



## **INFECTIVIDADE DE *Heterorhabditis amazonensis* A LARVAS DE *Anastrepha fraterculus* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) EM DIFERENTES SUBSTRATOS**

INFECTIVITY OF *Heterorhabditis amazonensis* The *Anastrepha fraterculus* larvae (DIPTERA: TEPHRITIDAE) IN DIFFERENT SUBSTRATES

SANDRA MARA CHANEIKO<sup>1</sup>, ANDRESSA LIMA DE BRIDA<sup>1</sup>, JULIESER BOTELHO MACHADO<sup>1</sup>, FLÁVIO ROBERTO MELLO GARCIA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Laboratório Ecologia de Insetos. Campus Universitário s/n. Capão do Leão. CEP: 96010-900, Pelotas, RS. Brasil.

### **RESUMO**

A espécie *Anastrepha fraterculus* encontra-se entre as principais pragas da fruticultura brasileira. O uso de nematoides entomopatogênicos consiste em uma alternativa promissora no controle biológico dessa espécie. Buscando alcançar a eficiência destes agentes, em experimentos em condições de laboratório, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do substrato na capacidade de infecção de juvenis infectantes de *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 a larvas de *A. fraterculus* em diferentes concentrações. O isolado *H. amazonensis* IBCBn 24 foi inoculado nas concentrações de 50, 150, 300, 500, 1000 e 1500 juvenis infectantes/mL e testemunha de (1 mL água destilada) em areia esterilizada e em papel filtro ambos em placas de Petri (5cm). Após a inoculação foram liberadas cinco larvas de terceiro instar de *A. fraterculus*, posteriormente as placas de Petri foram vedadas com papel filme tipo PVC e armazenadas em câmara climatizada a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com HR de  $70\pm 10\%$  no escuro. As avaliações foram realizadas sete dias após a inoculação. Os cadáveres das larvas foram dissecados para a quantificação do número de adultos e juvenis de segunda geração. As taxas de infecções de adultos em papel filtro e areia variaram de 1,24 a 1,72 Jis/larva e 1,33 a 3,78 Jis/larva sem diferenças significativas entre as concentrações. As maiores taxas de infecções dos juvenis de segunda geração



3,26, 3,74 e 3,77 Jis/larva em papel filtro foi encontrada nas concentrações de 300, 1000 e 1500 Jis/mL e no substrato areia as concentrações de 500, 1000 e 1500 com taxas de 4,03, 3,74 e 3,91 Jis/larva, respectivamente.

**Palavras chave:** Nematoides entomopatogênicos; Controle biológico; Mosca-das-frutas.

### ABSTRACT

The species *Anastrepha fraterculus* is among the main pests of Brazilian fruit growing. The use of entomopathogenic nematodes is a promising alternative in the biological control of this species. The objective of this work was to evaluate the influence of the substrate on the infectivity of infecting juveniles of *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 to *A. fraterculus* larvae in different concentrations. *H. amazonensis* IBCBn 24 was inoculated at concentrations of 50, 150, 300, 500, 1000 and 1500 infective juveniles/mL and control (1 mL distilled water) on sterilized sand and filter paper both in Petri dishes (5cm). After inoculation five larvae of third instar of *A. fraterculus* were released, later Petri dishes were sealed with PVC film and stored in an air conditioned chamber at  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , with UR of  $70\pm 10\%$  in the dark. Evaluations were performed seven days after inoculation. The cadavers of the larvae were dissected for the quantification of the number of adults and second generation juveniles. Adult infection rates on filter paper and sand ranged from 1.24 to 1.72 IJs/larvae and 1.33 to 3.78 IJs/larvae without significant differences between concentrations. The highest infection rates of the second generation juveniles 3.26, 3.74 and 3.77 IJs/larva in filter paper were found at the concentrations of 300, 1000 and 1500 IJs/mL and in the sand substrate the concentrations of 500, 1000 and 1500 with rates of 4.03, 3.74 and 3.91 IJs/larva, respectively.

**Key words:** Entomopathogenic nematodes; Biological control; Fruit fly.

### INTRODUÇÃO

As moscas-das frutas estão entre as principais pragas da fruticultura brasileira, ocasionando prejuízos de até US\$ 120 milhões/ano a este setor (PORTAL BRASIL, 2015). Os danos se iniciam no momento da postura realizada pela fêmea no fruto, que resulta no



desenvolvimento larval, e permite a entrada de patógenos através dos orifícios deixados no epicarpo pela inserção do ovipositor (MALAVASI, 2000).

A espécie *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) é a mais frequente entre as moscas-das-frutas no Brasil, apresentando relações com mais de 90 espécies de plantas, sendo estas das famílias Sapotaceae Myrtaceae, Anacardiaceae, e Passifloraceae (ZUCCHI, 2008).

O controle do inseto é realizado principalmente com inseticidas químicos aplicados em pulverização de ampla cobertura, que além de deixar grande quantidade de resíduos nos frutos, geram uma série de desequilíbrios ambientais (BAKER et al., 2002; HARTER et al., 2015).

A procura por métodos alternativos menos contaminantes para o controle do inseto vem se intensificando (SILVA et al., 2006), e o uso de nematoides entomopatogênicos é considerado método muito promissor (POINAR; GREWAL, 2012; GARCIA et al., 2017).

Trabalhos anteriores já relataram a eficiência dos patógenos no controle do inseto, como de Rodrigues-Trentini (1996), Barbosa-Negrisoni et al. (2009), Canesin (2011) e Foelkel et al. (2016), onde obtiveram grande mortalidade de larvas e pupas do inseto expostas a diferentes isolados.

Buscando alcançar a eficiência destes agentes, em experimentos em condições de laboratório, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do substrato na capacidade de infecção de juvenis infectantes de *Heterorhabditis amazonensis* (Andaló) IBCBn 24 a larvas de *A. fraterculus* em diferentes concentrações.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Ecologia de Insetos da Universidade Federal de Pelotas, UFPel Campus Capão do Leão, RS.

As larvas de *A. fraterculus* utilizadas foram criadas no Laboratório de Biologia de Insetos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (UFPEL). A criação foi mantida em sala



climatizada ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), com UR  $70\pm 10\%$  e fotofase de 12h. A alimentação consistiu em dieta artificial, seguindo a metodologia adaptada por Nunes et al. (2013) para os adultos e de Salles (1992) para as larvas.

O isolado de nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 foi cedido pelo Instituto Biológico, sendo proveniente da coleção de organismos entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu”.

Para a multiplicação do isolado, cinco larvas de *G. mellonella* foram colocadas em placa de Petri (9cm de diâmetro) revestidas por duas folhas de papel filtro, umedecido com 1,5 mL de suspensão de nematoides na concentração com 500 JIs/cm<sup>2</sup>, disponibilizando (100 JIs/larva). As placas de Petri foram tampadas e vedadas com filme de policloreto de vinila (PVC) e armazenadas a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  e UR  $80\pm 10\%$ . Após três dias da mortalidade, os cadáveres foram transferidos para armadilha de White (White 1927) e mantidos a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  e UR de  $70\pm 10\%$  até a emergência dos JIs. Posteriormente os JIs foram coletados em água destilada (1cm de profundidade) em Erlemeyers, mantidos a  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $70\pm 10\%$  UR e utilizados 48h após a coleta.

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e cinco repetições. O isolado *H. amazonensis* IBCB n24 foi inoculado nas concentrações de 50, 150, 300, 500, 1000 e 1500 JIs/mL em areia esterilizada e em papel filtro ambos em placas de Petri (5cm). O tratamento com testemunha foi constituído apenas de 1 mL de água destilada (sem nematoide). Após a inoculação foram liberadas cinco larvas de terceiro instar de *A. fraterculus*. As placas de Petri foram vedadas com papel filme tipo PVC e armazenadas em câmara climatizada a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , e  $70\pm 10\%$  UR no escuro. As avaliações foram realizadas sete dias após a inoculação. Os cadáveres das larvas foram dissecados para a quantificação do número de adultos e juvenis de segunda geração.

As médias de infecção de adultos e virulência foram obtidas através da análise Anova e comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade normalizados por  $x1=\sqrt{(X+1.0)}$ , através do programa estatístico Sisvar 5.6 (2010) (Universidade Federal de Lavras-Minas Gerais, Brazil).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As taxas de infecção de adultos variaram de 1,24 e 1,72 de NEPs/inseto em papel filtro e de 1,33 a 3,78 em areia, sem diferenças significativas entre as concentrações. No entanto, as maiores médias ocorreram no tratamento com areia, o que deve-se as condições que esse substrato proporciona ao patógeno, permitindo maior mobilidade e deslocamento até o hospedeiro, além de protegerem da exposição a luminosidade (MASON; HOMINICK, 1995; PORTILLO-AGUILAR et al., 1999; BRIDA, 2015).

**Tabela 1-** Média de infectividade (%) de juvenis infectantes (Nº JIs) de *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 nas concentrações de 50, 150, 300, 500, 1000 e 1500 JIs/mL a larvas de *Anastrepha fraterculus* (Diptera:Tephritidae) em substratos de papel filtro e areia e JIs de segunda geração produzidos no hospedeiro.

<i>Heterorhabditis amazonensis</i> IBCBn 24				
Tratamento	Infectividade %			
	Nº adultos papel filtro	Nº adultos Areia	Nº juvenis papel filtro	Nº juvenis Areia
50	1.24±1,60a	1.33±0,44a	1.08±1,41a	1.08±0,44a
150	1.53±1,03a	1.70±0,41a	1.14±1,99a	2.18±0,79a
300	1.39±1,65a	1.59±0,33a	3.26±7,74b	1.93±1,20a
500	1.45±1,82a	1.57±0,67a	1.37±3,12a	3.03±3,36b
1000	1.72±0,82a	1.84±1,46a	3.74±5,14b	3.74±2,00b
1500	1.60±0,71a	3.78±4,75a	3.77±5,42b	3.91±1,82b
Testemunha	0,00±00	0,00 ±00	0,00±00	0,00±00
CV%	16,22	99.64	54,82	60.65
F (df)	2,33 (5)	1.055 (5)	5.09 (5)	2.64 (5)
P	0.0731	0.4092	0.0025	0.0482

As diferentes concentrações de JIs utilizadas também influenciaram na infectividade, sendo superior para as concentrações mais elevadas (1000 e 1500 JIs/mL), com taxas de infecção de adultos de 1,84 e 3,78 JIs/inseto em areia e 1,72 e 1,60 JIs/inseto em papel filtro respectivamente. As concentrações mais elevadas tendem a apresentar eficiência superior no controle de pragas, visto que ocorre a penetração de um maior número de NEPs no inseto (WESTERMAN, 1999). Resultados semelhantes foram obtidos por Foelkel et al. (2016), que relatou um aumento na mortalidade do inseto utilizando dosagens de JIs superiores (300 JIs/larva) do isolado *S. carpocapsae*. No entanto, resultados obtidos por Negrisola et al., (2009) contradizem esses valores, com médias similares de infectividade (72,0 e 76,0%) nas concentrações de 250 JIs/cm<sup>2</sup> e 500 JIs/cm<sup>2</sup>.

A taxa de multiplicação do isolado também demonstrou relação com a concentração inoculada e com o substrato utilizado, com maior média (3,91 JIs/inseto) para os tratamentos em areia na maior concentração inoculada (1500 JIs/mL). Concentrações mais elevadas tendem a apresentar maior mortalidade do hospedeiro, devido a penetração de um número de JIs superior, que resultam em taxas de multiplicação mais elevadas (WROODRING; KAYA, 1988). A areia permite melhor deslocamento dos patógenos até o hospedeiro, resultando em maior infectividade, e conseqüentemente, maior produção de JIs (BRIDA, 2015)

## CONCLUSÃO

Conclui-se com a presente pesquisa que o substrato e a concentração de JIs inoculada, exercem grande influência na infectividade e virulência de JIs em *A. fraterculus*. A maior taxa de infecção (3,78 JIs/inseto) e produção de JIs de segunda geração (3,91 JIs/inseto) ocorreu no tratamento com 1500 JIs/inseto, inoculados em areia.

## REFERÊNCIAS

BAKER, B. P.; BENBROOK, C. M.; GROTH, E.; BENBROOK, K. L. PESTICIDE residues in conventional, integrated pest management (IPM)-grown and organic foods: Insights from three US data sets, **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p.427-446, 2002.



BARBOSA-NEGRISOLI, C. R. C; GARCIA, M. S; DOLINSKI, C; NEGRISOLI JUNIOR, A. S; BERNARDI, D; NAVA, D. E. Efficacy of indigenous entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae), from Rio Grande do Sul, Brazil, against *Anastrepha fraterculus*(Wied.) (Diptera: Tephritidae) in peach orchards, **Journal of Invertebrate Pathology**, v.102, nº 1, p. 6-13, 2009.

BRIDA, A. L. **Levantamento de nematoides entomopatogênicos em áreas agrícolas e influência da temperatura e do substrato na sobrevivência, multiplicação e armazenamento.** 2015. 89f. Ph.D. Tese, (Doutorado em agronomia). Universidade Estadual Paulista “Júlio de mesquita Filho”, Botucatu.

CANESIN, A. **Avaliação de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) no controle de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) e do gorgulho-da- goiaba (Coleoptera: Curculionidae).** 2011. 54f. Ph.D. thesis, Universidade Federal de Grande Dourados, Dourados.

FOELKEL, E; VOSS, M; MONTEIRO, L. B; NISHIMURA.G. Isolation of entomopathogenic nematode in na apple orchard in southern Brazil and its virulence to *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) larvae, under laboratory conditions, **Brazilian Journal of Biology**, v.77, nº 1, p. 22-28, 2016.

GARCIA, F. R. M., BRIDA, A. L.; MARTINS, L. N.; ABEIJON, L. M.; LUTINSKI, J. C. **Biological control of fruit flies of the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae): current status and perspectives**, In: LEWIS DAVENPORT. (Org.). Biological control: methods, applications and challenges. Biological Control of Fruit Flies of the Genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae): current status and perspectives, vol. 13. Hauppauge: Nova Science Publishers, Hauppauge, p. 26-35, 2017.

HARTER, W. R., BOTTON, M.; NAVA, D. E.; GRUTZMACHER, A. D.; GONÇALVES, R. S.; JUNIOR, R. M.; BERNARDI, D.; ZANARDI, O. Z. Toxicities and Residual Effects of Toxic Baits Containing Spinosad or Malathion to Control the Adult *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, v.98, p.202-208, 2015.



KAYA, H. K., STOCK, S. P. **Techniques in insect nematology**, in: **L.A. Lacey (Ed.), Manual of techniques in insect pathology**, Academic Press, San Diego, CA. p. 281–324, 1997.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Holos Editora, Ribeirão Preto, SP, 2000.

MASON, J. M., HOMINICK, W. M. The effect of temperature on infection, development and reproduction of *Heterorhabditis*. **Journal of Helminthology**, v.69, p.337-345, 1995.

NUNES, A. M.; COSTA, K. Z.; FAGGIONI, K. M.; COSTA, M. L. Z.; GONÇALVES, R. S.; WALDER, J. M. M.; GARCIA, M. S.; NAVA, D. E. Dietas artificiais para a criação de larvas e adultos da mosca-das-frutas sul-americana. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.48, n.10. p.1309-1314, 2013.

POINAR, G. O.; GREWAL, P. S. History of entomopathogenic nematology. **Journal of Nematology**, v. 44, p.153-161, 2012.

PORTAL BRASIL. 2015. **Fruticultura**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/09/agricultura-destina-r-128-mi-contramoscas-das-frutas>>. Acesso em 09 set. 2017.

PORTILLO-AGUILAR, C.; VILLANI, M. G.; TAUBER, M. J.; TAUBER, C. A.; NYROP, J. P. Entomopathogenic nematode (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) response to soil texture and bulk density. **Environmental Entomology**, v.28, p.1021–1035, 1999.

RODRIGUES-TRENTINI, F. **Mecanismos de defesa e controle de Anastrephafraterculus (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) expostas a nematoides entomopatogênicos**. 1996. 73p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.





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

SILVA, F. F.; SOGLIO, F. K.; REDAELI, L. R.; SANTOS, J. A. Estudo de alternativas para o controle de moscas das frutas por meio de processos participativos de pesquisa. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v.1, n.1, p. 285- 288, 2006.

SISVAR. 2010. **Programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos**. Versão 5.3 (Biud 75). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

WESTERMAN, P. R. Aggregation of entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp., among host insects at 9 and 20°C and effects on efficacy. **Journal Invertebrate Pathology**, v.73, p.206-213, 1999.

WHITE, G. F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures, **Science**, v. 66, p.302-303, 1927.

ZUCCHI, R. A. 2008. **Fruit flies in Brazil**. Disponível em: <[www.lea.esalq.usp.br/anastrepha/](http://www.lea.esalq.usp.br/anastrepha/)>. Acesso em 07 set. 2017.