURST, 1982; DOLINSKI; LACEY, 2007; LACEY et al., 2015). Quando os recursos se esgotam, os novos juvenis sequestram as células bacterianas em seus intestinos, saem do cadáver e buscam novos hospedeiros para iniciar um novo ciclo (DOLINSKI; LACEY, 2007; LABAUDE; GRIFFIN, 2018).

Durante a busca pelo hospedeiro, os nematoides respondem a voláteis ou sinais dissolvidos na água que são liberados pelas plantas ou pelo próprio inseto, como fezes, níveis de CO₂, gradiente de temperaturas e outros subprodutos do metabolismo do inseto (FUGA; FERNANDES; LOPES, 2012). Além disso, há vários fatores que influenciam a dispersão e a virulência de JI, como temperatura, umidade, tipos de vegetação, propriedades do solo, entre outras (LABAUDE; GRIFFIN, 2018).

Embora muitas espécies de nematoides já tenham comprovado sua eficiência contra várias espécies de inseto-pragas, poucas são produzidas comercialmente (LACEY et al., 2015). O armazenamento e a sobrevivência dos NEP são os principais obstáculos para a formulação de um produto comercial (FUGA; FERNANDES; LOPES, 2012). Mesmo com essa limitação, a utilização dos NEP traz diversos benefícios, como redução de impactos a organismos não-alvo, potencial ferramenta para o manejo da resistência, segurança para os aplicadores, e a inexistência de intervalo de reentrada para colheita (FUGA; FERNANDES; LOPES, 2012). No entanto, a aplicação de nematoides de forma inundativa ao solo, pode afetar outras espécies não-alvo, necessitando estudos para verificar essas interações (LABAUDE; GRIFFIN, 2018).

4.4 Interação nematoides e parasitoides

Para um controle mais efetivo de moscas-das-frutas no Brasil é necessário a implantação de um manejo integrado, pois é quase impossível controlar a população dessa praga com apenas um método, principalmente quando há mais de uma espécie de tefritídeo causando perdas econômicas (PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019). Geralmente, os componentes do MIP são utilizados como táticas isoladas, sem considerar suas interações com os componentes do agroecossistema (DOLINSKI; LACEY, 2007).

Os métodos de controle devem ser planejados de acordo com as espécies de tefritídeo, hospedeiro vegetal, região do Brasil onde serão aplicados, observando as condições ambientais e das ferramentas disponíveis, incluindo práticas culturais para manter os pomares limpos de frutas maduras, aplicações de inseticidas seletivos aos inimigos naturais, controle

biológico, entre outros que estiverem ao alcance dos produtores (PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019).

Na fruticultura, o controle biológico em seu sentido clássico tem seu uso limitado, pois o nível de dano econômico permitido é muito baixo, o que exige que a infestação nos frutos seja próxima de zero. Assim, a utilização desta estratégia de forma isolada não resolverá os problemas ocasionados pelas moscas-das-frutas (CARVALHO, 2006). Sempre que possível, deve-se utilizar pelo menos um agente biológico para cada estágio do ciclo de vida da mosca-das-frutas, a fim de evitar a emergência dos adultos (PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019).

O controle microbiano de pragas frugívoras em conjunto com outros componentes do MIP, pode proporcionar um controle efetivo (DOLINSKI; LACEY, 2007). Devido ao aumento da utilização de entomopatógenos no MIP, torna-se indispensável a avaliação dos prováveis efeitos desses agentes sobre os inimigos naturais, representados por parasitoides e predadores, no sucesso global desses organismos no controle biológico (MAGALHÃES; MINNERAT; ALVES, 1998; LABBÉ et al., 2009).

Estudos relacionados a casos de interação do controle microbiano com outros métodos de controle de pragas ainda são pouco conhecidos. Entretanto, nos últimos anos a comunidade científica tem se preocupado em avaliar e divulgar o controle associado, principalmente devido às suas múltiplas vantagens a longo prazo, pois há possibilidade dos agentes explorarem diferentes estágios de desenvolvimento das pragas, onde um pode atuar quando as pragas escapam da ação do outro (POTRICH et al., 2009a; LACEY et al., 2015; SIMIL et al., 2018). Desta forma, a associação entre os agentes biológicos pode aumentar a eficácia do controle das pragas, uma vez que a mortalidade do inseto tende a ser maior do que a obtida pelo uso de cada agente aplicado isoladamente (POTRICH et al., 2009b; LACEY et al., 2015; SIMIL et al., 2018).

Em alguns países da América Latina, já está sendo feita a associação de microrganismos com predadores e parasitoides em diversas culturas agrícolas, porém em poucos casos, os efeitos dessa associação têm sido avaliados (ROSSI-ZALAF et al., 2008).

As interações entre entomopatógenos e parasitoides podem ser sinérgicas ou aditivas, quando ocorre a transmissão do entomopatógeno pelos parasitoides; e antagonista, quando ocorre o aumento da susceptibilidade a infecções (MAGALHÃES; MINNERAT; ALVES, 1998; DOLINSKI; LACEY, 2007; ROSSI-ZALAF et al., 2008). Essas interações ocorrem durante o desenvolvimento larval do parasitoide, interna ou externamente ao hospedeiro, ou

quando um hospedeiro já parasitado é infectado pelo patógeno (MAGALHÃES; MINNERAT; ALVES, 1998).

De forma geral, esses nematoides parecem não afetar insetos não-alvo (MAGALHÃES; MINNERAT; ALVES, 1998). Mbata e Shapiro-Ilan (2010) investigando o potencial para integrar a aplicação do nematoide *H. indica* com a liberação de *Habrobracon hebetor* (Say, 1857) (Hymenoptera: Braconidae) no controle de *Plodia interpunctella* (Hübner, 1813) (Lepidoptera: Pyralidae), em condições de laboratório, observaram que a combinação desses agentes de controle biológico pode ser aditiva ou sinérgica, aumentando a mortalidade da praga. A liberação de parasitoides ou a aplicação de nematoides isoladamente gerou entre 62,25 e 71,25% de mortalidade das larvas de *P. interpunctella*, respectivamente, enquanto a combinação das duas resultou em mortalidade de 98-99,25%.

No entanto, há relatos demonstrando efeitos negativos entre a associação de nematoides e inimigos naturais (LORDAN et al., 2014). Mráček e Spitzer (1983) constaram invasão de NEP em larvas de *Thereva handlirschi* Kromer, 1912 (Diptera: Therevidae) e *Rhagio* spp. (Diptera: Rhagionidae). Porém, essa invasão deve ser considerada acidental, produzida em parte pelo estresse ao qual as larvas foram expostas durante o experimento, uma vez que o nematoide *S. kraussei* não é um parasita normal dos predadores e parasitoides de *Cephalcia abietis* (L., 1758) (Hymenoptera: Pamphiliidae). É possível também que ocorra efeitos inesperados entre os diferentes agentes de biocontrole através de alterações no comportamento das pragas e nos inimigos naturais ou através de alterações na densidade ou diversidade de pragas (GONZALEZ et al., 2016).

Desta forma, é necessária uma compreensão das interações entre os inimigos naturais, de modo que a aplicação de NEP deve sempre complementar ou apoiar as comunidades dos parasitoides de moscas-das-frutas, oferecendo novas oportunidades para otimizar e desenvolver ainda mais o controle biológico de moscas-das-frutas.

5 METODOLOGIA

Local dos experimentos

Todas as criações e experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras – UFLA, em condições controladas de temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

Criação de *Ceratitis capitata*

Para o início da criação, foram utilizadas pupas de *C. capitata* linhagem mutante (Sensibilidade a Letal Temperatura – *Tsl* Vienna 8) provenientes do Laboratório de Controle Biológico e Bioatividade de Produtos Vegetais da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), Campus de Janaúba, MG. Os pupários permaneceram nas placas até a emergência dos adultos, e posteriormente foram liberados em gaiolas de acrílico (60x31x30 cm) com uma face revestida apenas com tecido *voil*, nas quais as moscas realizam a postura. Na face superior foi colocada uma tela em forma de manga para manipulação.

No interior da gaiola foram colocadas duas garrafas plásticas de 250 mL contendo água, com fita absorvente (Spontex®) que serviram de bebedouro para as moscas adultas e três placas de Petri (9x1,5cm): duas com alimento (mistura de levedura de cerveja e açúcar cristal na proporção de 1:4) e uma com esponja contendo solução de mel a 30%, como fonte de proteína. A manutenção da criação foi realizada diariamente.

Fora da gaiola, na parte frontal, logo abaixo do tecido *voil*, foram colocadas bandejas de isopor (20x5x3,5 cm), mantidas com água para retenção dos ovos. A coleta de ovos foi realizada a cada 24 horas, passando o pincel sobre o *voil*, fazendo com que os ovos caíssem na bandeja. O conteúdo das bandejas foi colocado em Becker, onde os ovos decantavam, e com o auxílio de uma seringa, foi recolhido 0,5 mL de suspensão de ovos.

Os ovos coletados foram colocados em recipientes (250 mL) contendo 250 gramas de dieta artificial. O recipiente foi fechado com papel alumínio devido ao fototropismo negativo das larvas, evitando também a dessecação de ovos. O recipiente foi colocado dentro de outro recipiente plástico (1000 mL), onde a tampa tinha uma abertura superior fechada por tecido do tipo *voil* que permite a ventilação do interior e vedado com papel filme.

A dieta artificial utilizada foi adaptada de Albajes e Santiago-Álvarez (1980) (Tabela 1).

Tabela 1: Composição da dieta artificial fornecida para larvas de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae).

Componentes	Quantidades
Açúcar	308g
Água	1.700ml
Benzoato de sódio	11g
Farelo de trigo	1.100g
Levedura de cerveja	159,7g
Metilparaben (nipagin)	12,32g
Propilparabeno sódico	12,32

Fonte: Albajes e Santiago-Álvarez (1980).

As larvas quando eclodem, começam a se desenvolver na dieta artificial, alcançando seu máximo desenvolvimento no terceiro ínstar (L3), quando saltam da dieta para o fundo do recipiente de 1000 mL, ocorrendo a formação das pupas, sendo recolhidas e colocadas em uma nova gaiola de criação, iniciando assim, um novo ciclo. Semanalmente, foi montada uma nova gaiola.

Criação do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata*

A criação de *D. longicaudata* foi estabelecida com pupas de *C. capitata* parasitadas provenientes do Laboratório de Entomologia Aplicada, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), em Mossoró-RN.

Os adultos dos parasitoides foram mantidos em gaiolas de madeira (30x30x30 cm), forradas com papel Sulfite Branco. As faces laterais e a frente foram revestidas com tecido *voil*. Na face superior foi feito um revestimento duplo com tecido *voil*, fechando com velcro no entorno, onde foram colocadas as larvas para o parasitismo. Na outra lateral, foi adaptada uma manga para manipulação.

No interior da gaiola, foi colocada uma placa de Petri (5x1,5 cm) com açúcar cristal e uma garrafa plástica de 250 mL contendo água, com fita absorvente (Spontex®) que serviu de bebedouro para os parasitoides, e na face frontal da gaiola foi pincelado mel, que também serviu como fonte de alimento.

Larvas de terceiro ínstar (L3), provenientes da criação de *C. capitata*, foram oferecidas aos parasitoides, na parte superior da gaiola de criação por 24 horas, sendo estas recolhidas no dia seguinte e colocadas em recipientes plásticos (500 mL), rotuladas com a data do recolhimento e guardadas até a emergência dos adultos.

Obtenção dos Nematoides Entomopatogênicos

Para a realização dos bioensaios, foram utilizados isolados nativos e exóticos de NEP pertencentes ao gênero *Steinernema* e *Heterorhabditis* armazenados no Banco de Patógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da Universidade Federal de Lavras – UFLA (Tabela 2).

Tabela 2: Isolados de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae e Steinernematidae) utilizados nos bioensaios.

Isolado	Local de origem
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> RSC05	Benjamin Constant/AM/Brasil
<i>Heterorhabditis</i> sp. Alho	Lavras/MG/Brasil
<i>Heterorhabditis</i> sp. JPM3	Lavras/MG/Brasil
<i>Heterorhabditis</i> sp. JPM4	Lavras/MG/Brasil
<i>Heterorhabditis</i> sp. Ijaci	Ijaci/MG/Brasil
<i>Heterorhabditis</i> sp. NEPET 11	Palmeiras das Missões/RS/Brasil
<i>Heterorhabditis</i> sp. RSC03	Benjamin Constant/AM/Brasil
<i>Steinernema carpocapsae</i> All	Carolina do Norte/EUA

A multiplicação dos nematoides foi realizada através do método *in vivo*, adaptado de Woodring; Kaya (1988), utilizando-se lagartas de sexto ínstar de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), provenientes da criação estabelecida no mesmo laboratório.

Criação de *Galleria mellonella*

Os adultos foram mantidos em frascos de vidro (1300 mL) e tampa plástica de rosca, contendo, em seu interior, folhas de jornal dobradas em forma de sanfona para postura. Posteriormente, os adultos foram descartados e o papel contendo os ovos foi retirado e transferido para potes plásticos (40x27x13 cm) com tecido *voil* e fechado com tampa sem furos. Esses potes foram forrados com papel jornal e fornecido dieta artificial adaptada de Dolinski (2005) (Tabela 3).

Tabela 3: Composição da dieta artificial fornecida para lagartas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae).

Componentes	Quantidades
Farelo de trigo	200 g
Farinha de trigo	200 g
Gérmen de trigo	200 g
Glicerina	130 g
Leite em pó desnatado	400 g
Levedura de cerveja	120 g
Mel	240 g

Fonte: Dolinski (2005).

As lagartas quando atingiram o terceiro ínstar, foram transferidas para outro pote plástico com tampa contendo pequenos furos, forrado com papel jornal. A dieta foi acrescentada conforme a necessidade até completarem seu desenvolvimento ou até serem utilizadas para multiplicação dos NEP. Adultos emergidos foram recolhidos e transferidos com ajuda de tubo de vidro, para potes de vidro cilíndricos com tampa, para a manutenção da criação. A manutenção foi realizada em dias alternados, fazendo-se a limpeza dos recipientes.

Multiplicação e manutenção de nematoides entomopatogênicos

Em uma placa de Petri (9x1,5 cm) contendo dois papeis filtro (90 mm) foram transferidas 10 lagartas de *G. mellonella*, padronizadas no sexto ínstar, e aplicados 2 mL de suspensão aquosa com aproximadamente 200 JI/lagarta. Estas placas foram mantidas em câmara climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$, 12 horas de fotofase) e, após 48 horas, as lagartas mortas foram transferidas para placas de Petri (9x1,5 cm) forrada com papel filtro (90 mm) sem a presença dos NEP, na qual permaneceram nas mesmas condições citadas anteriormente, para desenvolvimento do nematoide.

Após sete dias, as lagartas foram transferidas para armadilha de White modificada, a qual consiste de uma placa de Petri de plástico (9x1 cm) contendo um pedaço de material acrílico fixado no centro da placa. Essa placa foi forrada com uma folha de papel filtro (90 mm) e 3 mL de água destilada, onde se colocava as lagartas mortas com sintomas de infecção por NEP. Os JI deixavam o cadáver do hospedeiro e migravam para a água destilada ao fundo da armadilha.

O recolhimento dos NEP foi feito utilizando-se uma proveta de 1000 mL, sobre a qual foi vertido o conteúdo da armadilha de White, e o volume da proveta foi completado com água destilada. Esta suspensão foi mantida na proveta durante 24 horas para decantação e lavagem dos nematoides. Após este período o sobrenadante foi descartado e a suspensão de NEP foi transferida para frascos para cultura de tecido com capacidade de 250mL, adicionando-se água destilada até completar o volume. Os frascos foram mantidos em câmara climatizada ($16 \pm 1^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$, no escuro) por um prazo máximo de uma semana, até a montagem dos bioensaios.

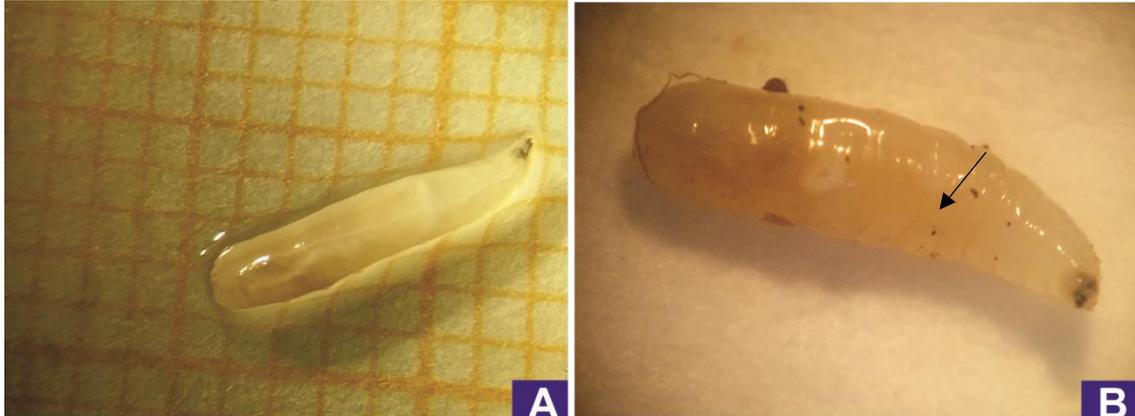
Bioensaio 1: Patogenicidade de isolados de nematoides entomopatogênicos sobre larvas de *C. capitata* parasitadas e não parasitadas por *D. longicaudata*

Foi avaliada a patogenicidade de isolados de NEP pertencentes aos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* sobre larvas de *C. capitata*. Para o bioensaio foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições, cada uma constituída por seis placas de Petri (5x1 cm) forradas com três papéis filtro (50 mm), contendo 10 larvas cada.

Como as larvas não parasitadas, foram utilizadas larvas de *C. capitata* de terceiro ínstar provenientes da criação e como larvas parasitadas, foram ofertadas larvas de terceiro ínstar a fêmeas de *D. longicaudata* por 3h. Por meio de um microscópio estereoscópico, verificou-se a presença de pelo menos três cicatrizes de oviposição em cada larva da mosca-das-frutas, que, segundo Montoya et al. (2003) deve resultar em pelo menos um ovo de parasitoide (Figura 1).

Em cada placa de Petri foi adicionado, com o auxílio de uma pipeta, 1mL de suspensão nematoides padronizada na concentração de 100JI/inseto e para a testemunha, foi aplicado 1mL de água destilada.

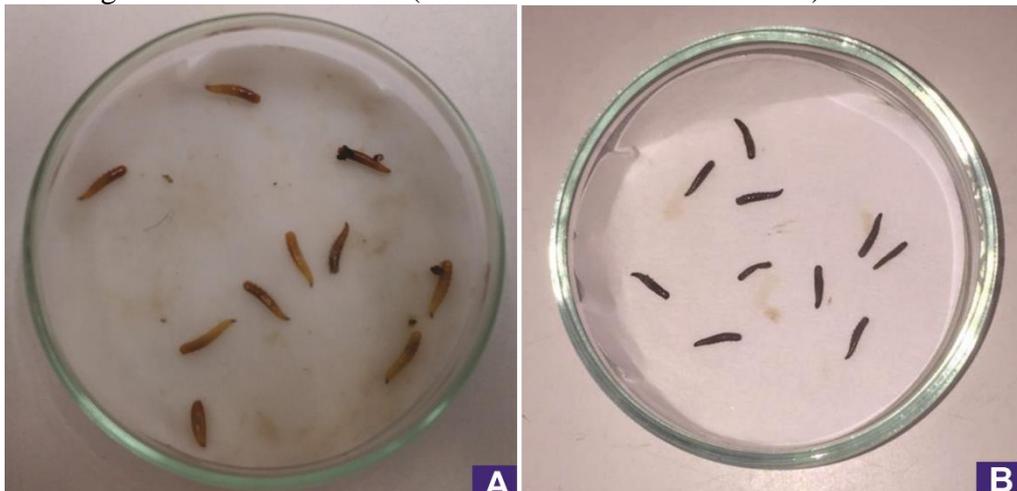
Figura 1: Larvas de terceiro ínstar de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) (A) Larvas não parasitadas; (B) Larvas parasitadas



Seta indica a cicatriz de oviposição de *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). Fotos: SOUZA, M.M. Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Inseto, UFLA, Lavras, MG, Brasil.

A avaliação foi realizada durante cinco dias e a confirmação da mortalidade foi através da observação da sintomatologia e da dissecação dos cadáveres. O sintoma característico de infecção é a mudança de coloração no corpo do hospedeiro ocasionada pela presença das bactérias simbióticas transportadas no intestino dos JI, desempenhando papel importante na morte do hospedeiro (MRÁČEK; SPITZER, 1983) (Figura 2).

Figura 2: Larvas de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) com a sintomatologia de infecção por nematoides entomopatogênicos (A) Sintomas ocasionados por nematoides do gênero *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae); (B) Sintomas ocasionados por nematoides do gênero *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae).



Fotos: SOUZA, M.M. Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Inseto, UFLA, Lavras, MG, Brasil.

Bioensaio 2: Efeito de concentrações de isolados de nematoides entomopatogênicos sobre larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata*

Nesse bioensaio foi utilizado o isolado *Heterorhabditis* spp. Alho, pois o mesmo apresentou a menor virulência para larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata* no bioensaio anterior. O bioensaio foi realizado utilizando-se delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições, cada uma constituída por três placas de Petri, contendo 10 larvas cada.

As larvas parasitadas (sintomatologia descrita no bioensaio 1) foram transferidas para placas de Petri (5x1 cm) forradas com três papéis filtro (50 mm) e aplicada 1mL de diluições seriadas previamente preparadas, padronizadas nas concentrações de 0, 50, 150, 250 e 350 JI/inseto. Para a testemunha, foram utilizadas larvas não parasitadas para todas as concentrações.

As placas foram inspecionadas durante cinco dias e a confirmação da mortalidade foi realizada através da observação da sintomatologia e da dissecação dos cadáveres. Para cada concentração, foi registrado o número de hospedeiros mortos.

Bioensaio 3: Teste de infecção com chance de escolha por larvas de *C. capitata* parasitadas ou não parasitadas por *D. longicaudata*

Nesse bioensaio, foi testada a habilidade dos NEP em distinguir entre larvas de *C. capitata* parasitadas e não parasitada, em uma arena de livre escolha. Esse bioensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e contendo quatro repetições, onde cada réplica consistiu de três placas de Petri.

Dez larvas de *C. capitata* parasitada (sintomatologia descrita no bioensaio 1) e dez larvas não parasitadas foram colocadas em placas de Petri (7x1 cm) revestidas com três papéis filtro (70 mm). Em cada placa foram adicionados, com auxílio de uma pipeta, 2 ml de água destilada contendo JI na concentração de 80 JI/larva, (determinada no bioensaio 2). As placas de Petri foram mantidas por 72 horas em câmara climatizada.

Após esse período, foi registrado o número de larvas de *C. capitata* parasitadas e não parasitadas mortas. As pupas sem sintomas de infecção foram removidas e enxaguadas em água destilada para remover quaisquer JI aderidos à superfície e transferidas para placas de Petri (5x1 cm), revestidas com um papel filtro (50 mm) até a emergência dos adultos.

Bioensaio 4: Tempo de exposição de larvas de *C. capitata* parasitadas e não parasitadas por *D. longicaudata* a nematoides entomopatogênicos

Para definir o tempo que o NEP leva para penetrar no hospedeiro, as larvas de *C. capitata* ficaram expostas a nematoides por 0, 1, 6, 12 e 24h. As placas de Petri (5x1 cm) forradas com três papéis filtro (50 mm) foram preparadas com 1mL de suspensão de nematoide na concentração de 80JI/larva, definida no bioensaio 2.

Após cada período de exposição, os hospedeiros foram lavados com água destilada, transferidos para placas de Petri forradas com papel filtro sem nematoides e mantidos até a emergência dos adultos ou morte do hospedeiro. O número de hospedeiros mortos foi registrado em cada caso. Os indivíduos mortos foram dissecados e examinados quanto à presença de nematoides e ovos de parasitoides.

O bioensaio foi realizado utilizando o mesmo delineamento e procedimento experimental adotados no bioensaio de efeito da concentração do isolado de NEP (Bioensaio 2).

Análise Estatística

Para testar as diferenças entre os isolados de NEP em larvas parasitadas e não parasitadas, foram utilizados Modelos Lineares Generalizados (GLM) com distribuição quasibinomial com função de ligação logit. Foi ajustado um GLM considerando dois fatores: o efeito do tipo de larvas e o efeito dos isolados de NEP e a interação entre eles, fazendo um desdobramento dos tipos de larvas dentro de cada isolado de nematoides.

Para os efeitos da concentração de *Heterorhabditis* sp. Alho também foram utilizados o GLM com distribuição quasibinomial e função de ligação cloglog para larvas não parasitadas e GLM com distribuição binomial e função de ligação probit para larvas parasitadas.

O GLM com distribuição quasibinomial e função de ligação probit também foi utilizado para o teste de infecção com chances de escolha por larvas parasitadas e não parasitadas e no bioensaio do tempo de exposição dos nematoides em larvas de *C. capitata* não parasitadas, enquanto que para as larvas parasitadas, foi utilizado GLM com distribuição quasibinomial e função de ligação logit.

O teste da razão de verossimilhança (log-likelihood ratio) foi utilizado para testar o efeito dos diferentes NEP, seguida por comparações de Tukey ($p < 0,05$). A qualidade do ajuste foi determinada através de um gráfico semi-normal com um envelope de simulação.

Para o cálculo do doses efetivas CL_{50} e CL_{90} do isolado de NEP foi ajustado um modelo log-logístico com dois parâmetros $y = 1/(1+\exp\{b[\ln(x)-\ln(e)]\})$, utilizando o teste “Goodness-of-fit test” para verificar a qualidade do ajuste.

Todas as análises foram feitas utilizando-se o software R 3.6 (R CORE TEAM, 2019), sendo utilizados os seguintes pacotes lme4 (BATES et al., 2015), emmeans (SEARLE; SPEED; MILLIKEN, 1980), drc (RITZ et al., 2015) e hnp (MORAL; HINDE; DEMÉTRIO, 2017).

6 RESULTADOS

Bioensaio 1: Patogenicidade de isolados de nematoides entomopatogênicos sobre larvas de *C. capitata* parasitadas e não parasitadas por *D. longicaudata*

As larvas de *C. capitata* parasitadas e não parasitadas por *D. longicaudata* foram susceptíveis a todos os isolados de NEP estudados, havendo grande variabilidade na taxa de mortalidade das larvas. Os JI de todos os isolados foram capazes de invadir e se propagar em todas as larvas, independente da presença ou não dos ovos do parasitoide (Figura 3). O tratamento controle, onde foi aplicado somente água, não causou mortalidade durante o bioensaio.

Figura 3: Larva de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) parasitada por *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae).



Seta preta indica os nematoides entomopatogênicos e seta branca indica os ovos do parasitoide. Fotos: SOUZA, M.M. Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Inseto, UFLA, Lavras, MG, Brasil.

A mortalidade das larvas não parasitadas variou entre 44 e 97,67%, sendo *S. carpocapsae* o isolado que apresentou a maior virulência, diferindo dos demais isolados e do tratamento controle (GLM, teste da razão de verossimilhança; $X^2=529,47$, Df=8, $p<0,001$). Nas larvas parasitadas, a mortalidade foi superior a 90% para todos os isolados, com exceção de *Heterorhabditis* sp. Alho, que apresentou mortalidade de 79,58% (GLM, teste da razão de verossimilhança; $X^2=778,94$, Df=8, $p<0,001$) (Tabela 4).

O comportamento dos NEP em larvas parasitadas e não parasitadas foi diferente pelo teste de Tukey a 5%. A mortalidade das larvas parasitadas foi superior para todos os isolados. A patogenicidade de *S. carpocapsae* à larvas não parasitadas, foi semelhante à mortalidade das larvas parasitadas ocasionadas por todos os isolados. De uma maneira geral, *Heterorhabditis* sp. JPM4 ocasionou a maior mortalidade em larvas parasitadas (100%).

Tabela 4: Mortalidade confirmada (\pm Erro Padrão) por nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae e Steinernematidae) em larvas de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) parasitadas e não parasitadas por *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae).

Isolados de Nematoides Entomopatogênicos	Mortalidade de larvas não parasitadas (%)*	Mortalidade de larvas parasitadas (%)*
<i>Steinernema carpocapsae</i> A11	97,67 \pm 1,49 Aa	95,81 \pm 7,73 Aa
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> RSC05	77,33 \pm 6,73 Ba	92,96 \pm 10,57 Ab
<i>Heterorhabditis</i> sp. Alho	73,16 \pm 7,15 Ba	79,58 \pm 17,67 Ba
<i>Heterorhabditis</i> sp. RSC03	69,34 \pm 7,40 BCa	95,26 \pm 6,36 Ab
<i>Heterorhabditis</i> sp. JPM4	63,09 \pm 4,33 BCDA	100,00 \pm 0,00 Ab
<i>Heterorhabditis</i> sp. Ijaci	56,32 \pm 14,28 CDEa	96,00 \pm 6,75 Ab
<i>Heterorhabditis</i> sp. NEPET11	51,80 \pm 10,47 DEa	96,52 \pm 7,12 Ab
<i>Heterorhabditis</i> sp. JPM3	43,95 \pm 6,62 Ea	96,33 \pm 8,50 Ab
Água	0,00 \pm 0,00 Fa	0,00 \pm 0,00 Ca

*Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas na mortalidade das larvas de *C. capitata* entre os isolados de NEP estudados (na coluna) e médias seguidas por letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas em diferentes tipos de larvas, parasitadas e não parasitadas por *D. longicaudata* (entre as colunas) pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Pelo contraste realizado pelo teste de Tukey (5%), o controle, *S. carpocapsae* e *Heterorhabditis* sp. Alho não apresentaram diferenças no comportamento na mortalidade das larvas parasitadas e não parasitadas ($p=0,9884$, $p=0,3670$ e $p=0,1655$, respectivamente). No entanto, para os demais isolados foi observado um aumento na mortalidade quando as larvas estavam parasitadas ($p<0,001$) (Tabela 4). Desta forma, as larvas parasitadas são mais susceptíveis aos isolados de nematoides entomopatogênicos estudados, sendo o isolado *Heterorhabditis* sp. Alho o isolado menos prejudicial às larvas parasitadas e que apresentou resultados satisfatórios para as larvas não parasitadas.

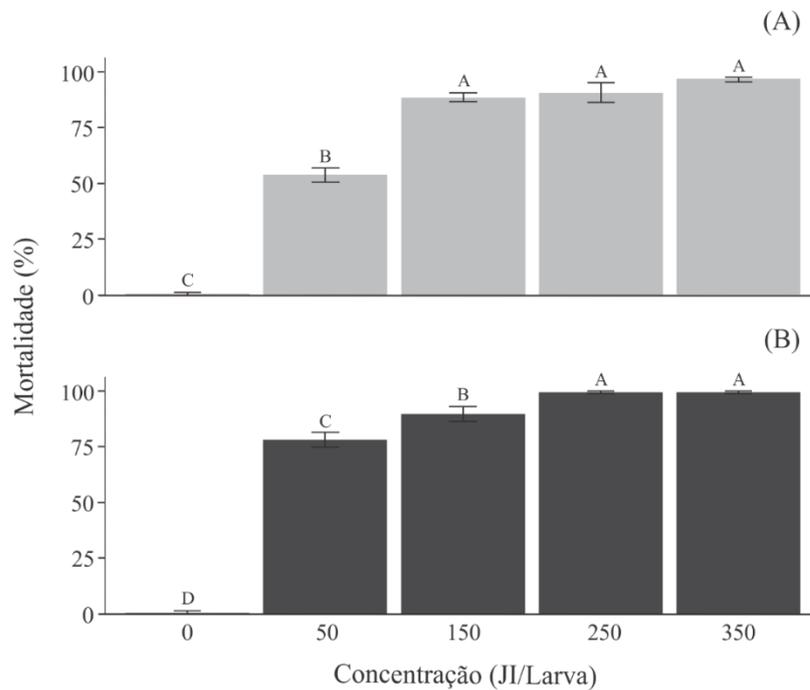
Bioensaio 2: Efeito de concentrações de isolados de nematoides entomopatogênicos sobre larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata*

Verificou-se que *Heterorhabditis* sp. Alho causou mortalidade em larvas de *C. capitata* parasitadas e não parasitadas por *D. longicaudata* em todas as concentrações aplicadas, com exceção do tratamento controle.

As concentrações aplicadas diferiram entre si. Para as larvas não parasitadas, a concentração 50 JI/larva diferiu das demais concentrações (GLM, teste da razão de verossimilhança; $X^2=464,45$, Df=4, $p<0,001$). Já nas larvas parasitadas, as concentrações 250 e 350 JI/larva apresentaram resultados semelhantes (GLM, teste da razão de verossimilhança;

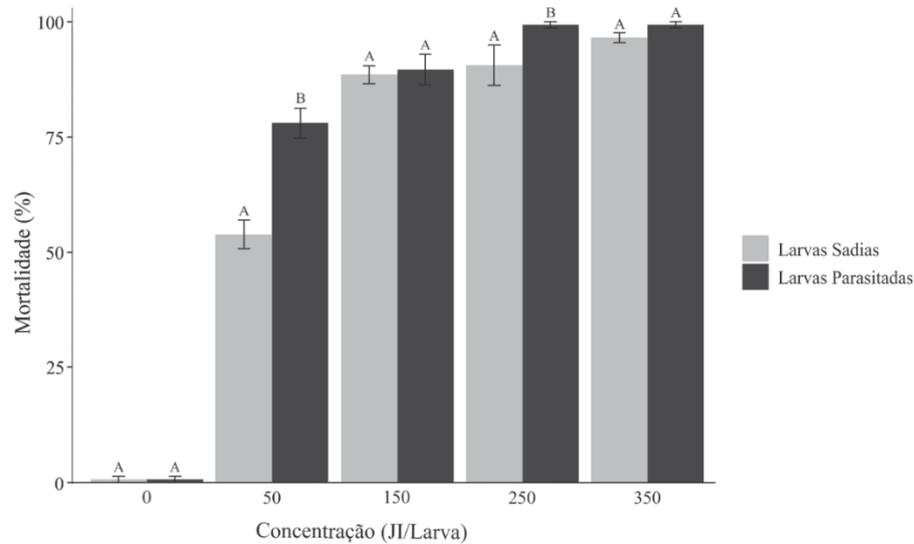
$X^2=572,29$, $Df=4$, $p<0,001$) (Figura 4). Em relação ao tipo de larva, as larvas parasitadas e não parasitadas apresentaram diferenças na taxa de mortalidade nas concentrações de 50 e 250 JI/larva (Figura 5).

Figura 4: Mortalidade das larvas de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) em diferentes concentrações de Juvenis Infectantes (JI) de *Heterorhabditis* sp. Alho (Rhabditida: Heterorhabditidae). (A) Mortalidade das larvas não parasitadas; (B) Mortalidade das larvas parasitadas por *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae).



Barras seguidas por letras diferentes indicam diferenças significativas na mortalidade das larvas de *C. capitata* entre as diferentes concentrações de nematoides entomopatogênicos aplicadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

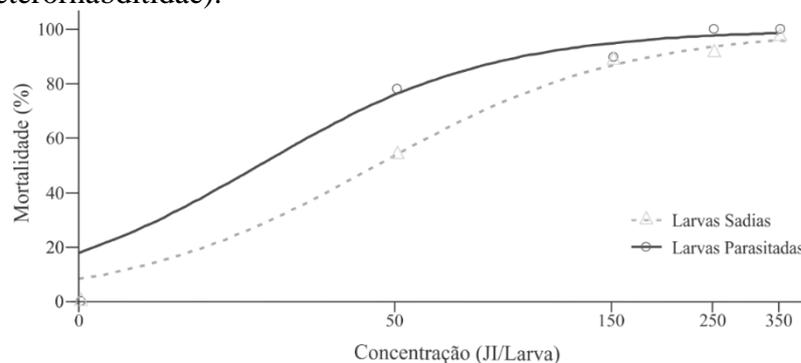
Figura 5: Mortalidade em larvas de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) parasitadas e não parasitadas por *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) ocasionada por diversas concentrações de *Heterorhabditis* sp. Alho (Rhabditida: Heterorhabditidae).



Barras seguidas por letras diferentes indicam diferenças significativas na mortalidade das larvas de *C. capitata* parasitadas e não parasitadas entre cada isolados de NEP estudados por meio de uma análise de contraste pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Além disso, foi observado que a mortalidade, independentemente do tipo de larvas, foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de JI. A mortalidade das larvas não parasitadas variou entre 53,9 e 96,6%, enquanto que a mortalidade das larvas parasitadas variou entre 78 e 99,3% (Figura 6).

Figura 6: Análise de regressão para a mortalidade confirmada de larvas de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) submetidas a diferentes concentrações de *Heterorhabditis* sp. Alho (Rhabditida: Heterorhabditidae).



Modelo log-logístico com dois parâmetros $y=1/(1+\exp\{b[\ln(x)-\ln(e)]\})$, utilizando o teste “Goodness-of-fit test”.

A concentração letal (CL₅₀ e CL₉₀) das larvas não parasitadas foi de 45,20JI/larva e 181,86 JI/larva (log-logístico, $X^2 = 46,24$, Df = 46, p = 0,4802). As larvas parasitadas tiveram uma dose efetiva CL₅₀ e CL₉₀ de 19,88 JI/larva e 93,54 JI/larva (Tabela 5). Nota-se que as larvas parasitadas requerem uma concentração de NEP menor para causar a mesma taxa de mortalidade das larvas não parasitadas.

No intuito de causar a maior mortalidade, utilizando a menor concentração de NEP, foi escolhida a concentração de aproximadamente 80JI/larva para dar sequência aos demais bioensaios, sendo responsável por matar 70% das larvas de *C. capitata*.

Tabela 5: Tabela: concentração de Juvenis Infectantes (JI) de *Heterorhabditis* sp. Alho (Rhabditida: Heterorhabditidae) necessária para causar mortalidade de larvas de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) parasitadas e não parasitadas por *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae).

Mortalidade desejada	Concentração de Juvenis Infectantes (JI)	
	Larvas não parasitadas	Larvas parasitadas
Mortalidade de 10% (CL ₁₀)	11,23 ± 2,66	6,62 ± 2,47
Mortalidade de 20% (CL ₂₀)	18,78 ± 3,50	10,79 ± 3,28
Mortalidade de 30% (CL ₃₀)	26,42 ± 4,08	14,93 ± 3,87
Mortalidade de 40% (CL ₄₀)	34,96 ± 4,53	19,48 ± 4,34
Mortalidade de 50% (CL ₅₀)	45,20 ± 4,93	19,88 ± 4,74
Mortalidade de 60% (CL ₆₀)	58,45 ± 5,37	31,77 ± 5,10
Mortalidade de 70% (CL ₇₀)	77,34 ± 6,16	41,46 ± 5,43
Mortalidade de 80% (CL ₈₀)	108,83 ± 8,52	57,37 ± 6,00
Mortalidade de 90% (CL ₉₀)	181,86 ± 18,81	93,54 ± 9,52
Mortalidade de 99% (CL ₉₉)	831,77 ± 201,09	336,88 ± 105,20

Bioensaio 3: Teste de infecção com chance de escolha por larvas de *C. capitata* parasitadas ou não parasitadas por *D. longicaudata*

O isolado *Heterorhabditis* sp. Alho causou mortalidade tanto em larvas parasitadas quanto em larvas não parasitadas em teste de infecção com chance de escolha, havendo diferenças na mortalidade dos diferentes tipos de larvas de *C. capitata*. Foi observado que algumas larvas do parasitoide conseguiram eclodir em larvas com sintomas de infecção (Figura 7). No entanto, resta saber se o seu desenvolvimento foi interrompido devido a infecção dos NEP nas larvas dos parasitoides, ou se as condições dentro da larva estavam impróprias para o seu desenvolvimento.

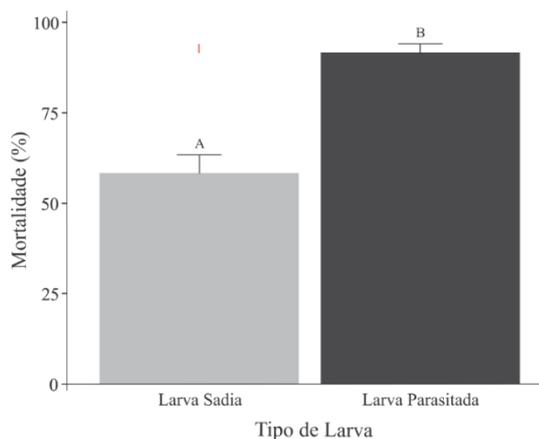
Figura 7: Larva do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) que conseguiram eclodir dentro da larva de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) infectada por *Heterorhabditis* sp. Alho (Rhabditida: Heterorhabditidae).



Fotos: SOUZA, M.M. Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Inseto, UFLA, Lavras, MG, Brasil.

As larvas parasitadas apresentaram alta mortalidade (91,67%), diferenciando-se das larvas não parasitadas (58,33%) (GLM, teste da razão de verossimilhança; $X^2=43,21$, Df=1, $p<0,001$) (Figura 8). Com isso, houve uma preferência dos NEP por larvas parasitadas.

Figura 8: Mortalidade de larvas de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) em teste de preferência do isolado de *Heterorhabditis* sp. Alho (Rhabditida: Heterorhabditidae) por larvas parasitadas ou não parasitadas por *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae).



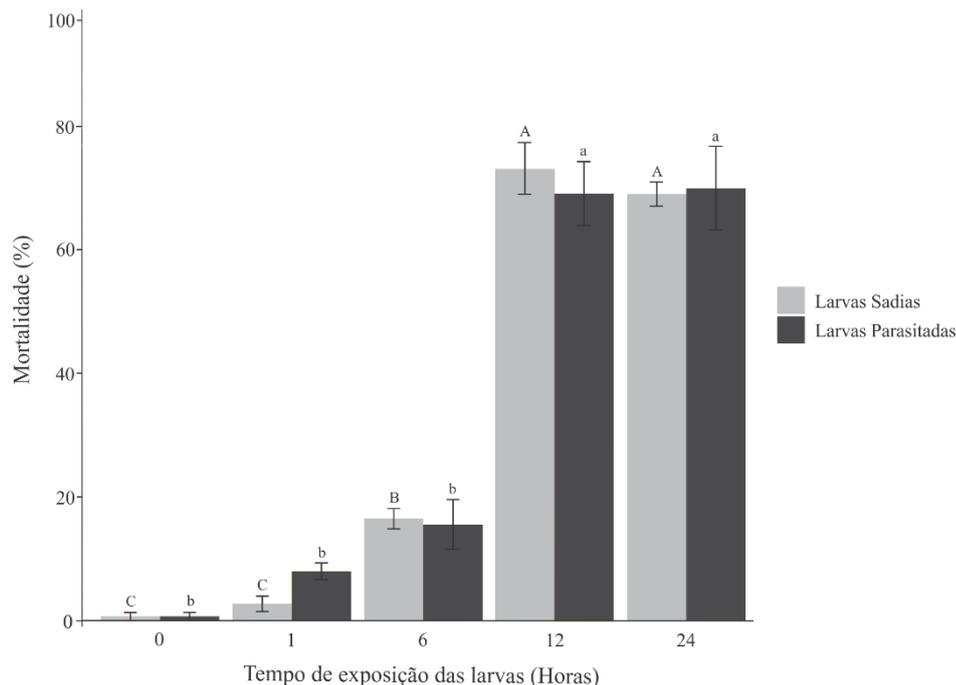
Barras seguidas por letras diferentes indicam diferenças significativas na mortalidade das larvas de *C. capitata* parasitadas e não parasitadas pelo NEP estudado por meio de uma análise de contraste pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Bioensaio 4: Tempo de exposição de larvas de *C. capitata* parasitadas e não parasitadas por *D. longicaudata* a nematoides entomopatogênicos

Todos os tempos de exposições permitiram que houvesse a infecção dos NEP. À medida que o tempo de exposição aumentou, houve um aumento na mortalidade até 12h. Os maiores tempos de exposição foram os que apresentaram as maiores mortalidades, diferindo dos menores tempo de exposição (GLM, teste da razão de verossimilhança; $X^2=474,39$, Df=4, $p<0,001$; $X^2=210,68$, Df=4, $p<0,001$, respectivamente).

Quando as larvas ficaram expostas por 12 e 24h aos NEP, apresentaram mortalidade de 73,3 e 68,9% nas larvas não parasitadas, respectivamente; e mortalidade de 69,3 e 69,9% nas larvas parasitadas, respectivamente. Essas mortalidades não diferiram entre si tanto nas larvas parasitadas quanto nas não parasitadas. Nos períodos de 1 e 6h, houve diferenças na mortalidade apenas nas larvas não parasitadas (Figura 9).

Figura 9: Mortalidade das larvas de *Ceratitis capitata* parasitadas e não parasitadas por *Diachasmimorpha longicaudata* em diferentes tempos de exposição aos Juvenis Infectantes (JI) de *Heterorhabditis* sp. Alho.



Barras seguidas por letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas na mortalidade das larvas de *C. capitata* não parasitadas e barras seguidas por letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas na mortalidade das larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata* pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O tempo de exposição não diferiu na mortalidade das larvas parasitadas e não parasitadas ($p<0,001$), o que leva a crer que a infecção dos NEP ocorre ao mesmo tempo, independentemente do tipo de larvas.

7 DISCUSSÃO

A patogenicidade dos NEP a larvas de tefritídeos vem sendo estudada por diversos autores (ROHDE et al., 2012; KAMALI et al., 2013; LANGFORD et al., 2014; FOELKEL; MONTEIRO; VOSS, 2015; MINAS et al., 2016; HEVE et al., 2017). No presente estudo, as larvas de *C. capitata* foram suscetíveis aos oito isolados testados. Dentre os isolados, *S. carpocapsae*, *H. amazonensis* RSC05, *Heterorhabditis* sp. RSC03, *Heterorhabditis* sp. JPM3 e *Heterorhabditis* sp. JPM4 já tiveram sua virulência comprovada em larvas de *C. capitata* (ROHDE et al., 2012; FOELKEL; MONTEIRO; VOSS, 2015). Este é o primeiro relato da patogenicidade de *Heterorhabditis* sp. Alho, *Heterorhabditis* sp. Ijaci e *Heterorhabditis* sp. NEPET11 sobre mosca-do-mediterrâneo, porém estes isolados já foram relatados para outros tefritídeos (FOELKEL; MONTEIRO; VOSS, 2015).

A eficiência das espécies ou isolados dos NEP interfere diretamente no controle do inseto-praga (BEN-YAKIR et al., 1998). Desta forma, os bioensaios de patogenicidade em laboratório servem para selecionar os NEP mais virulentos, sendo esta, uma etapa fundamental para o uso bem-sucedido desses agentes (JAMES; MALAN; ADDISON, 2018; LABAUDE; GRIFFIN, 2018; CHERGUI et al., 2019).

Steinernema carpocapsae foi a espécie de NEP que ocasionou a maior mortalidade, corroborando com Karagoz et al. (2009), Rohde et al. (2012) e Shaurub et al. (2015) que constataram que esta espécie de steinernematídeo é a mais virulenta para as larvas de *C. capitata*. Entre as espécies de heterorhabditídeos, *H. amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. Alho foram as mais virulentas, sendo semelhantes entre si e diferenciando de *S. carpocapsae*.

Diferenças na mortalidade ocasionada pelos principais gêneros de rhabditídeos foram encontradas por Karagoz et al. (2009), sendo as espécies de *Steinernema* mais virulentas que as espécies de *Heterorhabditis*. No entanto, segundo Malan e Manrakhan (2009), são as espécies de *Heterorhabditis* que causam maior infectividade nas larvas de mosca-das-frutas devido ao menor tamanho dos JI, facilitando a penetração pelas aberturas naturais, além de utilizar seu dente dorsal para penetrar na cutícula do hospedeiro. Esse comportamento não foi verificado neste trabalho, pois, em média, a taxa de penetração dos JI do gênero *Heterorhabditis* variou entre 5,5 e 41,3 JI/larva, sendo *Heterorhabditis* sp. Ijaci, que mais penetrou nas larvas de moscas-das-frutas, enquanto que o isolado *Heterorhabditis* sp. JPM4 teve a menor taxa de penetração. *Steineinerma carpocapsae* teve uma taxa de penetração de 47,3 JI/larva.

A maioria dos isolados utilizados neste trabalho, também foram utilizados por Rohde et al. (2012), sendo que as taxas de mortalidade obtidas neste trabalho foram superiores às obtidas por esses autores. A diferença entre as mortalidades encontradas nos diferentes trabalhos pode ser explicada pela diferença de concentrações de JI utilizadas.

Os resultados aqui apresentados comprovam que os NEP podem ser incorporados em programas de Manejo Integrado de moscas-das-frutas. No entanto, a introdução desse agente de biocontrole, permite o contato com outros inimigos naturais, como predadores e parasitoides, no mesmo habitat, sendo necessário estudos a respeito da interação entre esses agentes (GARRIGA et al., 2019).

Garriga et al. (2019) investigando a sobrevivência de espécies de predadores (*Macrolophus pygmaeus* (Rambur) (Hemiptera: Miridae), *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae), *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) e *Dalotia coriaria* (Kraatz) (Coleoptera: Staphylinidae)) e parasitoides (*Necremnus artynes* (Walker, 1839) (Hymenoptera: Eulophidae), *Diglyphus isaea* (Walker, 1838) (Hymenoptera: Eulophidae), *Dacnusa sibirica* Telenga, 1934 (Hymenoptera: Braconidae) e *Trichopria drosophilae* (Perkins, 1910) (Hymenoptera: Diapriidae)) comumente usadas em horticultura exposta aos NEP em condições de laboratório, demonstrou que a sobrevivência de inimigos naturais não foi afetada pelos tratamentos *H. bacteriophora*, *S. feltiae* ou *S. carpocapsae*. Esses resultados mostraram boa compatibilidade entre os inimigos naturais e os nematoides testados, no entanto, não se têm relatos sobre o efeito de NEP nos estágios imaturos desses parasitoides.

Em estudos realizados por Mbata e Shapiro-Ilan (2010) mostraram que não houve efeitos significativos na sobrevivência de adultos do parasitoide *H. hebetor* quando foi exposto ao nematoide *H. indica*, mas quando as larvas do parasitoide foram expostas diretamente aos nematoides apresentaram alta mortalidade, sugerindo que o NEP seja virulento apenas aos estágios de desenvolvimento do parasitoide.

Em relação às moscas-das-frutas, as espécies de NEP foram investigadas quanto à virulência apenas para as larvas não parasitadas. Pouco se sabe qual o efeito dos entomopatógenos em larvas parasitadas, uma vez que o parasitoide atua quando as larvas ainda estão dentro do fruto, e quando saem para empupar, entram em contato com os nematoides.

Este é o primeiro relato da interação entre os NEP e o parasitoide *D. longicaudata* no controle de *C. capitata*. Todos os isolados testados foram patogênicos às larvas da mosca parasitadas, apresentando mortalidade superior às larvas não parasitadas.

As larvas parasitadas de *C. capitata* podem ter sido mais susceptíveis aos NEP por duas hipóteses: 1) as cicatrizes de oviposição de *D. longicaudata* podem ter sido mais uma porta de entrada dos NEP; e 2) o sistema imunológico das larvas já estava sensível devido à presença dos ovos do parasitoide, pois no momento do parasitismo, desencadeiam-se respostas de defesa do hospedeiro, que geralmente são letais aos parasitoides em desenvolvimento, fazendo com que eles elaborem estratégias para contornar essas defesas (SIMMONDS; CARRILLO; BURKE, 2016). Dentre as estratégias está a injeção de vírus simbióticos, partículas semelhantes a vírus (VLPs), proteínas do ovário das vespas e componentes da superfície dos ovos, podendo funcionar de forma isolada ou em combinações (LAWRENCE, 2005), interferindo no sistema imunológico e/ou alterando o metabolismo do inseto por meio de proteínas imunossupressoras, induzindo a apoptose e/ou interrompendo a f-actina e outros aspectos da ultraestrutura dos hemócitos do hospedeiro (LAWRENCE, 2005; SIMMONDS; CARRILLO; BURKE, 2016).

Heve et al. (2018) estudando a eficácia da biodiversidade de nematoides entomopatogênicos em frutos infectados por *A. suspensa* (Loew, 1873), onde algumas larvas estavam parasitadas por *D. longicaudata*, sugerem que os rbdovírus endossimbióticos associados aos parasitoides impedem que os NEP infectem o hospedeiro em que o parasitoide está se desenvolvendo, ou que simplesmente, *D. longicaudata* seja resistente a infecções por NEP. No entanto, as larvas utilizadas nesses experimentos não foram verificadas quanto à presença de cicatrizes de oviposição do parasitoide como foi observado no presente trabalho. Além disso, a população do parasitoide em campo estava muito baixa, interferindo nas taxas de parasitismo, o que dificulta a comparação entre os resultados obtidos.

Mesmo assim, essas teorias não puderam ser comprovadas neste estudo, pois os nematoides conseguiram penetrar no hospedeiro mesmo com a presença dos ovos do parasitoide, a menos que, ao ovipositar, *D. longicaudata* não tenha introduzido os rbdovírus, o que é pouco provável.

Assim como a resistência do parasitoide aos NEP que também não pôde ser verificada, pois não se sabe se o seu desenvolvimento foi interrompido pela infecção dos nematoides ou se foi devido à morte do hospedeiro.

A morte do parasitoide devido a morte prematura do hospedeiro é a consequência mais comum, pois os metabólitos secundários produzidos pelos NEP alteram drasticamente sua qualidade para o outro organismo. Essa alternância de recursos efetivamente mata as larvas dos parasitoides que não são mortas diretamente por NEP, uma vez que os nematoides

não são parasitas normais desses inimigos naturais (MRÁČEK; SPITZER, 1983; ATWA et al., 2013).

Dentre todos os isolados, *Heterorhabditis* sp. Alho foi selecionado para dar continuidade aos bioensaios por apresentar uma mortalidade expressiva nas larvas de *C. capitata* não parasitadas e à menor mortalidade das larvas parasitadas.

A mortalidade das larvas de *C. capitata* foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de JI, assim como foi observado por Rohde et al. (2012), James, Malan e Addison (2018), Shaurub et al. (2015) e Minas et al. (2016). As larvas parasitadas também seguiram o mesmo padrão que as larvas sadias.

No entanto, as larvas parasitadas se mostraram mais susceptíveis que as larvas não parasitadas, pois altas mortalidades foram alcançadas com baixas concentrações de JI. As concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀) das larvas parasitadas aparentam ser duas vezes maiores que as das larvas não parasitadas. A análise de regressão também mostra essa tendência, uma vez que a linha que representa a mortalidade das larvas não parasitadas em função da concentração está sempre mais baixa que a linha das larvas parasitadas, se aproximando à medida que a concentração aumenta.

A análise de regressão obtida nesse trabalho difere dos resultados obtidos por Rohde et al. (2012) e Minas et al. (2016). Esses autores obtiveram uma regressão polinomial de segunda ordem, onde a tendência da curva é diminuir a partir de uma certa concentração em decorrência da competição intraespecífico, utilizando os isolados *H. baujardi* LPP7, *Heterorhabditis* sp. LPP14 e *Heterorhabditis* sp. LPP17, *Heterorhabditis* sp. RSC01 e *S. carpocapsae*, respectivamente, em larvas de *C. capitata*. Diferentemente do comportamento apresentado por *Heterorhabditis* sp. Alho, que aumentou até um determinado ponto e, posteriormente estabilizou na mortalidade superior a 90%.

A comparação entre as concentrações de JI é dificultada devido à ampla variação nas concentrações e resultados alcançados, sendo necessária uma padronização do número de juvenis em um determinado volume (MINAS et al., 2016).

As larvas de *C. capitata* aparentam ser mais susceptíveis a *Heterorhabditis* sp. Alho, que outras espécies como *S. yiergalemense* que teve CL₅₀ de 526,90 JI/inseto e CL₉₀ de 8863,2 JI/larva; e *H. momieputensis* com CL₅₀ de 37,80 JI/inseto e CL₉₀ de 635,84 JI/larva (JAMES; MALAN; ADDISON, 2018). A CL₅₀ obtida por Shaurub et al. (2015) para os isolados *H. bacteriophora* AS1, *H. bacteriophora* HP88, *S. carpocapsae* e *S. riobrave* foram de 23,3, 55,0, 59,3 e 80 JI/cm², respectivamente.

No intuito de causar a maior mortalidade utilizando a menor quantidade de JI por uma questão econômica, foi escolhida a concentração de aproximadamente 80 JI/larva, que ocasiona 70% de mortalidade, pois é a maior concentração que diferenciou das demais mortalidades.

Em testes de preferência, os NEP causaram maior mortalidade nas larvas que tinham sido previamente parasitadas que nas larvas não parasitadas, apesar destas terem apresentado mortalidade superior a 50%. Os resultados obtidos pelos testes realizados por Mbata e Shapiro-Ilan (2010) mostraram que os NEP também preferiram as larvas de *P. interpunctella* parasitada por *H. hebetor* quando foi possível escolher entre larvas parasitadas e não parasitadas.

Os nematoides apresentam uma variedade de estratégias de busca para maximizar as chances de detectar um hospedeiro (RUAN et al., 2018). As estratégias de forrageamento dos NEP pode ser de dois tipos: Emboscadores, que geralmente ficam à espera do hospedeiro; e os Cruzadores, que buscam ativamente os hospedeiros (SHAPIRO-ILAN et al., 2012). As espécies podem exibir uma combinação destas estratégias para localizar os hospedeiros, embora algumas espécies apresentem principalmente um comportamento específico, enquanto que outras espécies são consideradas intermediárias (SHAPIRO-ILAN et al., 2012; RUAN et al., 2018).

O comportamento que envolve movimento está intimamente ligado à distribuição espacial e ao sucesso do forrageamento (RUAN et al., 2018). Desta forma, é necessário realizar experimentos que elucidem o tipo de comportamento de busca de *Heterorhabditis* sp. Alho para entender a sua dispersão. Os heterorhabditídeos tendem a ser organismos cruzadores (SHAPIRO-ILAN et al., 2012). No entanto, segundo Bal e Grewal (2015), os cruzadores são melhores em infectar hospedeiros sedentários e os emboscadores são melhores em encontrar hospedeiros móveis, que é o caso de *C. capitata*.

Vários fatores abióticos e bióticos podem afetar o comportamento de forrageamento de NEP. Os JI respondem a vários estímulos como CO₂, vibrações, temperatura e compostos químicos (SHAPIRO-ILAN et al., 2012), tornando necessário a investigação de quais os estímulos que as larvas parasitadas estão emitindo para atrair os juvenis de *Heterorhabditis* sp. Alho.

Geralmente, o hospedeiro é infectado por dezenas a centenas de JI, raramente um único juvenil é capaz de ocasionar uma infecção bem-sucedida (RUAN et al., 2018). A mortalidade do inseto ocorre dentro de 48 a 72 horas após a infecção. Os resultados aqui obtidos demonstraram que a infecção ocorre nas primeiras 12 horas de exposição das larvas

aos NEP, não havendo acréscimo na mortalidade das larvas de *C. capitata* após serem expostas por 24 horas, comprovando que a infecção ocorre nas primeiras horas. O tempo de infecção foi semelhante nas larvas sadias e parasitadas.

Nas primeiras 12 horas, as larvas permanecem vivas, apresentando movimentação normal. A partir de 12 horas de exposição aos NEP, as larvas se encontram paralisadas e apresentando mudanças na coloração. Esses são sintomas característicos de infecção por nematoides. Segundo Alchanatis et al. (2000), e podem reduzir sua taxa de alimentação antes de morrer. As alterações de cor das os insetos infectados pelos NEP se movem com menos vigor larvas ocorrem naturalmente devido a polifenol oxidase durante as infecções bacterianas, resultando em uma massa de bactéria simbiótica com resto do corpo gorduroso do inseto (MRÁČEK; SPITZER, 1983).

Após o período inicial entre 12 e 24 horas, há uma redução na atração do hospedeiro para os JI de *H. bacteriophora*, ou seja, os hospedeiros infectados se tornam menos atraentes ou mesmo repelentes após um breve período de maior atratividade inicial dos JI (BAL; GREWAL, 2015).

Os resultados deste trabalho corroboraram os resultados obtidos por Ben-Yakir et al. (1998), onde as maiores mortalidades de *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796) (Lepidoptera: Pyralidae) ocorreram após ficarem expostas aos nematoides *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* por mais de 9h. Trabalhos realizados por Bal e Grewal (2015) mostraram que a dispersão de *H. bacteriophora* aconteceu durante as primeiras 12 horas em hospedeiros móveis.

De uma maneira geral, o presente trabalho demonstra que a interação entre o parasitoide *D. longicaudata* e os NEP pode ser considerada antagônica para o parasitoide, pois a infecção impede o seu desenvolvimento. Quando ambos agentes ocorrem simultaneamente dentro o hospedeiro em um estágio inicial, os NEP reduzem as chances dos parasitoides completarem seu desenvolvimento, pois são mais agressivo e também produz uma progênie muito maior que se espalha pela região próxima (MRÁČEK; SPITZER, 1983).

Estudos realizados por Kaya (1978) sugerem que vários estágios de desenvolvimento de parasitoides têm suscetibilidade variável a NEP, de modo que os estágios finais são menos afetados que os estágios iniciais. É provável que os estágios finais do parasitoide possam ter desenvolvido uma imunidade eficaz contra a infecção pelo NEP, além disso, a superfície cuticular e o casulo pupal podem ter fornecido uma barreira que reduzia a infecção (MBATA; SHAPIRO-ILAN, 2010).

Desta forma, o conhecimento do período de infecção dos NEP é fundamental para a elaboração de estratégias de liberação de inimigos naturais de modo que um agente não interfira na eficiência dos demais. A aplicação combinada de nematoides e parasitoides pode se tornar benéfica quando os efeitos prejudiciais do nematoide sobre o parasitoide puderem ser minimizados através das estratégias de aplicação (MBATA; SHAPIRO-ILAN, 2010; ATWA et al., 2013).

Esse fato é comprovado no estudo de Atwa et al. (2013), onde a interação entre os nematoides *H. bacteriophora* e *S. carpocapsae* e o parasitoide *Microplitis rufiventris* Kokujev, 1914 (Hymenoptera: Braconidae) em *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae) favoreceu os nematoides quando estes foram inoculados durante o estágio de ovo ou nos ínstares iniciais da larva, resultando na morte das larvas do parasitoide. Quando os nematoides foram inoculados durante o desenvolvimento larval tardio do parasitoide, as vespas tiveram chances de se desenvolver, emergir e se reproduzir, fornecendo evidências de que tanto nematoides quanto vespas podem se multiplicar no mesmo hospedeiro.

Portanto, os efeitos adversos gerados pela interação entre o parasitoide *D. longicaudata* e os NEP são particularmente indesejáveis pois reduzem o controle de *C. capitata*, sendo necessário adotar algumas ações que possam minimizar a interação antagônica entre esses inimigos naturais, como por exemplo, escolher isolados de nematoides que tenham menos efeitos no desenvolvimento do parasitoide, em doses que não interfira na população da vespa parasítica, mas que reduzam a população das moscas-das-frutas. No entanto, estudos adicionais são necessários para definir a melhor época de liberação de cada agente de biocontrole no agroecossistema, de modo que um organismo não interfira na eficiência dos demais.

8 CONCLUSÕES

A interação entre os NEP e o parasitoide *D. longicaudata* é antagônica ao parasitoide, pois o seu desenvolvimento é interrompido.

Os NEP provocam a mortalidade tanto das larvas de *C. capitata* parasitada por *D. longicaudata* quanto das larvas não parasitada, sendo as larvas parasitadas as mais susceptíveis aos NEP avaliados.

Heterorhabditis sp. Alho é o isolado que causa a menor mortalidade nas larvas parasitadas, apresentando mortalidade elevada das larvas não parasitadas.

A mortalidade das larvas de *C. capitata* é diretamente proporcional ao aumento da concentração de *Heterorhabditis* sp. Alho, de modo que a concentração de que permite o maior desenvolvimento do parasitoide *D. longicaudata* nas larvas, também ocasiona a menor sobrevivência das moscas.

As concentrações letais (CL₅₀ e a CL₉₀) das larvas de *C. capitata* parasitada por *D. longicaudata* é menor que as das larvas não parasitadas, sendo necessário uma baixa concentração para provocar uma elevada mortalidade.

Os NEP não conseguem distinguir entre larvas de *C. capitata* parasitadas e não parasitadas por *D. longicaudata* em arena com chances de escolha, havendo uma preferência pelas larvas parasitadas.

O aumento do tempo de exposição das larvas de *C. capitata* parasitada e não parasitadas por *D. longicaudata* provocou aumento na mortalidade das larvas, sendo semelhante o tempo de infecção em ambos os tipos de larvas.

REFERÊNCIAS

- ABRAFRUTAS. **Fruticultura - Setor em Expansão**. 2018. Disponível em: <<https://abrafrutas.org/2018/08/14/fruticultura-setor-em-expansao/>>. Acesso em: 28 de dez. de 2019.
- ABRAFRUTAS. **Estatística de exportações de frutas no primeiro Semestre de 2019**. 2019. Disponível em: <<https://abrafrutas.org/2019/07/17/estatistica-de-exportacoes-de-frutas-no-primeiro-semester-de-2019/>>. Acesso em: 28 de dez. de 2019.
- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. D. S.; CONTE, H. Controle biológico por insetos parasitoides em culturas agrícolas no Brasil: Revisão de literatura. **REVISTA UNINGÁ REVIEW**, v. 22, n. 2, 2015.
- AKHURST, R. J. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families heterorhabditidae and steinernematidae. **Journal of General Microbiology**, v. 128, n. 12, p. 3061–3065, 1982. doi: 10.1099/00221287-128-12-3061.
- AKMAN, O.; COMAR, T. D.; HROZENCIK, D. Model selection for integrated pest management with stochasticity. **Journal of theoretical biology**, v. 442, p. 110-122, 2018. doi: 10.1016/j.jtbi.2017.12.005.
- ALBAJES, R.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Efectos de la densidad larvaria y de la alimentación en la proporción de sexos de *Ceratitis capitata* (Diptera; trypetidae). **INIA/Ser. Agric**, v. 13, p. 175–182, 1980.
- ALCHANATIS, V.; NAVON, A.; GLAZER, I.; LEVSKI, S. PA—Precision Agriculture: An Image Analysis System for measuring Insect Feeding Effects caused by Biopesticides. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 77, n. 3, p. 289-296, 2000.
- ALMENARA, D. P.; CAMARGO NEVES, M. R.; KAMITANI, F. L.; WINTER, C. E. Entomopathogenic nematodes: two sides of a symbiosis. **Revista da Biologia**, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2011. doi: 10.7594/revbio.06b.01
- ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 21–37.
- ARAUJO, E. L.; RIBEIRO, J. C.; CHAGAS, M. C. M.; DUTRA, V. S.; SILVA, J. G. Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em um pomar de goiabeira, no semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 471–476, 2013. doi: 10.1590/S0100-29452013000200016.
- ARAUJO, E. L.; ZUCCHI, R. A. Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em goiaba (*Psidium guajava* L.), em Mossoró, RN. **Arq. Inst. Biol**, v. 70, n. 1, p. 73–77, 2003.
- ATWA, A. A.; HEGAZI, E. M.; KHAFAGI, W. E.; EL-AZIZ, G. M. A. Interaction of the koinobiont parasitoid *Microplitis rufiventris* of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*, with two entomopathogenic Rhabditids, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. **Journal of insect science (Online)**, v. 13, p. 84, 2013. doi: 10.1673/031.013.8401.
- AZEVEDO, F. R.; SANTOS, C. A. M.; NERE, D. R.; MOURA, E. S. Incremento do controle biológico natural de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em pomar de goiaba com valas. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 23, n. 1, p. 46–55, 2013.
- BADII, K. B.; BILLAH, M. K.; AFREH NUAMAH, K.; OBENG OFORI, D.; NYARKO, G. Review of the pest status, economic impact and management of fruit-infesting flies (Diptera: Tephritidae) in Africa. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 12, p. 1488–1498, 2015. doi: 10.5897/ajar2014.9278.
- BAKER, B. P.; GREEN, T. A.; LOKER, A. J. Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. **Biological Control**, v. 140, p. 104095, 2020. doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.104095.
- BAL, H. K.; GREWAL, P. S. Lateral Dispersal and Foraging Behavior of Entomopathogenic Nematodes in the Absence and Presence of Mobile and Non-Mobile Hosts. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p.

e0129887, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0129887.

BATES, D.; MÄCHLER, M.; BOLKER, B.; WALKER, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. **Journal of Statistical Software**, v. 67, n. 1, 2015. doi: 10.18637/jss.v067.i01.

BEN-YAKIR, D.; EFRON, D.; CHEN, M.; GLAZER, I. Evaluation of entomopathogenic nematodes for biocontrol of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, on sweet corn in Israel. **Phytoparasitica**, v. 26, n. 2, p. 101–108, 1998. doi: 10.1007/BF02980676.

BISSOLLI, G.; BARCELOS, C.; BARBOSA, J. C. Seleção de fungos patogênicos para controle de larvas e pupas da mosca-das-frutas *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Científica**, v. 42, n. 4, p. 338–345, 2014.

CAMARGOS, M. G.; COSTA, M. L. Z.; MIRANDA, E. D. S. Custos variáveis de produção de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) para controle de moscas-das-frutas. **Revista iPecege**, v. 3, n. 2, p. 9, 2017. doi: 10.22167/r.ipecege.2017.2.9.

CARVALHO, S. C.; NASCIMENTO, A. S. Criação e utilização de *Diachasmimorpha longicaudata* para controle biológico de moscas-das-frutas (Tephritidae). In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CÔRREA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: Parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 165–172.

CARVALHO, R. S. Avaliação das liberações inoculativas do parasitóide exótico *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead)(Hymenoptera: Braconidae) em pomar diversificado em Conceição do Almeida, BA. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 799–805, 2005. doi: 10.1590/S1519-566X2005000500012.

CARVALHO, R. S. Biocontrole de moscas-das-frutas: histórico, conceitos e estratégias. **Bahia Agrícola**, v. 7, n. 3, p. 14–17, 2006.

CARVALHO, S. C.; NASCIMENTO, A. S.; MATRANGOLO, W. J. R. Controle biológico. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Holos ed. [s.l: s.n.] p. 113–117.

CEPEA. **PIB do Agronegócio Brasileiro**. 2019a. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>>. Acesso em: 28 de dez. de 2019.

CEPEA. **Exportação do Agronegócio: Índices**. 2019b. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/indices-de-exportacao-do-agronegocio.aspx>>. Acesso em: 28 de dez. de 2019.

CHERGUI, S.; BENZEHRA, A.; BOUDJEMAA, K.; BARKOU, H.; KARACA, I. Efficacy of Turkish isolate of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) in controlling the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), under laboratory conditions. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 29, n. 60, 2019. doi: 10.1186/s41938-019-0162-4.

CHRISTENSON, L. D.; FOOTE, R. H. Biology of Fruit Flies. **Annual Review of Entomology**, v. 5, n. 1, p. 171–192, 1960.

COSTA, R. I. F.; SILVA, C. G.; MARCHIORI, C. H.; AMARAL, B. B.; POLETTI, M. M.; TORRES, L. C. Parasitismo em *Anastrepha* sp. (Diptera: Tephritidae) por *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes, 1924) e *Dicerataspis* sp. (Hymenoptera: Figitidae: Eucoilinae). **Ciênc. agrotec.**, v. 31, n. 3, p. 720–723, 2007.

DIAS, N. P.; ZOTTI, M. J.; MONTROYA, P.; CARVALHO, I. R.; NAVA, D. E. Fruit fly management research: A systematic review of monitoring and control tactics in the world. **Crop Protection**, v. 112, p. 187–200, 2018. doi: 10.1016/j.cropro.2018.05.019.

DOLINSKI, C.; LACEY, L. A. Microbial control of arthropod pests of tropical tree fruits. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 2, p. 161–179, 2007. doi: 10.1590/S1519-566X2007000200001.

EVERARD, A.; GRIFFIN, C. T.; DILLON, A. B. Competition and intraguild predation between the

braconid parasitoid *Bracon hylobii* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis downesi*, natural enemies of the large pine weevil, *Hylobius abietis*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 99, n. 02, p. 151, 2009. doi: 10.1017/S0007485308006287.

FOELKEL, E.; MONTEIRO, L. B.; VOSS, M. Virulence of nematodes against larvae of the south-American fruit fly in laboratory using soil from Porto Amazonas, Paraná, Brazil, as substrate. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 405–410, 2015. doi: 10.1590/0103-8478cr20150370.

FUGA, C. A. G.; FERNANDES, R. H.; LOPES, E. A. Nematoides entomopatogênicos. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 6, n. 3, p. 56-75, 2012. doi: 10.0000/RTCAB.V6I3.900.

GARCIA, F. R. M.; RICALDE, M. P. Augmentative biological control using parasitoids for fruit fly management in Brazil. **Insects**, v. 4, n. 1, p. 55–70, 2013. doi: 10.3390/insects4010055.

GARRIGA, A.; MORTON, A.; GARCÍA-LÓPEZ, D.; GARCÍA-DEL-PINO, F. Compatibility of entomopathogenic nematodes with natural enemies for horticultural pest control. **Biological Control**, v. 138, p. 104050, 2019. doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.104050.

GONZALEZ, F.; TKACZUK, C.; DINU, M.M; FIEDLER, E.U.A.; VIDAL, S.; ZCHORI-FEIN, E.; MESSELINK, G.J. New opportunities for the integration of microorganisms into biological pest control systems in greenhouse crops. **Journal of Pest Science**, v. 89, n. 2, p. 295-311, 2016. doi: 10.1007/s10340-016-0751-x.

HARBI, A.; BEITIA, F.; FERRARA, F.; CHERMITI, B.; SABATER-MUÑOZ, B. Functional response of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) over *Ceratitidis capitata* (Wiedemann): Influence of temperature, fruit location and host density. **Crop Protection**, v. 109, p. 115–122, 2018. doi: 10.1016/j.cropro.2018.03.010.

HARBI, A.; ABBES, K.; CHERMITI, B.; MARTINS, D.; HAFSI, A.; SABATER-MUÑOZ, B.; BEITIA, F. Life History Parameters of *Diachasmimorpha longicaudata* on *Ceratitidis capitata* Under Laboratory Conditions: Implications for Mass Rearing and Biological Control. **Tunisian Journal of Plant Protection**, v. 11, n. 2, p. 207–217, 2016.

HEVE, W. K.; EL-BORAI, F. E.; CARRILLO, D.; DUNCAN, L. W. Biological control potential of entomopathogenic nematodes for management of Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* Loew (Tephritidae). **Pest Management Science**, v. 73, n. 6, p. 1220–1228, 2017. doi: 10.1002/ps.4447.

HEVE, W. K.; EL-BORAI, F. E.; JOHNSON, E. G.; CARRILLO, D.; CROW, W. T.; DUNCAN, L. W. Responses of *Anastrepha suspensa*, *Diachasmimorpha longicaudata*, and Sensitivity of Guava Production to *Heterorhabditis bacteriophora* in Fruit Fly Integrated Pest Management. **Journal of Nematology**, v. 50, n. 3, p. 261–272, 2018. doi: 10.21307/jofnem-2018-039.

HFBRASIL. **Anuário 2019 - 2020**. 2019. Disponível: <<https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/anuario-2019-2020-retrospectiva-2019-perspectivas-2020-dos-hf-s.aspx>>. Acesso em: 28 de dez. de 2019.

JAMES, M.; MALAN, A. P.; ADDISON, P. Surveying and screening South African entomopathogenic nematodes for the control of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann). **Crop Protection**, v. 105, p. 41–48, 2018. doi: 10.1016/J.CROPRO.2017.11.008.

KAMALI, S.; KARIMI, J.; HOSSEINI, M.; CAMPOS-HERRERA, R.; DUNCAN, L. W. Biocontrol potential of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* on cucurbit fly, *Dacus ciliatus* (Diptera: Tephritidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 23, n. 11, p. 1307–1323, 2013. doi: 10.1080/09583157.2013.835790.

KARAGOZ, M.; GULCU, B.; HAZIR, C.; KAYA, H. K.; HAZIR, S. Biological control potential of Turkish entomopathogenic nematodes against the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. **Phytoparasitica**, v. 37, n. 2, p. 153–159, 2009. doi: 10.1007/s12600-008-0020-5.

KAYA, H. K. Interaction between *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) and *Apanteles militaris* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 31, n. 3, p. 358-364, 1978. doi: 10.1016/0022-

2011(78)90229-X

KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C.; BELING, R. R. **Anuário brasileiro de horti&fruti 2019**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2018.

LABAUDE, S.; GRIFFIN, C. T. Transmission success of entomopathogenic nematodes used in pest control. **Insects**, v. 9, n. 2, 2018. doi: 10.3390/insects9020072.

LABBÉ, R. M.; GILLESPIE, D. R.; CLOUTIER, C.; BRODEUR, J. Compatibility of an entomopathogenic fungus with a predator and a parasitoid in the biological control of greenhouse whitefly. **Biocontrol Science and Technology**, v. 19, n. 4, p. 429–446, 2009. doi: 10.1080/09583150902803229.

LACEY, L. A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M. S. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1–41, 2015. doi: 10.1016/J.JIP.2015.07.009.

LANGFORD, E. A.; NIELSEN, U. N.; JOHNSON, S. N.; RIEGLER, M. Susceptibility of Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera: Tephritidae), to entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 69, p. 34–39, 2014. doi: 10.1016/j.biocontrol.2013.10.009.

LAWRENCE, P. O. Morphogenesis and cytopathic effects of the *Diachasmimorpha longicaudata* entomopoxvirus in host haemocytes. **Journal of Insect Physiology**, v. 51, n. 2, p. 221–233, 2005. doi: 10.1016/j.jinsphys.2004.12.003.

LEITE, S. A.; COSTA, D. R.; RIBEIRO, A. E. L.; MOREIRA, A. A.; SÁ NETO, R. J.; CASTELLANI, M. A. Oviposition preference and biological performance of *Ceratitis capitata* in Anacardiaceae, Cactaceae and Vitaceae fruit. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 86, 2019. doi: 10.1590/1808-1657001282018.

LORDAN, J.; ALEGRE, S.; ALINS, G.; SARASÚA, M. J.; MORTON, A.; GARCÍA DEL PINO, F. Compatibility between *Forficula auricularia* and entomopathogenic nematodes to be used in pome fruit pest management. **Journal of Applied Entomology**, v. 138, n. 9, p. 635–643, 2014. doi: 10.1111/jen.12118.

MAGALHÃES, B. P.; MINNERAT, R.; ALVES, S. B. Interações entre entomopatógenos, parasitoides e predadores. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 195–216.

MALAN, A. P.; MANRAKHAN, A. Susceptibility of the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) and the Natal fruit fly (*Ceratitis rosa*) to entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, n. 1, p. 47–49, 2009. doi: 10.1016/j.jip.2008.09.007.

MALISZEWSKI, E. **Os rumos da produção de frutas no Brasil**. 2019. Disponível em: <<https://abrafrutas.org/2019/11/04/os-rumos-da-producao-de-frutas-no-brasil/>>. Acesso em: 28 de dez. de 2019.

MAPA. **Intercâmbio Comercial do Agronegócio: principais mercados de destino**. 2017. Disponível em: <http://portaludop.com.br/download/estatistica/agronegocio/2017_intercambio_comercial_agronegoci_o_principais_mercados_destino_web.pdf>. Acesso em: 28 de dez. de 2019.

MAPA. **Plano Nacional de Desenvolvimento da Fruticultura**. 2017. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-lanca-plano-de-fruticultura-em-parceria-com-o-setor-privado/PlanoNacionaldeDesenvolvimentodaFruticulturaMapa.pdf/view>>. Acesso em: 29 de dez. de 2019.

MBATA, G. N.; SHAPIRO-ILAN, D. I. Compatibility of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Biological Control**, v. 54, n. 2, p. 75–82, 2010. doi: 10.1016/J.BIOCONTROL.2010.04.009.

MEIRELLES, R. N.; REDAELLI, L. R.; OURIQUE, C. B. Comparative Biology of

- Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) Reared on *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, v. 96, n. 2, p. 412–418, 2013. doi: 10.1653/024.096.0204.
- MEIRELLES, R. N.; REDAELLI, L. R.; OURIQUE, C. B. Thermal Requirements and Annual Number of Generations of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) Reared in the South American Fruit Fly and the Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, v. 98, n. 4, p. 1223–1226, 2015. doi: 10.1653/024.098.0432.
- MINAS, R. S.; SOUZA, R. M.; DOLINSKI, C.; CARVALHO, R. S.; BURLA, R. S. Potential of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae) to control Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) soil stages. **Nematoda**, v. 3, 2016. doi: 10.4322/nematoda.02016.
- MOHAMED, S. A.; RAMADAN, M. M.; EKESI, S. In and out of Africa: Parasitoids used for biological control of Fruit Flies. In: **Fruit Fly Research and Development in Africa - Towards a Sustainable Management Strategy to Improve Horticulture**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 325–368.
- MONTES, S. M. N. M.; RAGA, A.; BOLIANI, A. C.; DOS SANTOS, P. C. Dinâmica populacional e incidência de moscas-das-frutas e parasitoides em cultivares de pessegueiros (*Prunus persica* L. Batsch) no município de Presidente Prudente-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 402–411, 2011. doi: 10.1590/S0100-29452011005000052.
- MONTOYA, P.; BENREY, B.; BARRERA, J. F.; ZENIL, M.; RUIZ, L.; LIEDO, P. Oviposition Behavior and Conspecific Host Discrimination in *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a Fruit Fly Parasitoid. **Biocontrol Science and Technology**, v. 13, n. 7, p. 683–690, 2003. doi: 10.1080/09583150310001606273.
- MORAL, R. A.; HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. G. B. Half-Normal Plots and Overdispersed Models in R: The hnp Package. **Journal of Statistical Software**, v. 81, n. 10, 2017. doi: 10.18637/jss.v081.i10.
- MRÁČEK, Z.; SPITZER, K. Interaction of the predators and parasitoids of the sawfly, *Cephalcia abietis* (Pamphilidae: Hymenoptera) with its nematode *Steinernema kraussei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 42, n. 3, p. 397–399, 1983. doi: 10.1016/0022-2011(83)90181-7.
- MURIITHI, B. W.; AFFOIGNON, H. D.; DIIRO, G. M.; KINGORI, S. W.; TANGA, C. M.; NDERITU, P. W.; MOHAMED, S. A.; EKESI, S. Impact assessment of Integrated Pest Management (IPM) strategy for suppression of mango-infesting fruit flies in Kenya. **Crop Protection**, v. 81, p. 20–29, 2016. doi: 10.1016/j.cropro.2015.11.014.
- NAVA, D. E.; BOTTON, M. Bioecologia e Controle de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* em Pessequeiro. In: **Embrapa Clima Temperado. Documentos, 315 (INFOTECA-E)**. p. 29. 2010.
- NORRBOM, A. L. **The Diptera Site: Systematic Entomology Laboratory**. 2004. Acesso em: 29 dez. 2019.
- OLIVEIRA, A. M.; MARACAJÁ, P. B.; DINIZ FILHO, E. T.; LINHARES, P. C. F. Controle biológico de pragas em cultivos comerciais como alternativa ao uso de agrotóxicos. **Revista Verde**, v.1, n.2, p.01-09, 2006.
- OLIVEIRA, C. M.; AUAD, A. M.; MENDES, S. M.; FRIZZAS, M. R. Economic impact of exotic insect pests in Brazilian agriculture. **Journal of Applied Entomology**, v. 137, n. 1–2, p. 1–15, 2012. doi: 10.1111/jen.12018.
- OVRUSKI, S.; ALUJA, M.; SIVINSKI, J.; WHARTON, R. Hymenopteran parasitoids on fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the southern United States: Diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 5, n. 2, p. 81–107, 2000. doi: 10.1023/A:1009652431251.
- OVRUSKI, S. M.; OROÑO, L. E.; NÚÑES-CAMPERO, S.; SCHLISERMAN, P.; ALBORNOZ-MEDINA, L.; BEZDJIAN, L. P.; VAN-NIEUWENHOVE, G. A.; MARTIN, C. B. A review of hymenopterous parasitoid guilds attacking *Anastrepha* spp. and *Ceratitis capitata* (Diptera:

Tephritidae) in Argentina. In: 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance., Salvador. **Anais...** Salvador: 2006.

PARANHOS, B. J.; NAVA, D. E.; MALAVASI, A. Biological control of fruit flies in Brazil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**. Embrapa, , 2019. doi: 10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.26037.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. Controle biológico: Terminologia. In: PARRA, J. R. P. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Manole. 2002. p. 1–16.

POTRICH, M.; ALVES, L. F. A.; HAAS, J.; SILVA, E. R. L.; DAROS, A.; PIETROWSKI, V.; NEVES, P. M. O. J. Seletividade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* a *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 6, p. 822–826, 2009a. doi: 10.1590/S1519-566X2009000600016.

POTRICH, M.; CAPPELLARI, C.; COSTA, J. H. B.; ROMAN, J.; BONINI, A. K.; SILVA, E. R. L. Ação de Fungos Entomopatogênicos sobre o Parasitismo de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 1995–1998, 2009b.

R CORE TEAM. R: A language and Environment for Statistical Computing. 2019.

RAGA, A.; SATO, M. E. Controle químico de moscas-das-frutas. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 4, p. 881–889, 2016.

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-Response Analysis Using R. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0146021, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0146021.

ROHDE, C.; MOINO JUNIOR, A.; CARVALHO, F. D.; SILVA, M. A. T. Selection of entomopathogenic nematodes for the control of the fruit fly *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, n. suppl., p. 797–802, 2012. doi: 10.5039/agraria.v7isa2217.

ROHR, R. A.; JAHNKE, S. M.; REDAELLI, L. R. Does *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) have a preferential ínstar to parasitize Tephritidae (Diptera)? **Iheringia - Serie Zoologia**, v. 109, 2019. doi: 10.1590/1678-4766e2019014.

ROSSI-ZALAF, L. S.; ALVES, S. B.; LOPRS, R. B.; SILVEIRA NETO, S.; TANZINI, M. R. Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios**. 4. ed. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 279–302.

RUAN, W.; SHAPIRO-ILAN, D.; LEWIS, E. E.; KAPLAN, F.; ALBORN, H.; GU, X.; SCHLIEKELMAN, P. Movement patterns in Entomopathogenic nematodes: Continuous vs. temporal. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 151, p. 137–143, 2018. doi: 10.1016/j.jip.2017.11.010.

SCIARRETTA, A.; TABILIO, M. R.; LAMPAZZI, E.; CECCAROLI, C.; COLACCI, M.; TREMATERRA, P. Analysis of the Mediterranean fruit fly [*Ceratitidis capitata* (Wiedemann)] spatio-temporal distribution in relation to sex and female mating status for precision IPM. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0195097, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0195097.

SEARLE, S. R.; SPEED, F. M.; MILLIKEN, G. A. Population Marginal Means in the Linear Model: An Alternative to Least Squares Means. **The American Statistician**, v. 34, n. 4, p. 216–221, 1980. doi: 10.1080/00031305.1980.10483031.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; LEWIS, E. E.; CAMPBELL, J. F.; KIM-SHAPIRO, D. B. Directional movement of entomopathogenic nematodes in response to electrical field: effects of species, magnitude of voltage, and infective juvenile age. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, n. 1, p. 34–40, 2012. doi: 10.1016/j.jip.2011.09.004.

SHAURUB, E. H.; SOLIMAN, N. A.; HASHEM, A. G.; ABDEL-RAHMAN, A. M. Infectivity of four entomopathogenic nematodes in relation to environmental factors and their effects on the biochemistry of the Medfly *Ceratitidis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). **Neotropical**

Entomology, v. 44, n. 6, p. 610–618, 2015. doi: 10.1007/s13744-015-0332-3.

SIMIL, L. D.; LEITE, L. G.; TREVISAN, O.; COSTA, J. N. M.; OLIVEIRA, L. E.; SCHMIDT, F. S.; BUENO, R. N. da S.; BATISTA FILHO, A. Mortality of *Conotrachelus humeropictus* in response to combined application of the nematode *Steinernema braziliense* and the fungus *Beauveria bassiana*. **Arq. Inst. Biol.**, v. 85, n. 1, p. 1–9, 2018. doi: 10.1590/1808-1657000092016.

SIMMONDS, T. J.; CARRILLO, D.; BURKE, G. R. Characterization of a venom gland-associated rhabdovirus in the parasitoid wasp *Diachasmimorpha longicaudata*. **Journal of Insect Physiology**, v. 91–92, p. 48–55, ago. 2016. doi: 10.1016/j.jinsphys.2016.06.009.

SZYNISZEWSKA, A. M.; TATEM, A. J. Global assessment of seasonal potential distribution of mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–13, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0111582.

THOMAS, M. C.; HEPPNER, J. B.; WOODRUFF, R. E.; WEEMS, H. V.; STECK, G. J. **Mediterranean fruit fly - *Ceratitis capitata* (Wiedemann)**. 2001. Disponível em: <http://entnemdept.ufl.edu/creatures/fruit/mediterranean_fruit_fly.htm>. Acesso em: 05 de jan. de 2020.

THOMPSON, C. R. **A parasitoid wasp - *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead)**. 2001. Disponível em: <http://entnemdept.ufl.edu/creatures/beneficial/d_longicaudata.htm>. Acesso em: 06 de jan. de 2020.

TIMPRASERT, S.; DATTA, A.; RANAMUKHAARACHCHI, S. L. Factors determining adoption of integrated pest management by vegetable growers in Nakhon Ratchasima Province, Thailand. **Crop protection**, v. 62, p. 32–39, 2014. doi: 10.1016/j.cropro.2014.04.008.

VINSON, S. Bradleigh. Host selection by insect parasitoids. **Annual review of entomology**, v. 21, n. 1, p. 109–133, 1976.

VONTAS, J.; HERNÁNDEZ-CRESPO, P.; MARGARITOPOULOS, J. T.; ORTEGO, F.; FENG, H.-T.; MATHIOPOULOS, K. D.; HSU, J.-C. Insecticide resistance in Tephritid flies. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 100, n. 3, p. 199–205, 2011. doi: 10.1016/j.pestbp.2011.04.004.

WHARTON, R. A.; YODER, M. J. **Parasitoids of Fruit-Infesting Tephritidae**. 2020. Disponível em: <<http://paroffit.org/public/site/paroffit/home>>. Acesso em: 07 de jan. de 2020.

WHITE, I. M.; ELSON-HARRIS, M. M. **Fruit Flies of Economic Significance: Their Identification and Bionomics**. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 1992. p. 601.

ZUCCHI, R. A.; MALAVASI, A.; NASCIMENTO, A. S.; WALDER, J. M. M. Prejuízos das moscas-das-frutas na exportação de citros. **Visão Agrícola**, v. 2, n. 2, p. 73–77, 2004.

ZUCCHI, R. A.; MORAES, R. C. **Anastrepha species their host plants and parasitoids**. 2008. Disponível em: <<http://www.lea.esalq.usp.br/anastrepha/>>. Acesso em: 30 de dez. de 2019.

ZUCCHI, R. A.; MORAES, R. C. **Fruit flies in Brazil - Hosts and parasitoids of the Mediterranean fruit fly**. Disponível em: <<http://www.lea.esalq.usp.br/ceratitis/>>. Acesso em: 30 de dez. de 2019.