UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Programa de Pós-Graduação em Entomologia

DISSERTAÇÃO

Efeito de variedades de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) em laboratório

Liliane Nachtigall Martins

Pelotas, 2017

Liliane Nachtigall Martins

Efeito de variedades de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) em laboratório

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Entomologia, para obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração Entomologia).

Orientador: Prof. Dr. Flávio Roberto Mello Garcia

Coorientador: Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Coorientadora: Dr[a]. Adrise Medeiros Nunes

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M379e Martins, Liliane Nachtigall

Efeito de variedades de Bacillus thuringiensis no controle de Anastrepha fraterculus (Wied., 1830) em laboratório / Liliane Nachtigall Martins ; Flávio Roberto Mello Garcia, orientador ; Fábio Pereira Leivas Leite, Adrise Medeiros Nunes, coorientadores. — Pelotas, 2017.

65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Tephritidae. 2. Controle biológico. 3. Entomopatógeno. 4. Atrativos alimentares. 5. Inseto praga. I. Garcia, Flávio Roberto Mello, orient. II. Leite, Fábio Pereira Leivas, coorient. III. Nunes, Adrise Medeiros, coorient. IV. Título.

CDD : 595.7165

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Liliane Nachtigall Martins

Efeito de variedades de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) em laboratório

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências (área de concentração Entomologia), Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.
Data da Defesa: 22/02/2017

Banca examinadora:

_____
Prof. Dr. Flávio Roberto Mello Garcia (Orientador)
Doutor em Zoologia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

_____
Dr. Dori Edson Nava
Doutor em Entomologia pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

_____
Dr[a]. Glaucia de Figueiredo Nachtigal
Doutora em Agronomia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

_____
Prof. Dr. Jader Ribeiro Pinto
Doutor em Fitossanidade pela Universidade Federal de Pelotas.

Dedico este estudo ao meu avô materno, Gilberto Nachtigall, que dedicou anos de trabalho à UFPel.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas e ao programa de Pós-graduação em Entomologia (PPG Entomologia) pela oportunidade de realização do curso e pelo espaço físico.

Aos professores, pesquisadores e colaboradores do PPG Entomologia pela atenção e ensinamentos.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Roberto Mello Garcia, pelo incentivo, por acreditar em mim, auxiliando na realização deste sonho, por dividir a preocupação com a saúde dos produtores rurais e com o meio ambiente, agradeço pela atenção, carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, pela coorientação, auxílio e confiança para a execução deste trabalho.

À Dr[a]. Adrise Medeiros Nunes, pela excelente coorientação, preocupação, atenção, ensinamentos, troca de experiências, amizade e carinho.

À Ana Paula Stori de Lara, sem ela este trabalho não seria possível, obrigada pela preparação das bactérias, pelo cuidado, pela confiança em dividir comigo dias e dias de trabalho intenso, além de uma colega, agora, também, uma grande amiga.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Ecologia de Insetos, em especial ao Márcio Ferreira que dividiu suas férias para a execução dos experimentos, obrigada pela dedicação e cuidados. Ao Cristiano Teixeira, sempre com seus ensinamentos, atenção e amizade. À Júlia Aleixo e ao Sávio Mendes que entraram a pouco, mas que já são da família, pois fazem parte deste grande ciclo de amigos, obrigada também à Alexandra Krüguer que me ensinou a criar as moscas para o estudo, obrigada pelo carinho, pela amizade e pela troca. E por fim e não menos importante minhas queridonas Jutiane Wollmann e a Daniele Schlesener que a vida se encarregou de colocar no meu caminho para somar, obrigada meninas pela amizade, carinho, atenção, pelos ensinamentos que sempre foram muito proveitosos, vocês foram meu grande presente durante esses dois anos.

Aos grandes amigos que durante este período me ajudaram no trabalho com questionamentos e dúvidas que vieram a somar para a construção desta pesquisa, Fabrício Fernandes e Suzane Allend.

À minha mãe Luciara Nachtigall Martins, meu irmão Maicon Nachtigall, meus sogros Mário de Mattos e Tânia de Mattos e minha tia querida Ivania Almeida pela preocupação, por dividirem comigo as vitórias, pelas palavras de carinho e pelos abraços sinceros. Ao meu futuro esposo Thiago de Mattos que sempre me incentivou a continuar meus estudos, agradeço pelo amor, carinho e atenção.

Resumo

MARTINS, Liliane Nachtigall. **Efeito de variedades de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) em laboratório.** 2017. 65f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Programa de Pós-graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Anastrepha fraterculus (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae) é uma das principais pragas da fruticultura na América do Sul e de importância quarentenária para outros continentes. Considerando que o controle é realizado predominantemente através de controle químico, que pode acarretar problemas de contaminação ambiental, de saúde humana, sociais e econômicos, torna-se necessário o estabelecimento de técnicas alternativas de controle. O entomopatógeno *Bacillus thuringiensis* vem sendo utilizado separadamente ou associado a outras formas de controle no Manejo Integrado de Pragas. Neste contexto o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos dessa bactéria no controle de imaturos e adultos da mosca-das-frutas sul-americana. Para tanto, foram testadas três variedades de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*), *kurstaki* (*Btk*) *e oswaldocruzi* (*Bto*) em três diferentes concentrações ($2x10^7$, 10^8 e 10^9 UFC mL^{-1}) na dieta artificial de imaturos de *A. fraterculus* e foi verificado seu efeito em larvas, pupas e adultos. Foi adicionado solução bacteriana ($1x10^9$ UFC mL^{-1}) a três tipos de atrativos alimentares (Bioanastrepha a 5%, calda de pêssego 50% e Ceratrap®). Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que ocorre um aumento na mortalidade larval com aplicação de maiores concentrações de suspensão de *Bto* com eficiência de 81,26%. O Ceratrap® em mistura com *Bti* teve uma eficiência de controle de 100% dos adultos em um período de sete dias. Conclui-se que ao colocar bactéria na dieta artificial a variedade que mais causou eficiência no controle de imaturos foi *Bto* e que misturando *Bti* Ceratrap® obtém uma eficiência de 100% no controle dos adultos.

Palavras-chave: Tephritidae, controle biológico, entomopatógeno, atrativos alimentares.

Abstract

MARTINS, Liliane Nachtigall. **Effect of *Bacillus thuringiensis* varieties in the control of *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) in laboratory.** 2017. 65f. Dissertation (Entomology Masters) – Entomology Postgraduate Program, Biology Institute, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2017.

Anastrepha fraterculus (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae) is one of the main pests found in South American fruit crops and it is of quarantine importance for other continents. Considering that the control is usually accomplished through chemical control, which may lead to environmental contamination, human health, social, and economic issues, it is necessary to establish alternative control techniques. The entomopathogen *Bacillus thuringiensis* has been used separately or in association with other control forms in Integrated Pest Management. In this context, the goal of this work was to verify the effects of such bacteria in controlling immature and adult subjects of the South American fruit fly. In order to do so, three varieties of *B. thuringiensis* var. were tested - *israelensis (Bti), kurstaki (Btk)* and *oswaldocruzi (Bto),* on three different concentrations ($2x10^7$, 10^8 and 10^9 UFC mL^{-1}) in the *A. fraterculus* immatures artificial diet and the effect was verified in larvae, pupae, and adults. A bacterial solution was added ($1x10^9$ UFC mL^{-1}) to three kinds of food attractants (Bioanastrepha 5%, peach syrup 50% and Ceratrap®). Results obtained in this study demonstrate that an increase in larval mortality occurs when greater concentrations of *Bto* are applied, with 81.26% efficiency. Ceratrap® mixed with *Bti* had 100% efficiency control in adult subjects during a seven-day period. It was concluded that the bacteria variety, which added to the artificial diet resulted in the most efficient immature subjects control was *Bto* and that the mixture of *Bti* and Ceratrap® provides 100% efficiency in adult control.

Keywords: Tephritidae, biological control, entomopathogenic, food attractants.

Lista de Figuras Artigo 1

Figura 1. Número de larvas normais (A) e deformadas/mortas (B) de 3° instar, pupas normais (C) e deformadas/mortas (D) de *Anastrepha fraterculus* em função dos isolados de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis (Bti), kurstaki (Btk) e oswaldocruzi (Bto) e testemunha (Tes), em diferentes concentrações. UFPel/RS, 2016/2017. 28

Figura 2. Número de adultos normais (A) e deformados/mortos (B), fêmeas (C) e machos (D) de *Anastrepha fraterculus* em função dos isolados de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis (Bti), kurstaki (Btk*) e *oswaldocruzi (Bto)* e testemunha (Test), em diferentes concentrações. UFPel/RS, 2016/2017. 29

Figura 3. Deformação de larva de 3º instar de *Anastrepha fraterculus* após o consumo de dieta artificial com solução bacteriana de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*). UFPel/RS, 2016/2017. 31

Figura 4. Deformação de pupa de *Anastrepha fraterculus* após o consumo na fase larval de dieta artificial com solução bacteriana de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*). UFPel/RS, 2016/2017. 32

Figura 5. Deformação de adulto de *Anastrepha fraterculus* após o consumo na fase larval de dieta artificial com solução bacteriana de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*). UFPel/RS, 2016/2017. 33

Figura 6. Deformação de adulto de *Anastrepha fraterculus* após o consumo na fase larval de dieta artificial com solução bacteriana de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*). UFPel/RS, 2016/2017. 33

Figura 7. Eficiência de controle (%) de adultos de *Anastrepha fraterculus* em função dos isolados de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis (Bti), kurstaki (Btk*) e *oswaldocruzi (Bto)* e testemunha (Test), em diferentes concentrações. UFPel/RS, 2016/2017.....35

Lista de Tabelas Artigo 1

Tabela 1. Número de larvas normais e deformadas/mortas de 3° instar, pupas normais e deformadas/mortas, adultos normais e deformados/mortos, machos, fêmeas de *Anastrepha fraterculus* e razão sexual em função de diferentes isolados nas concentrações de 10^7, 10^8 e10^9 UFC $2mL^{-1}$. UFPel/RS, 2015/16 UFC $2mL^{-1}$. UFPel/RS, 2015/2016. 26

Tabela 2. Eficiência de controle (%) de adultos de *Anastrepha fraterculus* em função de diferentes isolados nas concentrações de 10^7, 10^8 e 10^9 UFC $2mL^{-1}$. UFPel/RS, 2016/2017..... .34

Lista de Tabelas Artigo 2

Tabela 1. Mortalidade (%) dos adultos de *Anastrepha fraterculus* em função de diferentes atrativos a base de *Bacillus thuringiensis* aos 7 dias após o início do bioensaio. UFPel/RS, 2016/2017. 52

Tabela 2. Eficiência de controle (%) dos adultos de *Anastrepha fraterculus* em função de diferentes atrativos a base de *Bacillus thuringiensis* aos sete dias após o início do bioensaio. UFPel/RS, 2016/2017 52

Sumário

Artigo 1 - Potencial de controle de *Bacillus thuringiensis* a imaturos da mosca-das-frutas sul-americana em laboratório 18

ABSTRACT 19

RESUMO 20

Introdução 21

Material e Métodos 23

Criação de *Anastrepha fraterculus* 23

Cultivo de *Bacillus thuringiensis* 24

Bioensaio com dieta contendo *Bacillus thuringiensis* 24

Análise estatística 25

Resultados 26

Discussão 35

Referências Citadas 38

Artigo 2 - Mortalidade de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) com atrativos alimentares associados a *Bacillus thuringiensis* em laboratório ... 42

ABSTRACT 43

RESUMO 45

Introdução 46

Material e Métodos 48

Criação de *Anastrepha fraterculus* 48

Cultivo de *Bacillus thuringiensis* 49

Bioensaio com atrativos contendo *Bacillus thuringiensis* 49

Análise estatística 50

Resultados 51

Discussão 52

Referências Citadas 55

Considerações Finais 60

Introdução

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, com uma produção aproximadamente de 40 milhões de toneladas ao ano (AGRIANUAL, 2015). Os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina respondem por 72,5% das frutas de clima temperado produzidas no país (FACHINELLO et al., 2011), sendo que as principais culturas são a macieira [*Malus domestica* (Borkhausen, 1803)], o pessegueiro [*Prunus persicae* (Batsch, 1801)] e a videira [*Vitis vinifera* (L.)], as quais ocupam uma área de aproximadamente 100 mil hectares (IBGE, 2013).

As moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) representam um grande problema para produção de frutos e produtos hortícolas. Dentre elas destaca-se *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830), que possui distribuição do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina estando associada a 97 espécies de plantas hospedeiras nativas e exóticas de 20 famílias botânicas (ZUCCHI, 2014). Tais insetos acarretam perdas significativas à fruticultura mundial devido aos danos que causam aos frutos, e por serem consideradas pragas quarentenárias, limita o livre trânsito de frutas frescas pelas restrições impostas por medidas quarentenárias dos países importadores (WHITE; ÉLSON-HARRISI, 1992a; MALAVASI, 2000).

Os danos causados pelas moscas-das-frutas ocorrem devido à oviposição nos frutos e o consequente desenvolvimento das larvas em seu interior. A punctura feita pelas fêmeas e as galerias abertas pelas larvas na polpa dos frutos possibilitam a entrada de microrganismos fitopatogênicos. Desta forma, as perdas diretas são causadas pela diminuição da produção (frutos infestados caem precocemente ao chão), aumento no custo da produção (medidas de controle como aplicação de inseticidas, ensacamento, monitoramento populacional), menor valor da produção (frutos de baixa qualidade possuem menor valor comercial) e menor durabilidade (os frutos infestados com moscas-das-frutas apodrecem mais rapidamente). Além das perdas diretas à produção, essas pragas constituem-se no maior entrave

quarentenário para a exportação de frutos frescos para o Japão, Estados Unidos e países da União Europeia. Esses países são os principais consumidores e importadores frutícolas do mundo, mas impõem medidas fitossanitárias e tratamentos pós-colheita para frutos oriundos de países com comprovada ocorrência dessas espécies praga (MALAVASI, 2001).

Dentre as espécies de moscas-das-frutas presentes no Brasil, as que apresentam restrições quarentenárias para os países importadores são: *A. fraterculus*, *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835), *Anastrepha grandis* (Macquart, 1846), *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) e *Bactrocera carambolae* (Drew e Hancock, 1994) (MALAVASI; NASCIMENTO, 2003).

Na região Sul do Brasil, *A. fraterculus* representa a principal espécie capturada nos pomares, sendo a principal responsável por prejuízos às frutíferas temperadas (SALLES; KOVALESKI, 1990; SALLES, 1995; KOVALESKI, 1997; GARCIA; CORSEUIL, 1998; NORA; HICKEL; PRANDO, 2000; GARCIA; CAMPOS; CORSEUIL, 2003; GARCIA; LARA, 2006).

O controle de pragas na agricultura é um fator limitante e resulta no aumento do custo de produção, trazendo problemas tanto para o produtor quanto para o consumidor e o ambiente. O mercado mundial de agrotóxicos chega a valores próximos de US$1,8 bilhões, sendo os inseticidas e os acaricidas responsáveis por 30% do total. Os inseticidas à base de microrganismos entomopatogênicos ou bioinseticidas participam apenas de 1% do montante (ALMEIDA; BATISTA FILHO, 2001).

Nos pomares, a presença do inseto é detectada através do monitoramento, sendo as medidas de controle (emprego de isca tóxica e aplicações de inseticidas em cobertura) adotadas conforme o nível populacional, dando ênfase às áreas mais críticas dos pomares (BOTTON et al., 2012). Sabe-se que o uso frequente de agrotóxicos acarreta na redução populacional dos insetos benéficos, como polinizadores e entomófagos favorecendo o surgimento de pragas secundárias, além dos riscos de poluição do solo e lençol freático além da contaminação dos trabalhadores (NORRIS; CASWELL-CHEN; KOGAN, 2002). Além disso, propicia a contaminação dos alimentos, colocando em risco a saúde dos consumidores e dificultando as exportações (PARANHOS; WALDER; ALVARENGA, 2007).

Com o advento do Manejo Integrado de Pragas (MIP) na década de 50 e com o incremento de sua adoção nos últimos anos, houve uma mudança no controle de pragas, procurando manter a população de insetos-praga abaixo do nível de

controle, levando em conta aspectos econômicos, ecológicos e sociais. Para a implementação de novos programas de MIP no Brasil, principalmente na fruticultura é necessário que se conheçam não só as características biológicas das pragas, mas também como mantê-las em laboratório, para que estudos sejam realizados de forma contínua, sem a necessidade da ocorrência natural do inseto em condições de campo (NUNES, 2010).

A utilização de agentes entomopatogênicos no controle de insetos-praga merece destaque sendo uma alternativa viável na redução de populações de pragas. Dentre as vantagens apresentadas por estes microrganismos, podem ser citadas a especificidade pelo hospedeiro, a seletividade aos insetos benéficos, a inocuidade a animais endotérmicos e o fato de não poluírem o meio ambiente, além de apresentarem formas de resistência que aumentam a persistência no campo. Dentre os microrganismos patogênicos aos insetos encontram-se bactérias, vírus, fungos, nematoides, protozoários, rickétsias e mollicutes (ALVES, 1998).

Bacillus thuringiensis (Berliner, 1915) vem sendo utilizado separadamente ou associado a outras formas de controle no MIP. Dentro do gênero *Bacillus*, *B. thuringiensis* é considerada a espécie de maior interesse, pois é um entomopatógeno de várias ordens de insetos-praga da agricultura como Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, além de dípteros vetores de doenças humanas como os mosquitos do gênero *Culex*, *Aedes* e *Simulium* (MAAGD et al., 2003; CAVADOS et al., 2001).

Essa bactéria é encontrada naturalmente no solo além de outros substratos como superfícies ou endofíticos de plantas, produtos armazenados e insetos (AZEVEDO et al., 2001). Além de ser um entomopatógeno esporulante, sua característica marcante é a produção de corpos, denominados cristais. Esses cristais são formados por diferentes proteínas Cry, que por sua vez são sintetizadas pelos genes *cry* presentes nos isolados, os quais determinam o espectro inseticida dos mesmos (CRICKMORE et al.,1998; SCHENPF et al.,1998).

O modo de ação desse microrganismo está relacionado à solubilização das proteínas Cry no intestino dos insetos suscetíveis. Esse processo resulta na liberação de fragmentos tóxicos que se ligam a receptores específicos na membrana do epitélio intestinal levando a formação de poros e ao desequilíbrio osmótico da célula, fazendo com que o inseto pare de se alimentar, morrendo por inanição (AROSON; SHAI, 2001; BRAVO et al., 2002; FIUZA, 2004).

Os primeiros produtos inseticidas contendo subespécies de *B. thuringiensis* foram comercializados na França em 1930. Em 1995 mais de 180 produtos à base dessa bactéria foram registrados pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) nos Estados Unidos (SHELTON; ZHAO; ROUSCH, 2002). No Brasil Capalbo et al. (2005) mencionaram 15 formulados até o ano de 2003. Atualmente são comercializados cerca de 13 formulados à base de *Bt* para diversas culturas que possuem registro (AGROFIT, 2016). O produto à base de *Bt* com maior alcance no mercado mundial é o Dipel® (*Bt* Kurstaki HD-1) (GLARE e O'CALLAGHAN, 2000).

Em relação às moscas-das-frutas, o controle microbiano através de bactérias entomopatogênicas ainda não possui aplicação prática, estando restrito a fase de pesquisa. Sabe-se que *B. thuringiensis* Berliner 1715 é eficaz no controle do estágio larval de *Anastrepha ludens* (Loew, 1873) (ROBACKER et al. 1996). A b-exotoxina foi altamente tóxica para *A. ludens*, *Anastrepha obliqua* (Macquart) e *Anastrepha serpentina* (Wiedemann) causando alta deformidade em pupas, e em adultos foi constatado deformações em asas e abdome (TOLEDO et al. 1999), Além disso, *Bt* reduz a porcentagem de pupação e emergência para *Bactrocera oleae* (Gmelin) (NAVROZIDIS et al., 2000).

Neste contexto visa-se obter uma nova ferramenta tecnológica a partir de variedades de *B. thuringiensis* em diferentes concentrações para subsidiar estudos relacionados ao manejo da mosca-das-frutas sul-americana.

O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos de três variedades de *B. thuringiensis* sobre o desenvolvimento de imaturos e avaliar a mortalidade dos adultos de *A. fraterculus* associada a atrativos alimentares.

Artigo 1 - Journal of Economic Entomology

(Versão em Português)

Potencial de controle de *Bacillus thuringiensis* a imaturos da mosca-das-frutas sul-americana em laboratório

Liliane N. Martins, Ana Paula de S. Stori de Lara, Márcio S. Ferreira, Adrise M. Nunes, Fábio P. L. Leite, Flávio R. M. Garcia

Artigo 1 - Potencial de controle de *Bacillus thuringiensis* a imaturos da mosca-das-frutas sul-americana em laboratório

Liliane N. Martins[1], Ana Paula de S. Stori de Lara[2], Márcio S. Ferreira[1],

Adrise M. Nunes[3], Fábio P. L. Leite[4], Flávio R. M. Garcia[1]

[1]Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS 96160-000, Brasil

[2]Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 96160-000, Brasil

[3] Prefeitura Municipal de Pelotas, Secretaria de Qualidade Ambiental, Pelotas, RS, 96085-470, Brasil

[4]Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS 96160-000, Brasil

ABSTRACT

Fruit flies are considered the main pests in fruit crops worldwide. The control of such insects is mainly accomplished through synthetic insecticides, which may lead to producers and environmental contamination. *Bacillus thuringiensis* based bioinsecticides have been studied considering its specificity and selectivity, as well as been non-toxic to vertebrates. The goal of this work was to verify the efficiency of de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*), *kurstaki* (*Btk*) and *oswaldocruzi* (*Bto*) over the development of *Anastrepha fraterculus* immatures in laboratory. 2mL of bacterial suspension were applied in three different concentrations ($2x10^7$, 10^8 and 10^9 UFC mL^{-1}) of *Bt* varieties in the artificial diet for *A. fraterculus* immatures. 100 eggs of *A. fraterculus* were added to 300 mL of artificial diet in controlled conditions (25±1ºC, 75±10% RH and 12h photo phase). The 10^9 *Btk* concentration suspension presented the greatest larval mortality (46.25%). As for pupae and adults, the greatest mortality and deformation were verified at 10^8 and 10^7 *Btk* concentrations (33.80 and 15.75%), respectively, being that the greatest control efficiency was observed for 10^9 *Bto* concentration at 81.26%. It was thus concluded that *Bto* is more efficient in controlling *A. fraterculus* immature subjects.

Keywords: *Anastrepha fraterculus*, entomopathogens, biological control, pest insects.

RESUMO

As moscas-das-frutas são consideradas as principais pragas da fruticultura mundial. O controle destes insetos é realizado principalmente por meio de inseticidas sintéticos o que podem acarretar contaminação dos produtores e do meio ambiente. Os bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* vem sendo estudados considerando sua especificidade e seletividade, além de não serem tóxicos aos vertebrados. O objetivo deste estudo foi verificar a eficiência de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*), *kurstaki* (*Btk*) *e oswaldocruzi* (*Bto*) sobre o desenvolvimento de imaturos de *Anastrepha fraterculus* em laboratório. Foram aplicados 2 mL de suspensão bacteriana em três concentrações ($2x10^7$, 10^8 e 10^9 UFC mL^{-1}) das variedades de *Bt* em dieta artificial para imaturos de *A. fraterculus*. Foram adicionados 100 ovos de *A. fraterculus* sobre 300mL de dieta artificial em condições controladas (25±1ºC, 75±10% U.R. e fotofase de 12h). A suspensão de *Btk* na concentração 10^9 apresentou a maior mortalidade larval (46,25%). Já para pupas e adultos foi verificada maior mortalidade e deformação nas concentrações de 10^8 e 10^7 de *Bto* (33,80 e 15,75%), respectivamente, sendo que a maior eficiência de controle foi observada para *Bto* na concentração 10^9 de 81,26%. Conclui-se que *Bto* é mais eficiente no controle de imaturos de *A. fraterculus* .

Palavras-chave: *Anastrepha fraterculus*, entomopatógenos, controle biológico, inseto praga.

Introdução

As moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) são as principais pragas da fruticultura mundial. Além dos danos diretos causados pela punctura no momento da oviposição e consequente desenvolvimento larval, os danos indiretos aumentam o custo de produção devido ao emprego de produtos fitossanitários, monitoramento, mão de obra e depreciação dos frutos. Além disso, a presença do inseto-praga pode gerar restrições à importações em decorrência de medidas quarentenárias impostas pelos países importadores (Garcia 2009).

Uma das espécies que se destaca no continente americano é *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) que caracteriza-se como a principal espécie capturada nos pomares, sendo responsável por prejuízos às frutíferas de clima temperado (Garcia e Norrbom 2011, Nunes et al. 2012).

O controle populacional de *A. fraterculus* tem sido realizado através de iscas tóxicas a base de proteína hidrolisada associada a um inseticida. Os inseticidas podem acarretar problemas de contaminação ambiental, de saúde humana, além de problemas sociais e econômicos. No entanto, novas tecnologias estão sendo exploradas com intuito de diminuir os impactos ambientais e contribuir no manejo (Ribeiro 2010).

O uso abusivo e impróprio de inseticidas químicos sintéticos nos últimos 40 anos vem causando vários problemas ambientais e afetando diretamente a sustentabilidade de sistemas de produção agrícola. Entre estes problemas o que tem causado grande preocupação é o aparecimento de insetos resistentes, devido ao manejo inadequado realizado no controle dos mesmos. Neste contexto, a aplicação de *Bacillus thuringiensis* Berliner (1915) (*Bt*) surge como uma estratégia importante no controle de insetos (Schnepf et al. 1998), por se tratar de um produto com alto grau de especificidade e seletividade. É o principal princípio ativo biológico produzido e utilizado em todo o

mundo, como alternativa para os produtos químicos convencionais há mais de 60 anos (Romeis et al. 2006).

O uso de *B. thuringiensis* vem sendo utilizado separado ou associado a outras formas de controle no Manejo Integrado de Pragas (MIP). Durante a fase de esporulação, as bactérias sintetizam proteínas que se acumulam na periferia dos esporos na forma de cristais (Peferöen 1997). Estes cristais são compostos por uma ou várias proteínas Cry, também chamadas de δ-endotoxinas ou Insecticidal Crystal Proteins (ICPs) (Herrero et al. 2001, Siegel 2001).

Para que as proteínas Cry sejam efetivas, é necessário primeiramente que as larvas dos insetos suscetíveis ingiram os esporos e cristais de *B. thuringiensis.* Logo após, iniciam-se os sintomas: perda de apetite e abandono do alimento, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e finalmente a morte (Aronson et al. 1986, Schnepf et al. 1998, Fiuza 2010). As larvas infectadas por *B. thuringiensis* perdem sua agilidade e o tegumento adquire tonalidade de cor marrom-escura. Após a morte, a larva apresenta cor negra característica das infecções provocadas por este microrganismo (Habib e Andrade 1998, Bravo et al. 2007).

Esta técnica utilizando *Bt* vem sendo utilizada para o manejo de diversas espécies de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Himenoptera, além de dípteros vetores de doenças humanas como os mosquitos do gênero *Culex*, *Aedes* e *Simulium* (Cavados et al. 2001). A formulação da maior parte dos produtos existentes no mercado são baseados na variedade de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (Harrison e Bonning, 2000), *B. thuringiensis* subsp. i*sraelensis* e *B. thuringiensis* subsp. a*izawai*. Não existem formulações comerciais disponíveis à base da subsp. *oswaldocruzi*. Os produtos existentes têm como objetivo o controle de lagartas desfolhadoras.

A toxicidade de *B. thuringiensis* foi verificada para algumas espécies de moscas-das-frutas, 55 variedades foram testadas para o controle de *Anastrepha ludens* (Loew),

onde 5 variedades se mostraram mais tóxicas para adultos (Robacker et al. 1996). Martinez et al. 1997 utilizando *A. ludens* obteve uma mortalidade de 70-75% dos adultos alimentados com uma dieta de proteína mais açúcar e um isolado de uma amostra de solo da Guatemala. A b-exotoxina foi altamente tóxica para *A. ludens*, *Anastrepha obliqua* (Macquart) e *Anastrepha serpentina* (Wiedemann) causando alta deformidade em pupas, em adultos foi constatado deformações em asas e abdome (Toledo et al. 1999), Além disso, *Bt* reduz a porcentagem de pupação e emergência para *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Navrozidis et al., 2000). A atividade biológica de *Bt* foi eficiente em larvas e adultos de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Aboussaid et al. 2010). Não existem estudos sobre a eficiência de controle sobre nenhuma fase biológica de *A. fraterculus.*

Sendo assim, objetivou-se verificar a eficiência de *B. thuringiensis* var. *israelensis (Bti)*, *B. thuringiensis* var. *kurstaki (Btk)* e *B. thuringiensis* var. *oswaldocruzi (Bto)* sobre o desenvolvimento de imaturos de *A. fraterculus* em laboratório.

Material e Métodos

Criação de *Anastrepha fraterculus*. Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel na Universidade Federal de Pelotas, onde está estabelecida a criação de *A. fraterculus*. Os adultos foram mantidos em gaiolas (57x38,5x37,1cm), alimentados com dieta sólida à base de açúcar refinado, germe de trigo e levedura de cerveja (Bionis® BIONIS® YE MF e NS) na proporção de 3:1:1. Além do alimento foi fornecido algodão embebido com água destilada. Os ovos foram obtidos através de uma das laterais da gaiola, a qual possui um tecido tipo *voil* vermelho siliconado, onde as fêmeas ovipositavam. Os ovos foram coletados diariamente com o auxílio de jatos d'água, transferidos para Erlemeyer (500 mL), sendo então submetidos ao processo de aeração por um período de 24 horas à uma temperatura de 25°C. Depois deste período,

os ovos foram colocados em dieta artificial descrita por Salles (1992) e adaptada por Nunes et al. (2013).

Cultivo de *Bacillus thuringiensis*. Os isolados de *B. thuringiensis* são provenientes da bacterioteca do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da UFPel. A var. *israelensis (Bti),* é oriunda da coleção da Dra. Elizabeth W. Davidson, Arizona state University, USA, o *B. thuringiensis* var. *kurstaki (Btk*) foi isolado da coleção da UNISINOS, RS, Brasil e o *B. thuringiensis* var. *oswaldocruzi (Bto)* é proveniente do Instituto Pasteur. As bactérias foram recuperadas em meio de cultura BHI (infusão de cérebro e coração) e incubados a 28ºC, subcultivadas em balões de 1000mL de capacidade volumétrica contendo 200 mL de meio NYSM (Yousten 1984) e incubados em agitador orbital a 28 ºC a 150 rpm por 72 h. A esporulação foi verificada por microscopia. Quando aproximadamente 90% da cultura haviam esporulado, estas foram aquecidas a 80 ºC durante 15 minutos para eliminar as formas vegetativas. Em todas as culturas foi realizado a técnica de coloração de Gram e a concentração foi determinada por medição de UFC / mL em placas de Petry contendo meio BHI ágar. Em seguida, as culturas foram armazenadas sob refrigeração (4 ºC) para utilização nos bioensaios.

Bioensaio com dieta contendo *Bacillus thuringiensis.* O bioensaio foi mantido em câmara climatizada tipo BOD a 25±1ºC, 75±10% de U.R. e fotofase de 12h no Laboratório de Ecologia de Insetos do Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética da UFPel. O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado arranjado em esquema bifatorial, com cinco repetições. O fator de tratamento A testou os isolados (*Bti, Btk* e *Bto*), além da testemunha, que foi utilizada apenas água destilada e o fator B as concentrações dos isolados ($2x10^7$, 10^8 e 10^9 UFC mL^{-1}).

Cada unidade amostral foi composta por 100 ovos de *A. fraterculus* em 300 mL de dieta artificial descrita por Salles (1992) e adaptada por Nunes et al. (2013), sem adição

de Nipagim a 10%, com aplicação de 2 mL de suspensão bacteriana em três concentrações ($2x10^7$, 10^8 e 10^9 UFC mL^{-1}). Os ovos foram colocados sobre papel filtro em potes plásticos de 500mL. Após 10 dias, as larvas foram transferidas para vermiculita fina para a pupação. Os parâmetros avaliados foram número de larvas de 3° ínstar normais, pupas normais e adultos normais (aqueles considerados com tamanho, forma e coloração normal, de acordo com os padrões da criação) e deformadas/mortas (sendo observadas forma irregular, padrão de coloração escurecido (para larvas e pupas), sendo constata a morte das larvas ao tocar na mesma com o auxílio de um pincel de ponta fina e não ocorrer o estímulo), aos adultos foram observados padrões de deformação de abdômen e asa, ainda foram contabilizados os machos, fêmeas e razão sexual.

Análise estatística. Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, a independência dos resíduos por análise gráfica. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, os efeitos dos isolados foram comparados pelo teste de Waller-Duncan ($p \leq 0,05$), a comparação com a testemunha foi realizada pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) e as concentrações por modelos de regressão ($p \leq 0,05$): $y = y_o + ax$; $y = y_o + a/x$; $y = y_o + ax + bx^2$, onde: y = variável resposta; y_o = variável resposta correspondente ao ponto mínimo ou máximo da curva; a = valor máximo estimado para a variável resposta; b = declividade da curva; x = concentração do isolado. A seleção do modelo foi baseada no baixo resíduo; baixo p-valor; e, alto R^2 e R^2 adj. Os valores da mortalidade foram corrigidos utilizando a equação de Abbott (1925).

Resultados

As pressuposições do modelo matemático foram todas atendidas e não foi necessária a transformação de dados para todas as variáveis. Somente a variável razão sexual não apresentou significância para o efeito da interação (F = 0,30, *p* = 0,8787), nem para os efeitos principais de isolado (F = 1,46, *p* = 0,2447) e concentração (F = 2,79, *p* = 0,0748), para as demais variáveis ocorreu interação entre os fatores de tratamento testados (Tab. 1 e Fig. 1 e 2).

Tabela 1. Número de larvas normais e deformadas/mortas de 3° instar, pupas normais e deformadas/mortas, adultos normais e deformados/mortos, machos, fêmeas de *Anastrepha fraterculus* e razão sexual em função de diferentes isolados nas concentrações de 10^7, 10^8 e10^9 UFC 2mL^{-1}. UFPel/RS, 2015/16 UFC 2mL^{-1}. UFPel/RS, 2015/2016.

Isolados	Concentração (UFC 2mL^{-1})			
		10^7	10^8	10^9
	Nº de ovos	Número de larvas normais de 3° ínstar		
Testemunha[1/]	100	84,20±1,88	82,80±2,11	89,80±2,65
Bti	100	71,60±2,94 b[2/] *	73,50±5,71 a ns	49,67±6,33 a *
Btk	100	83,60±1,43 a ns	72,50±3,84 a ns	45,25±4,59 a *
Bto	100	71,20±2,51 b *	69,00±1,92 a *	38,50±2,10 a *
		Número de larvas deformadas/mortas de 3° ínstar		
Testemunha	100	1,60±0,51	0,00±0,00	0,00±0,00
Bti	100	8,80±1,56 a *	21,00±5,77 a *	3,00±0,84 c ns
Btk	100	10,20±0,73 a *	14,25±2,56 a *	46,25±3,77 a *
Bto	100	10,60±1,43 a *	19,20±2,61 a *	26,80±3,02 b *
		Número de pupas normais		
Testemunha		81,80±2,74	81,00±2,02	87,80±3,02
Bti		66,80±1,46 a *	62,50±5,17 a *	43,40±6,17 a *
Btk		72,60±2,58 a *	45,50±5,85 b *	38,50±2,99 ab*
Bto		67,60±2,54 a *	35,20±3,31 b *	22,25±4,42 b *
		Número de pupas deformadas/mortas		
Testemunha		2,40±0,98	1,80±0,73	2,00±0,55
Bti		2,00±1,15 b ns	7,75±1,65 c ns	8,67±2,03 b *
Btk		11,00±1,90 a *	26,00±3,49 b *	4,25±1,49 b ns
Bto		4,60±1,17 b ns	33,80±1,98 a *	18,25±0,85 a *
		Número de adultos normais		
Testemunha		81,00±3,02	79,20±2,18	85,80±2,67
Bti		58,40±2,54 a *	50,67±5,46 a *	36,20±6,64 a *
Btk		62,00±3,89 a *	39,50±5,56 ab*	31,75±1,97 ab*
Bto		53,80±1,98 a *	27,00±2,05 b *	16,50±2,10 b *

	Número de adultos deformados/mortos		
Testemunha	0,80±0,49	1,80±0,49	2,00±0,84
Bti	7,00±1,08 b *	7,60±0,51 a *	8,25±0,85 a *
Btk	9,25±1,03 b *	5,00±1,41 a ns	7,20±1,36 ab*
Bto	15,75±2,75 a *	6,75±2,17 a *	3,00±1,53 b ns
	Número de fêmeas		
Testemunha	45,80±1,07	39,00±1,31	58,60±4,46
Bti	30,33±1,76 a *	17,50±2,90 a *	21,67±0,67 a *
Btk	31,50±1,26 a *	14,80±2,42 a *	13,25±0,48 b *
Bto	23,00±1,52 b *	11,00±2,12 a *	7,40±1,57 c *
	Número de machos		
Testemunha	35,20±3,44	40,20±1,53	27,20±2,96
Bti	31,60±2,89 a ns	31,20±2,99 a ns	21,00±2,83 a ns
Btk	32,60±2,66 a ns	20,80±3,41 b *	18,50±1,66 a ns
Bto	30,80±1,02 a ns	16,00±1,55 b *	10,50±1,32 b *
	Razão sexual NS		
Testemunha	0,60±0,03	0,49±0,01	0,68±0,04
Bti	0,46±0,04	0,38±0,02	0,39±0,05
Btk	0,47±0,03	0,42±0,00	0,44±0,02
Bto	0,43±0,02	0,40±0,06	0,36±0,02

1/ Isolados de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis (Bti), kurstaki (Btk*) e *oswaldocruzi (Bto)* e testemunha, que correspondeu a água destilada. 2/ Médias (± erro padrão) acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Waller-Duncan ($p \leq 0,05$) comparando os isolados em cada concentração. *, ns Significativo e não significativo, respectivamente, em relação à testemunha pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). NS: não significância pelo teste F ($p \leq 0,05$) da análise de variância.

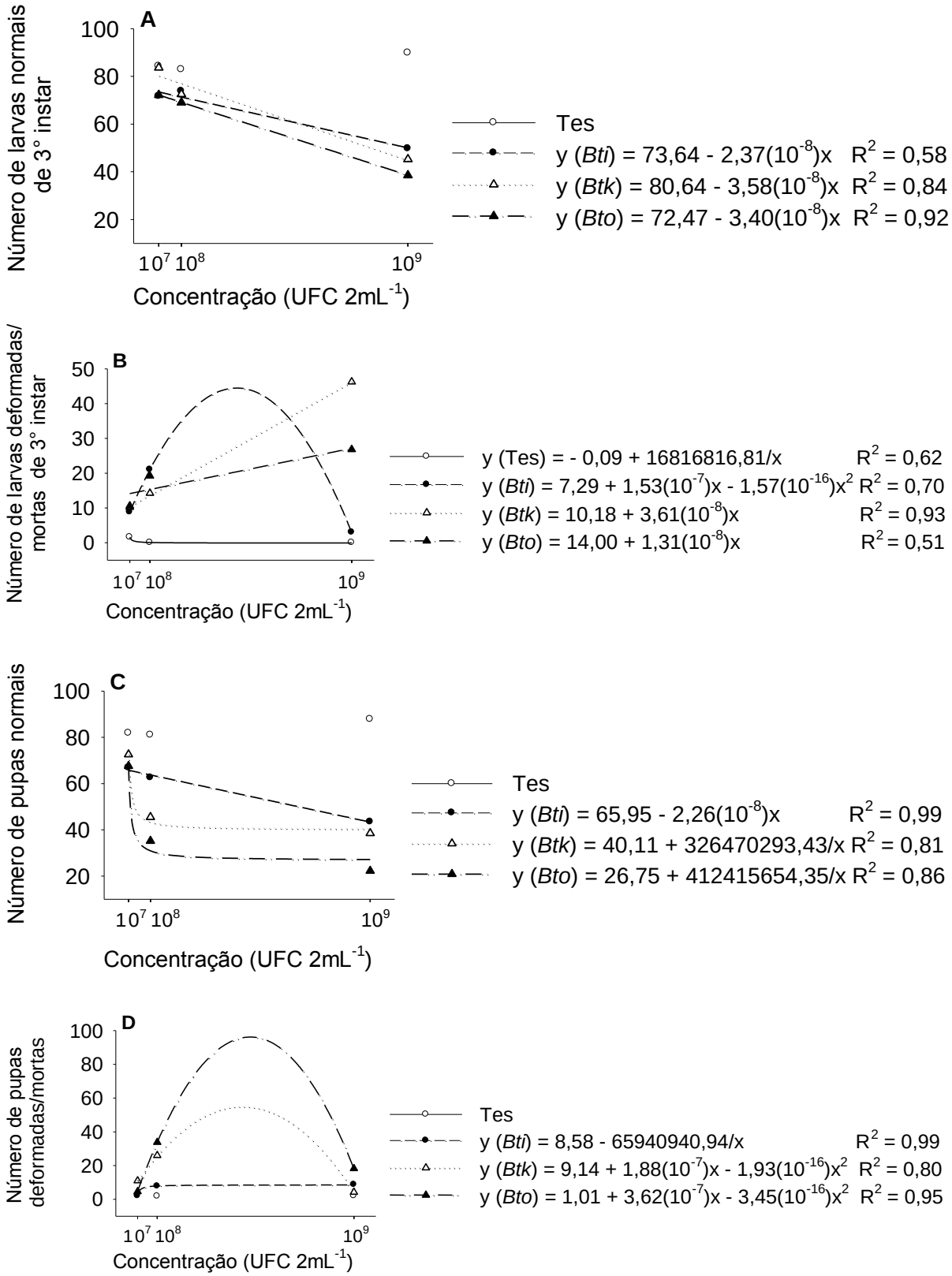

Figura 1. Número de larvas normais (A) e deformadas/mortas (B) de 3° instar, pupas normais (C) e deformadas/mortas (D) de *Anastrepha fraterculus* em função dos isolados de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis (Bti), kurstaki (Btk) e oswaldocruzi (Bto) e testemunha (Tes), em diferentes concentrações. UFPel/RS, 2016/2017.

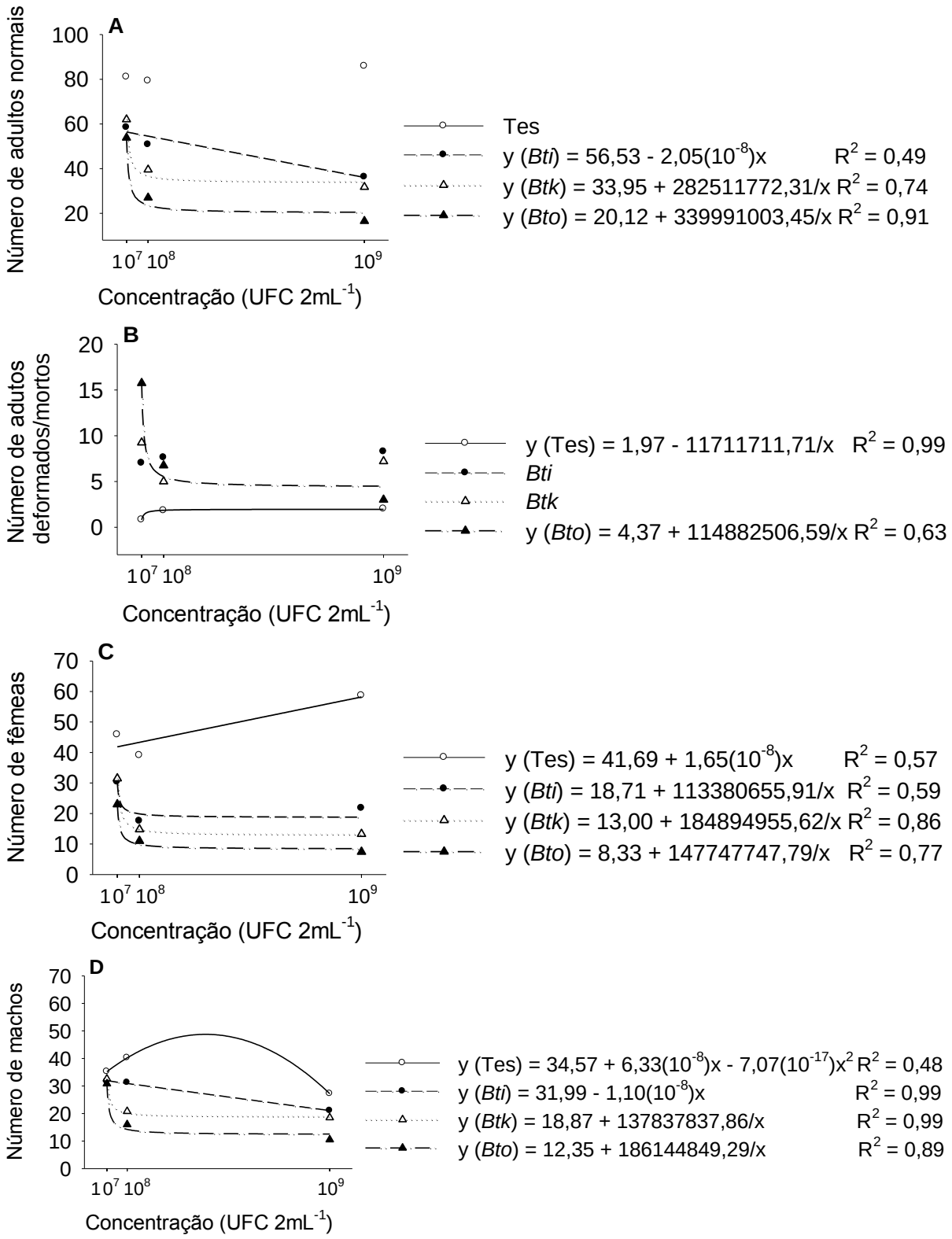

Figura 2. Número de adultos normais (A) e deformados/mortos (B), fêmeas (C) e machos (D) de *Anastrepha fraterculus* em função dos isolados de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis (Bti), kurstaki (Btk)* e *oswaldocruzi (Bto)* e testemunha (Test), em diferentes concentrações. UFPel/RS, 2016/2017.

Para número de larvas normais de 3° ínstar somente ocorreu diferença entre os isolados na concentração de 10^7 UFC $2mL^{-1}$, em que *Btk* caracterizou o maior número de larvas normais, diferindo de *Bti* e *Bto*. Na comparação com a testemunha, não foram verificadas diferenças para *Btk* na concentração de 10^7 UFC $2mL^{-1}$, e para *Bti* e *Btk* na concentração de 10^8 UFC $2mL^{-1}$ (Tab. 1).

Os dados de larvas normais de 3° ínstar ajustaram-se ao modelo de regressão linear para *Bti* (F = 13,5743, p = 0,0042), *Btk* (F = 58,2111, p < 0,0001) e *Bto* (F = 140,3776, p < 0,0001). Para testemunha não foi possível ajustar modelo de regressão (Fig. 1 A). Observaram-se decréscimos nos valores de larvas normais de 3° instar de 2,9 e 32,0% para o isolado *Bti*; 4,0 e 44,1% para *Btk*; e, 4,1 e 45,4% para *Bto* respectivamente, ao comparar 10^8 e 10^9 com 10^7 UFC $2mL^{-1}$.

Larvas deformadas/mortas de 3° instar os dados ajustaram-se ao modelo de regressão polinomial inverso de primeira ordem para testemunha (F = 20,9568, p = 0,0005), quadrático para *Bti* (F = 11,6111, p = 0,0025), e linear para *Btk* (F = 137,9987, p < 0,0001) e *Bto* (F = 13,5016, p < 0,0028) (Fig. 1 B). Larvas que ingeriram *Btk* na dieta artificial ao final do 3º instar antes da pupação apresentando tons escuros e tonalidades em marrom (Fig. 3).

Figura 3. Deformação de larva de 3º instar de *Anastrepha fraterculus* após o consumo de dieta artificial com solução bacteriana de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*). UFPel/RS, 2016/2017.

Pupas normais os dados ajustaram-se ao modelo de regressão linear para *Bti* (F = 119,5925, p = 0,05), e inverso de primeira ordem para *Btk* (F = 47,3488, p < 0,0001) e *Bto* (F = 75,4074, p < 0,0001). Para testemunha não foi possível ajustar modelo de regressão (Fig. 1 C).

Os dados referentes as pupas deformadas/mortas ajustaram-se ao modelo de regressão polinomial inverso de primeira ordem para *Bti* (F = 495,6496, p = 0,0286), e quadrático para *Btk* (F = 20,3980, p = 0,0003) e *Bto* (F = 102,2918, p < 0,0001). Para testemunha não foi possível ajustar modelo de regressão (Fig. 1 D). Pupas deformadas após as larvas serem retiradas da dieta artificial (Fig. 4)

Figura 4. Deformação de pupa de *Anastrepha fraterculus* após o consumo na fase larval de dieta artificial com solução bacteriana de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*). UFPel/RS, 2016/2017.

Em relação aos adultos normais os dados ajustaram-se ao modelo de regressão linear para *Bti* (F = 10,4483, p = 0,008), e inverso de primeira ordem para *Btk* (F = 31,3392, p = 0,0002) e *Bto* (F = 116,7467, p < 0,0001). Para testemunha não foi possível ajustar modelo de regressão (Fig. 2 A).

Os dados de número de adultos deformados/mortos ajustaram-se ao modelo de regressão polinomial inverso de primeira ordem para testemunha (F = 182,52, p = 0,04) e *Bto* (F = 15,3823, p = 0,035). Para *Bti* e *Btk* não foi possível ajustar modelo de regressão (Fig. 4 B). Deformações alares dos adultos de *A. fraterculus* após a emergência (Fig. 5 e 6).

Figura 5. Deformação de adulto de *Anastrepha fraterculus* após o consumo na fase larval de dieta artificial com solução bacteriana de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*). UFPel/RS, 2016/2017.

Figura 6. Deformação de adulto de *Anastrepha fraterculus* após o consumo na fase larval de dieta artificial com solução bacteriana de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*). UFPel/RS, 2016/2017.

O número de fêmeas ajustou-se ao modelo de regressão linear para testemunha (F = 16,9557, p = 0,0012), e inverso de primeira ordem para *Bti* (F = 11,3550, p = 0,0098), *Btk* (F = 66,8872, p < 0,0001) e *Bto* (F = 42,9168, p < 0,0001) (Figura 2 C). Já o número de machos ajustou-se ao modelo de regressão polinomial quadrático para testemunha (F = 5,6283, p = 0,0189), linear para *Bti* (F = 415,8949, p = 0,0312), e

inverso de primeira ordem para *Btk* (F = 201,5443, *p* = 0,0448) e *Bto* (F = 97,0027, *p* < 0,0001) (Fig. 2 D).

Para eficiência de controle todas as variedades estudadas foram significativas na comparação com a testemunha. No entanto *Bto* caracterizou-se como sendo a única a causar mortalidade acima de 80% para adultos da mosca-das-frutas sul-americana (Tab. 2).

Os dados de percentual de eficiência ajustaram-se adequadamente ao modelo de regressão linear para *Bti* (F = 12,0689, *p* = 0,0052), e inverso de primeira ordem para *Btk* (F = 17,9894, *p* = 0,0017) e *Bto* (F = 74,9557, *p* < 0,0001). Para testemunha não foi possível ajustar modelo de regressão (Fig. 7).

Tabela 2 - Eficiência de controle (%) de larva, pupa e adulto de *Anastrepha fraterculus* em função de diferentes isolados nas concentrações de 10^7, 10^8 e 10^9 UFC 2mL^{-1}. UFPel/RS, 2016/17

Isolados	Concentração (UFC 2mL^{-1})		
	10^7	10^8	10^9
	Eficiência de controle (%) de larva		
Testemunha [1/]	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Bti	14,97±2,87 a[2/] *	17,03±8,59 a *	42,27±7,91 a *
Btk	3,21±1,60 b ns	11,73±4,43 a ns	49,66±5,63 a *
Bto	14,14±3,12 a *	16,36±3,66 a *	58,09±2,50 a *
	Eficiência de controle (%) de pupa		
Testemunha	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Bti	18,13±1,90 a *	21,50±8,39 b *	50,12±7,54 b *
Btk	15,44±3,00 a *	43,23±7,11 a *	56,03±4,51 ab*
Bto	17,06±3,69 a *	56,25±4,71 a *	75,51±4,42 a *
	Eficiência de controle (%) de adulto		
Testemunha	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Bti	27,62±3,40 a *	36,66±6,67 b *	57,28±8,43 b *
Btk	28,60±4,99 a *	49,49±6,53 ab*	62,69±3,62 ab*
Bto	33,09±4,03 a *	65,84±2,71 a *	81,26±2,45 a *

[1/] Isolados de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis (Bti), kurstaki (Btk)* e *oswaldocruzi (Bto)* e testemunha, sem a presença da bactéria. [2/] Médias (± erro padrão) acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Waller-Duncan (p≤0,05) comparando os isolados em cada concentração.
* Significativo em relação à testemunha pelo teste de Dunnett (p≤0,05).

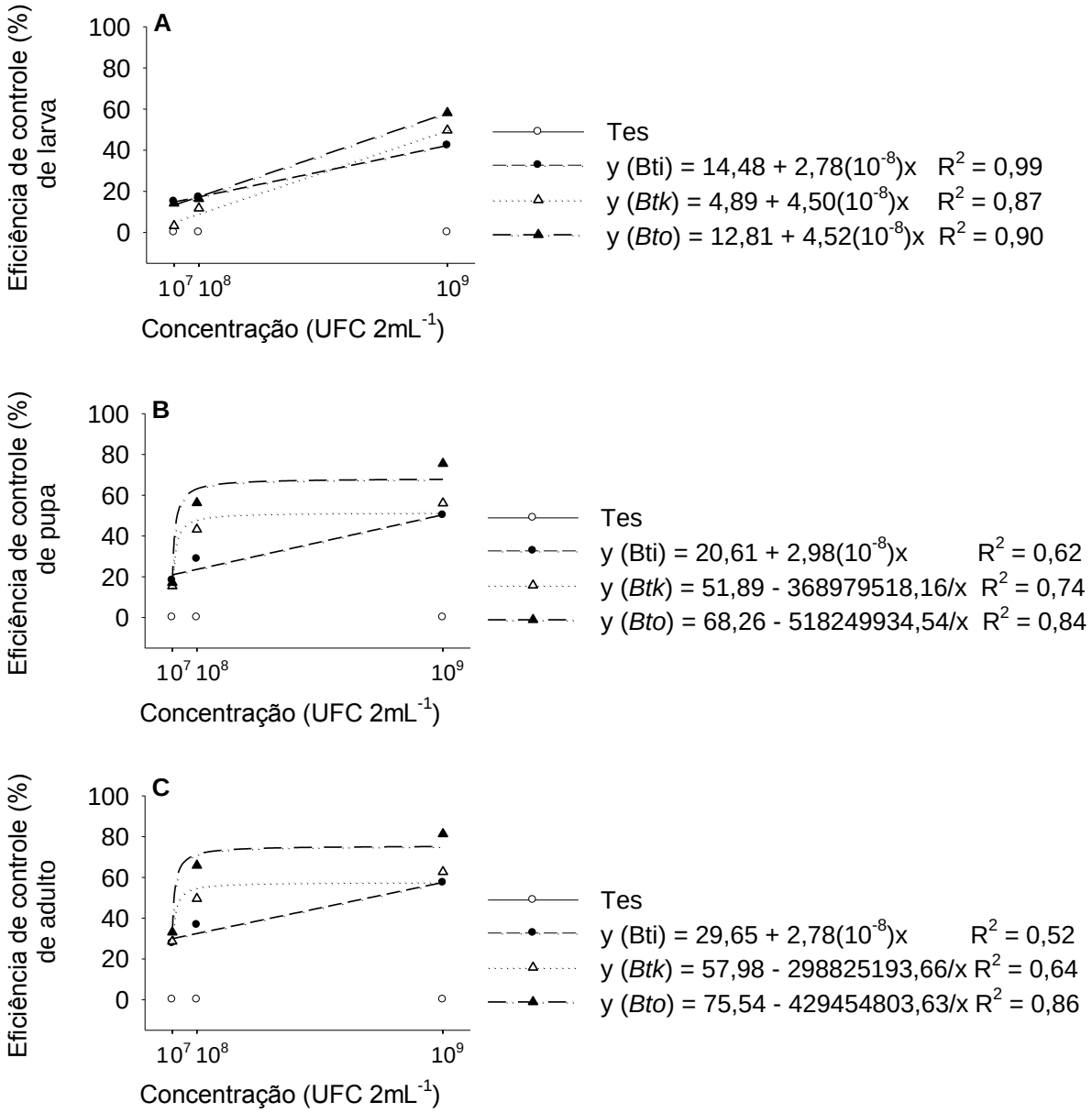

Figura 7 - Eficiência de controle (%) de larva (A), pupa (B) e adulto (C) de *Anastrepha fraterculus* em função dos isolados de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis (Bti), kurstaki (Btk*) e *oswaldocruzi (Bto)* e testemunha (Test), em diferentes concentrações. UFPel/RS, 2016/17.

Discussão

A susceptibilidade de larvas de dípteros como *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) e *Musca domestica* (Linnaeus, 1758), e larvas e adultos de *A. ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina*, *B. oleae* e *C. capitata* com diferentes tipos de bactérias entomopatogênicas tem sido demonstrado por diversos autores (Robacker et al. 1996, Martinez et al. 1997,Lonc et al. 1997, Toledo et al. 1999, Navrozidis et al.,

2000, Lonc et al. 2001, Johnson et al. 1998, Gough et al. 2002, Riu et al. 2006, 2011 Aboussaid et al. 2010). Zimmer et al. (2013), adicionaram suspensão bacteriana de *B. laterosporus*, *B. thuringiensis* var. *israelensis*, *B. thuringiensis* var. *Kurstaki*, e a formulação comercial composta de *Bacillus sphaericus* a uma concentração de $1x10^7$ x 10^8 e 10^9 CFU mL^1 em dieta artificial para imaturos de *M. domestica* e constataram que na concentração 10^9 ocorre maior ingestão de bactérias e consequentemente maior mortalidade.

No presente estudo observou-se que a maior mortalidade de larvas normais ocorreram na maior concentração 10^9 UFC $2mL^{-1}$ de suspensão bacteriana, logo na concentração 10^8 e 10^7 as médias foram semelhantes a testemunha (água destilada em sua composição na dieta) (Tab. 1).

As larvas deformadas/mortas no 3º ínstar se comportaram de forma diferente em relação as médias e o desvio padrão, a maior média na menor concentração foi observada com *Bto*, no entanto para a concentração 10^8 observamos a maior média para *Bti*, e para *Btk* na concentração 10^9. De modo geral para essa variável todas as médias tendem a aumentar conforme aumenta a concentração, logo *Bti* se comportou diferentemente das demais, reduzindo sua média na maior concentração. Obteve-se uma mortalidade de 46,25% de larvas com a aplicação de *Btk* assemelhando-se aos resultados obtidos por Robacker et al. (1996) com larvas de *A. ludens*. O efeito da variedade *Bti* para larvas mortas/deformadas nas concentrações de 10^7 e 10^9 foi o menor em relação a concentração 10^8 , demonstrando uma maior eficiência dessa variedade nesta concentração. Para *Bto* as médias e aumentaram de acordo com o aumento da concentração de bactérias na dieta.

A maior susceptibilidade de larvas de *M. domestica* em dietas que ingeriram maiores quantidades de bactérias, devido a uma maior concentração e com um tempo mais prolongado de exposição também foi verificado por Riu et al. (2006). A observação

do aumento da mortalidade em concentrações mais elevadas era esperada, visto que as larvas passaram todo o estágio larval ingerindo a dieta com suspensão bacteriana (Glare e O'callaghan 2000). As maiores mortalidades/deformações observadas para a concentração 10^9 foram para as *Btk* (Tab. 1).

Sabe-se que as larvas devem ingerir os esporos e cristais de *Bt* para que o efeito seja significativo. Após a ingestão os mesmos apresentam perda de apetite, paralisia do intestino, dentre outros sintomas, até que ocorra a morte (Aronson et al. 1986, Fiuza 2010). O tegumento dessas larvas apresentam tons escuros variando de marrom a preto, isso porque ao ingerir os esporos ocorre a solubilização dos cristais no intestino médio, liberando proteínas Cry, as toxinas são processadas, unem-se aos receptores de membrana até a formação de poro e citólise, provocando lesões no estágio larval (Bobrowski et al. 2003). Características semelhantes foram observadas na figura 2.

As pupas normais, ou seja, aquelas que apresentavam coloração e forma convencional foram separas e individualizadas. Nesta variável pode-se observar que houve diferença significativa para as todas as bactérias nas três concentrações em relação a testemunha. Podemos observar que houve redução da viabilidade nas fases de pupa e adulto de *A. fraterculus* (Tab. 1).

Deformações e mortalidade de pupas de dípteros às larvas que ingeriram *Bt*, também foram observadas por Gingrich e Eschle (1971). Toledo et al. (1999) observaram mortalidade/deformação de pupas de *A. obliqua* e *A. serpentina*. No presente estudo, pode-se observar deformações de pupas, as quais não houve emergência (Fig. 3). A maior porcentagem de controle (33,80%) de pupas foi observado para *Bto* na concentração de 10^8, ainda com esta mesma variedade podemos observar uma eficiência de controle acima de 80%, o que torna-se desejável o uso da mesma para futuras pesquisas para o MIP.

Após a emergência total foram observadas deformações diversas e dificuldade na emergência. As principais deformações foram observadas nas asas e abdome (Fig. 5 e 6), sugerindo baixa capacidade de dispersão e competição com indivíduos normais.

No presente estudo pode-se observar que as variedades de *Btk* e *Bto*, em diferentes concentrações são promissoras para integrar o manejo integrado na produção de frutos. No entanto uma maior eficiência na mortalidade é recomendado o uso de *Bto*, que apesar de se tratar de uma variedade pouco estudada tem potencial no controle de imaturos para acrescentar no MIP.

Referências Citadas

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology, 18:265-267.

Aboussaid, H. El-aouame, L. El-messoussi, S. Oufdou, K. 2010. Biological Activity of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) strains on larvae and adults of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera:Tephritidae). Journal of Environmental Protection, 1: 337-345.

Aronson, A. I. Beckman, W. Dunn, P. 1986 *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiological Review. 1: 1–24

Bravo, A. Gill, S.S. Soberón, M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control Toxicon, 49:423-435.

Bobrowski, V. L. Fiuza, L. Pasquali, G. Bodanese-Zanettini, M. 2003. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. Ciência Rural. 1:843-850.

Cavados, C.F.G. Fonseca, R.N. Chaves, J.Q. Rabinovitch, L. Araújo Coutinho,C. 2001. Identification of entomopathogenic *Bacillus* isolated from Simulium (Diptera: Simuliidae) larvae and adults. Memórias Instituto Oswaldo Cruz. 96: 1017-1021.

Fiuza, L. M. 2010. Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis*. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 38: 32-35.

Garcia, F.R.M. Corseuil, E. 1998. Análise faunística de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em pomares de pessegueiro em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Revista Brasileira de Zoologia. 15:1111-1117.

Garcia, F.R.M. 2009. Fruit fly: biological and ecological aspects. Em Bandeira RR (Ed.) Current Trends in Fruit Flies Control on Perennial Crops and Research Prospects. Transworld Research Network. Kerala. 1:35.

Garcia, F.R.M. Norrbom, A.L. 2011. Tephritoid f lies (Diptera, Tephritidea) and their plant hosts from the state of Santa Catarina in southern Brazil. Flórida Entomolology. 94: 151-157.

Gingrich, R. e Eschle, J. 1971. Susceptibility of Immature Horn Flies to Toxins of ***Bacillus thuringiensis*.** Journal of economic entomology. 1183-1188 .

Gough, J.M. Akhurst, R.J. Ellar, D.J. Kemp, D.H. and Wijffels, G.L. 2002. New isolates of *Bacillus thuringiensis* for control of livestock ectoparasites. Biological Control. 23: 179–189.

Habib, M.E.M e Andrade, C.E.S. 1998. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. Piracicaba: Fealq:383-446.

Harrison, R.L. e Bonning, B.C. 2000. Use of scorpion neurotoxins to improve the insecticidal activity of *Rachiplusia* ou multicapsid nucleopolyhedrovirus. Biological Control. 17: 191–201.

Herrero, S. Oppert, B. Ferré, J. 2001. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. Applied and Environmental Microbiology. 67:1085-1089.

Glare, T.R. e O'callagham, M. 2000. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley and Sons. 350p.

Johnson, C. Bishop, A. H. Turner, C. L. 1998. Isolation and activity of strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to larvae of the housefly (Diptera: Muscidae) and tropical blowflies (Diptera: Calliphoridae). Journal of Invertebrate Pathology. 71: 138-144.

Lonc, E. M. Lecadet, M. Lachowicz, T.M. Panek, E. 1997. Description of *Bacillus thuringiensis wratislaviensis* (H-47), a new serotype originating from Wroclaw (Poland), and other **Bt** soil isolates from the same area. Letters Applied Microbiology. 24**:**467-473.

Lonc, E. Doroszkiewicz,W. Klowden, M.J. Rydzanicz, K. Galgan, A. 2001. Entomopathogenic activities of environmental isolates of *Bacillus thuringiensis* against dipteran larvae. Journal Vector Ecolology. 26: 15–20.

Martinez, A. J. Robacker, D.C. Garcia, J.A. 1997. Toxicity of an isolate of *Bacillus thuringiensis* subspecies *darmstadiensis* to adults of the Mexican fruit ßy (Diptera:Tephritidae) in the laboratory. Journal of Economic Entomology. 90: 130-134.

Navrozidis, E. I. Vasara, E. Karamanlidou, G. Salpiggidis, G.K. Koliais, S. I. 2000. Biological Control of *Bactocera oleae* (Diptera: Tephritidae) Using a Greek *Bacillus thuringiensis* Isolate. Journal of Economic Entomology. 93: 1657-1666.

Nunes, A.M. Müller, F.A. Gonçalves, R.S. Garcia, M.S. Costa, V.A. Nava, D,E. 2012. Moscas frutívoras e seus parasitoides nos municípios de Pelotas e Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. Ciência Rural. 42: 6-12.

Nunes, A.M. Costa, K. Faggioni, K. Costa, M. Gonçalves, R. Walder, J. Garcia, M. Nava, D. 2013. Dietas artificiais para a criação de larvas e adultos da mosca-das-frutas sul-americana Pesquisa agropecuária brasileira. 48:1309-1314.

Ribeiro, L.G. 2010. Manejo das principais pragas da macieira no Brasil. Revista Agropecuária Catarinense. 23:149-157.

Ruiu, L. Satta, e A. Floris, I. 2006. Immature house fly (*Musca domestica*) control in breeding sites with a new *Brevibacillus laterosporus* formulation. Environmental Entomology. 37: 505-509.

Ruiu, L. Satta, A. Floris, I. 2011. Comparative applications of azadirachtin and *Brevibacillus laterosporus* based formulations for house fly management experiments in dairy farms. Journal Med. Entomology. *48*:345-350.

Robacker, C.D. Martinez, J.A. Garcia, A. J. Diaz, M. Romero, C. 1996. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). Biological and Microbial Control. 89:104-110.

Romeis, J. Meissle, M. Bigler, F. 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. Nature Biotechnology, New York, v: 63-71.

Schnepf, E. Crickmore, N. Van Rie, J. Lereclus, D. Baum, J. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology Molecular Biology Review 62:775–806.

Siegel, J. P. 2001.The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. Journal of Invertebrate Pathology, v: 13-21.

Peferöen, M. 1997. Progress and prospects for field use of *Bt* genes in crops. Trends in Biotechnology. 15:173- 177.

Toledo, J.Liedo,P.Williams,T. Ibarra, J. 1999. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* b-exotoxin to Three Species of Fruit Flies (Diptera: Tephritidae). Ecotoxicology. 92: 1052-1056.

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

Yousten, A.A. 1984. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. Adv Biotechnol Processes. 3:315-343.

Zimmer, C. Castro, L. Pires, S. Menezes, A. Ribeiro, P. Leivas Leite, F. 2013. Efficacy of entomopathogenic bacteria for control *of Musca domestica*. Journal of Invertebrate Pathology. v:241-244.

Artigo 2 - Journal of Economic Entomology

(Versão em Português)

Mortalidade de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) com atrativos alimentares associados a *Bacillus thuringiensis* em laboratório

Liliane N. Martins, Ana Paula de S. Stori de Lara, Márcio S. Ferreira, Adrise M. Nunes, Fábio P. L. Leite, Flávio R. M. Garcia

Artigo 2 - Mortalidade de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) com atrativos alimentares associados a *Bacillus thuringiensis* em laboratório

Liliane N. Martins[1], Ana Paula de S. Stori de Lara[2], Márcio S. Ferreira[1],

Adrise M. Nunes[3], Fábio P. L. Leite[4], Flávio R. M. Garcia[1]

[1]Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS 96160-000, Brasil

[2]Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS 96160-000, Brasil

[3] Prefeitura Municipal de Pelotas, Secretaria de Qualidade Ambiental, Pelotas, RS, 96085-470, Brasil

[4]Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS 96160-000, Brasil

ABSTRACT

The South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* is one of the main pests in fruit crops worldwide, and its control is mostly performed through toxic baits, which consist in the association of food attractants and synthetic insecticides. These phytosanitary products may lead to producer, consumer, and environment contamination. Therefore, the employment of *Bacillus thuringiensis* based bioinsecticides has been increasingly explored in order to replace synthetic insecticides, since they are more selective to non-target insects and harmless to vertebrates. The goal of this study was to evaluate the mortality of *A. fraterculus* adults, which consumed food attractants associated to three varieties of *B. thuringiensis. B. thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) *kurstaki* (*Btk*) and *oswaldocruzi* (*Bto*), varieties were tested in $1x10^9$ UFC mL^{-1} concentrations, as well as a control sample to which no bacteria was added. The evaluated attractants were 5% hydrolyzed corn protein, 50% peach syrup, and Ceratrap® (non-diluted). Twenty adult subjects were used for each sampling unity, 10 of which were males and 10 females, individually conditioned in plastic containers when ten days old. Baits were offered through sterilized Eppendorf vials perforated at the distal end, by which the insects were fed. Adult mortality was evaluated for a seven-day period counted from the start of consumption. Baits prepared with the Ceratrap® food attractant caused mortality to 100, 95 and 90% of subjects, associated to *Bti, Bto* and *Btk*, respectively. For baits prepared from corn hydrolyzed protein, mortality was observed in 90, 85 and 46.67% of the subjects after a seven-day period for *Bti, Bto* and *Btk*, respectively. When the food attractant was peach syrup, the greatest observed mortality was 66.67% for *Btk*. The use of toxic *B. thuringiensis* based baits was effective in the control of *A. fraterculus* adults. It was thus concluded that any of the *BT* varieties mixed with Ceratrap® attractant

presents a greatest efficiency in controlling *A. fraterculus* adults. Regarding hydrolyzed protein, *Bti* is the most suitable and if the available resource is peach syrup, *Btk* is more efficient in controlling *A. fraterculus* adults.

Keywords: South American fruit fly, pest insect, biological control, toxic bait, bioinsecticides.

RESUMO

A mosca-das-frutas sul-americana, *Anastrepha fraterculus* é uma das principais pragas da fruticultura mundial, e seu controle é realizado principalmente através do uso de iscas tóxicas, que consiste na associação de atrativos alimentares e inseticida sintético. Estes produtos fitossanitários podem acarretar contaminação de produtores, consumidores e do meio ambiente. Sendo assim o emprego de bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis* vem sendo cada vez mais explorados com o intuito de substituir os inseticidas sintéticos, uma vez que são mais seletivos a insetos não alvo e inócuos a vertebrados. O objetivo deste estudo foi avaliar a mortalidade de adultos de *A. fraterculus* que consumiram atrativos alimentares associados a três variedades de *B. thuringiensis.* As variedades testadas foram *B. thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) *kurstaki* (*Btk*) e *oswaldocruzi* (*Bto*), na concentração de $1x10^9$ UFC mL^{-1}, além da testemunha sem adição de bactéria. Os atrativos avaliados foram proteína hidrolisada de milho a 5%, calda de pêssego a 50% e Ceratrap® (sem diluição). Foram utilizados 20 adultos para cada unidade amostral, sendo 10 machos e 10 fêmeas, acondicionados individualmente com 10 dias de idade, acondicionados em potes plásticos. As iscas foram ofertadas através de recipiente plástico estéril tipo *eppendorf* perfurado na ponta distal, por onde os insetos foram alimentados. A mortalidade dos adultos foi avaliada por um período de sete dias a partir do início do consumo. As iscas preparadas a partir do atrativo alimentar Ceratrap® causou a mortalidade de 100, 95 e 90% dos indivíduos, associadas às variedades *Bti, Bto* e *Btk* respectivamente. Para as iscas preparadas a base de proteína hidrolisada de milho foram observadas mortalidade de 90, 85 e 46,67% dos indivíduos após sete dias, para *Bti, Bto* e *Btk* , respectivamente. Quando o atrativo alimentar utilizado foi calda de pêssego, a maior mortalidade observada foi de 66,67% com *Btk.* A utilização de iscas tóxicas a base de *B. thuringiensis* foi efetiva no controle de adultos de

A. fraterculus. Conclui-se qualquer uma das variedades de *Bt* em mistura do atrativo Ceratrap® apresenta uma maior eficiência no controle de adultos de *A. fraterculus*. Com relação a proteína hidrolisada, *Bti* é o mais indicado e se o recurso disponível for a calda de pêssego *Btk* é mais eficiente no controle de adultos de *A. fraterculus.*

Palavras chave: Mosca-das-frutas sul americana, inseto-praga, controle biológico, isca-tóxica, bioinseticidas.

Introdução

A mosca-das-frutas sul-americana *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann 1830) (Diptera: Tephritidae) é a principal praga das frutíferas de clima temperado (Garcia 2009, Bortoli et al. 2016). O controle desse tefritídeo ocorre por meio do emprego de iscas tóxicas (Harter et al. 2015). No entanto, o uso indiscriminado de agrotóxicos no controle de moscas-das-frutas pode ocasionar desequilíbrios ecológicos, desencadeando o surgimento de populações resistentes e eliminando os inimigos naturais, além de acarretar a contaminação humana e do meio ambiente (Bortoli et al. 2016).

Através do uso de iscas tóxicas é possível reduzir a infestação dos adultos que migram para o interior dos pomares. *A. fraterculus* possui alto potencial de danos aos frutos, pois as fêmeas depositam seus ovos nos frutos e as larvas abrem galerias, abrindo porta para a entrada de patógenos e causando a queda precoce dos frutos (Garcia 2009). Se medidas fitossanitárias não forem tomadas pelos produtores as perdas podem atingir até 100% da produção (Rupp et al. 2006).

As proteínas hidrolisadas e Torula ® Levedura, estão entre os principais produtos disponíveis no mercado para monitorar moscas nos pomares, porém atrativos açucarados associados a inseticidas servem como forma de controle de moscas em

pomares (Raga et al. 2006, Scoz et al. 2006, Monteiro et al. 2007, Pogerre 2007, Azevedo et al. 2012, Bortoli et al. 2016). Além destes atrativos, são comumente utilizados sucos de frutas, Ceratrap®, e soluções aquosas de glicose invertida a 10% em estudos de fauna e dinâmica populacional de espécies de moscas-das-frutas (Garcia et al. 1999, 2003, Zilli e Garcia 2010, Machota Jr et al. 2013).

Os programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) em fruticultura têm incentivado o uso de vários métodos de controle, como os culturais, uso de atrativos, resistência varietal e principalmente, o controle biológico, que deve ser utilizado com o intuito de reduzir a densidade populacional das moscas-das-frutas e favorecer o aumento da população de seus inimigos naturais (Carvalho et al. 2000).

O controle biológico através da utilização de agentes entomopatogênicos no controle de insetos-praga merece destaque, visto que os agentes entomopatógenos apresentam maior especificidade ao hospedeiro e menor impacto ao meio ambiente. Os bioinseticidas à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae) (*Bt*) são responsáveis por mais de 90% dos produtos formulados dessa categoria no mundo (Polanczyk e Alves 2003).

A espécie *B. thuringiensis* é encontrada naturalmente no solo e também em outros substratos como superfícies ou endofíticos de plantas, produtos armazenados e insetos (Azevedo et al. 2000). É um entomopatógeno esporulante, que produz corpos denominados cristais. Esses cristais são formados por diferentes proteínas Cry, que por sua vez são sintetizadas pelos genes *cry* presentes nos isolados, os quais determinam o espectro inseticida dos mesmos, Höfte e Whitheley (1989), Crickmore et al. (1998), Schenpf et al. (1998). Estas bactérias atuam no intestino médio dos insetos, em um processo que resulta na liberação de fragmentos tóxicos que se ligam a receptores específicos na membrana do epitélio intestinal levando a formação de poros e ao

desequilíbrio osmótico da célula (Aroson e Shai 2001, Bravo et al. 2007, Fiuza 2004). Em decorrência desse efeito o inseto inibe sua alimentação e, consequentemente, morre.

A toxicidade de *B. thuringiensis* foi verificada para algumas espécies de moscas-das-frutas, 55 variedades foram testadas para o controle de *Anastrepha ludens* (Loew), onde 5 variedades se mostraram mais tóxicas para adultos (Robacker et al. 1996). Martinez et al. (1997) utilizando *A. ludens* obteve uma mortalidade de 70-75% dos adultos alimentados com uma dieta de proteína mais açúcar e um isolado de uma amostra de solo da Guatemala. A b-exotoxina foi altamente tóxica para *A. ludens*, *Anastrepha obliqua* (Macquart) e *Anastrepha serpentina* (Wiedemann) causando alta deformidade em pupas, em adultos foi constatado deformações em asas e abdome (Toledo et al. 1999), Além disso, *Bt* reduz a porcentagem de pupação e emergência para *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Navrozidis et al., 2000). A atividade biológica de *Bt* foi eficiente em larvas e adultos de *Ceratitis capitata* Wiedemann) (Aboussaid et al. 2010). Não existem estudos sobre a eficiência de *B. thuringiensis* no controle de *A. fraterculus.*

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a mortalidade dos adultos de *A. fraterculus* após o consumo de atrativos alimentares associados a três variedades de *B. thuringiensis.*

Material e Métodos

Criação de *Anastrepha fraterculus*. Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel na Universidade Federal de Pelotas, onde está estabelecida a criação de *A. fraterculus*. Os adultos foram mantidos em gaiolas (57x38,5x37,1cm), alimentados com dieta sólida à base de açúcar refinado, germe de trigo e levedura de cerveja (Bionis® BIONIS® YE MF e NS) na proporção de 3:1:1. Além do alimento foi fornecido algodão embebido com água destilada. Os ovos foram obtidos através de uma

das laterais da gaiola, a qual possui um tecido tipo *voil* vermelho siliconado, onde as fêmeas ovipositavam. Os ovos foram coletados diariamente com o auxílio de jatos d'água, transferidos para Erlemeyer (500 mL), sendo então submetidos ao processo de aeração por um período de 24 horas à uma temperatura de 25°C. Depois deste período, os ovos foram colocados em dieta artificial descrita por Salles (1992) e adaptada por Nunes et al. (2013).

Cultivo de *Bacillus thuringiensis*. Os isolados de *B. thuringiensis* são provenientes da bacterioteca do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da UFPel. A var. *israelensis (Bti),* é oriunda da coleção da Dra. Elizabeth W. Davidson, Arizona state University, USA, o *B. thuringiensis* var. *kurstaki (Btk*) foi isolado da coleção da UNISINOS, RS, Brasil e o *B. thuringiensis* var. *oswaldocruzi (Bto)* é proveniente do Instituto Pasteur. As bactérias foram recuperadas em meio de cultura BHI (infusão de cérebro e coração) e incubados a 28ºC, subcultivadas em balões de 1000mL de capacidade volumétrica contendo 200 mL de meio NYSM (Yousten 1984) e incubados em agitador orbital a 28 ºC a 150 rpm por 72 h. A esporulação foi verificada por microscopia. Quando aproximadamente 90% da cultura haviam esporulado, estas foram aquecidas a 80 ºC durante 15 minutos para eliminar as formas vegetativas. Em todas as culturas foi realizado a técnica de coloração de Gram e a concentração foi determinada por medição de UFC / mL em placas de Petry contendo meio BHI ágar. Em seguida, as culturas foram armazenadas sob refrigeração (4 ºC) para utilização nos bioensaios.

Bioensaio com atrativos contendo *Bacillus thuringiensis.* O bioensaio foi mantido em sala climatizada a temperatura de 25±2ºC, 75±10% de U.R. e fotofase de 12h. O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado arranjado em esquema bifatorial, com 20 repetições. O fator de tratamento A testou as variedades (*Bti, Btk e Bto*), além da testemunha, na qual nenhum tipo de bactéria foi

adicionado, utilizando apenas os atrativos; e o fator B testou os atrativos [proteína hidrolisada de milho (Bioanastrepha®) a 5% com pH inicial de 5.0, calda de pêssego a 50%, com pH inicial de 3.0 e Ceratrap® (não diluído) com pH de 8.0]. A concentração utilizada dos isolados foi de $1x10^9$ UFC mL^{-1}.

A unidade amostral foi composta por 20 adultos de *A. fraterculus*, sendo 10 machos e 10 fêmeas, com 10 dias de idade, os quais foram acondicionados individualmente em recipientes plásticos de 100 mL perfurados lateralmente. Em cada recipiente foi acoplado um *eppendorf* estéril contendo o atrativo e, na parte distal foi feita uma perfuração que permitiu o acesso do alimento aos insetos. Os atrativos tiveram seu pH ajustado para 7.0 com o auxílio de ácidos e bases e os insetos permaneceram sem alimento por período de 12 horas antes do início dos testes. A variável analisada foi a mortalidade de *A. fraterculus*, verificada diariamente e expressa em percentual. Foi contabilizado os insetos que morreram até o 7º dia após início do bioensaio.

Análise estatística. Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, a independência dos resíduos por análise gráfica. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, os efeitos dos isolados e atrativos foram comparados pelo teste de Waller-Duncan ($p \leq 0,05$); e, a comparação com a testemunha foi realizada pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). Os valores da mortalidade foram corrigidos utilizando a fórmula de Abbott (1925).

Resultados

As pressuposições do modelo matemático foram todas atendidas e não foi necessária a transformação de dados. A mortalidade de adultos de *A. fraterculus* apresentou interação entre os fatores de tratamento testados (F = 2,63, *p* = 0,0359). Somente foram verificadas diferenças entre os isolados na proteína hidrolisada a 5%, em que os maiores percentuais de mortalidade foram nos isolados *Bti* e *Bto*, que não diferiram entre si. Na comparação dos atrativos, no isolado *Bti*, a proteína hidrolisada a 5% e o Ceratrap® não diferiram entre si e caracterizaram as maiores mortalidades. Esse mesmo comportamento foi observado para *Bto*. Em relação à testemunha, não foram constatadas diferenças, somente no atrativo a base de calda de pêssego a 50%, para os isolados *Bti* e *Bto* (Tab. 1).

Tabela 1. Mortalidade (%) dos adultos de *Anastrepha fraterculus* em função de diferentes atrativos a base de *Bacillus thuringiensis* aos 7 dias após o início do bioensaio. UFPel/RS, 2016/2017.

Isolados	Atrativos		
	Proteína hidrolisada a 5%	Calda de pêssego a 50%	Ceratrap®
	Mortalidade (%)		
Testemunha[1/]	10,00±5,77	0,00±0,00	33,33±6,67
Bti	90,00±5,77 aA[2/] *	40,00±11,55 aB ns	100,00±0,00 aA *
Btk	46,67±13,33 bA *	66,67±24,04 aA *	90,00±5,77 aA *
Bto	85,00±9,57 aA *	53,33±6,67 aB ns	95,00±5,00 aA *

[1/] Isolados de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis (Bti), kurstaki (Btk*) e *oswaldocruzi (Bto)* e testemunha, sem a presença da bactéria. [2/] Médias (± erro padrão) acompanhadas por mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Waller-Duncan (p≤0,05) comparando os isolados em cada atrativo e os atrativos em cada isolado, respectivamente. *, ns Significativo e não significativo, respectivamente, em relação à testemunha pelo teste de Dunnett (p≤0,05).

Para eficiência de controle todas as variedades estudadas foram significativas na comparação com a testemunha, exceto *Btk* misturada a proteína hidrolisada. Ceratrap® foi o atrativo utilizado que teve uma maior eficiência de mortalidade em relação as três variedades de bactérias em estudo, chegando a 100% de sua eficiência misturando o mesmo a variedade *Bti* (Tab. 2).

Tabela 2. Eficiência de controle (%) dos adultos de *Anastrepha fraterculus* em função de diferentes atrativos a base de *Bacillus thuringiensis* aos sete dias após o início do bioensaio. UFPel/RS, 2016/2017

Isolados	Atrativos		
	Proteína hidrolisada a 5%	Calda de pêssego a 50%	Ceratrap®
	Eficiência de controle (%)		
Testemunha[1/]	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Bti	88,75±6,57 aA *	50,00±10,00 aB *	100,00±0,00 aA *
Btk	36,67±18,56 bA ns	90,00±10,00 aA *	80,55±10,01 aA *
Bto	81,25±11,97 aA *	50,00±10,00 aA *	91,67±8,33 aA *

[1/] Isolados de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis (Bti), kurstaki (Btk*) e *oswaldocruzi (Bto)* e testemunha, sem a presença da bactéria. [2/] Médias (± erro padrão) acompanhadas por mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Waller-Duncan (p≤0,05) comparando os isolados em cada atrativo e os atrativos em cada isolado, respectivamente. *, ns Significativo e não significativo, respectivamente, em relação à testemunha pelo teste de Dunnett (p≤0,05).

Discussão

O uso de iscas tóxicas tem sido uma alternativa importante para a supressão populacional de adultos de moscas-das-frutas (Harter et al. 2015). Neste estudo observamos que durante o período de sete dias de avaliação o *Bt* sendo substituído por inseticidas foi eficaz no controle dos adultos, observamos também que o tipo de atrativo e a bactéria influenciaram nos resultados.

Os insetos utilizados neste bioensaio possuíam 10 dias de idade, diferentemente de Martinez et al. (1997) que utilizaram adultos de 2-4 dias, com avaliação da toxicidade dos isolados até os 21 dias. No nosso estudo não foi preciso avaliar mais do que sete dias, devido ao alto índice de mortalidade observado neste período.

A proteína hidrolisada é comumente utilizada por agricultores essa fonte de açúcar é bastante utilizada para atrair os insetos e também pode ser associada para captura massal de *A. fraterculus* (Bortoli et al. 2016). No presente estudo esse atrativo demonstrou ser uma excelente isca tóxica associada à *Bti* e *Bto* causando mais de 85% de mortalidade (Tab. 1).

Com relação ao atrativo calda de pêssego, essa foi utilizada em substituição de alguns sucos de frutas. Os resultados demonstraram que a calda de pêssego é menos atraente para as moscas em relação aos demais atrativos, mas causou a mortalidade de 50% dos indivíduos estando associada ao *Bto* e ao *Btk*. Azevedo et al. (2012), demonstraram alto potencial em sucos de frutas para atrair moscas, o que facilita a logística para produtores, pois os mesmos podem ser fabricados e adquiridos na própria localidade.

O produto comercial Ceratrap® é empregado como atrativo alimentar no sistema de controle conhecido como "atrai e mata". Sendo assim, é geralmente utilizado isoladamente em armadilhas dispostas nos pomares. Sua eficiência foi comprovada por Bortoli et al. (2016). No entanto, sua utilização consorciada a diferentes variedades de *Bt* não causou decréscimo na sua eficiência, podendo ser uma alternativa para potencializar sua ação.

Assim que os insetos ingerem o substrato alimentar contendo as endotoxinas presentes nos cristais dos *Bt*'s, ocorre a solubilização desses cristais no trato digestivo do inseto causando lise osmótica por meio da formação de poros na membrana (Fiuza et al. 1996; Schnepf et al. 1998). Tais eventos conduzem a morte dos insetos por inanição e septicemia (Dai e Gill 1993, Monnerat e Bravo 2000). A solubilização das proteínas depende de pH alcalino, motivo pelo qual o pH dos atrativos alimentares foi ajustado para o perfeito funcionamento das bactérias no trato digestivo dos insetos.

Aboussaid et al. (2010) utilizaram 26 cepas de *Bt*, e verificaram que 100% eram tóxicas para adultos de *C. capitata.* Em trabalho semelhante realizado por Gingrich (1991) foram utilizadas 90 cepas de *Bt,* as quais 80% apresentaram toxicidade sobre adultos da mesma espécie. No entanto, a maioria das cepas testadas não são passíveis de utilização na agricultura, uma vez que apresentam alta toxicidade aos vertebrados, as

variedades utilizadas no nosso estudo não apresentam b-exotoxina, esta possui ação tóxica para vertebrados.

No presente estudo foi evidenciada a eficiência das iscas, quando associadas às diferentes variedades de *Bt.* A variedade *israelenses*, adicionada à proteína hidrolisada de milho causou alta mortalidade de adultos de *A. fraterculus*. Hassani e Benyelles (2008) observaram que além de causar mortalidade, a ingestão dessa variedade de *Bt* também diminuiu a longevidade de adultos de *C. capitata* em 84%.

Com relação à variedade *kurstaki* foi observada uma eficiência acima de 90% em associada ao atrativo Ceratrap®. Essa variedade possui toxicidade a insetos da ordem Lepidóptera e é comumente utilizada na agricultura, de modo que já existem produtos formulados no mercado (Monteiro e Souza 2010).

A variedade *oswaldocruzi* causou mortalidade acima de 50% nos três tipos de atrativos alimentares testados. No entanto, através dos resultados obtidos no presente estudo, demonstrou efeito tóxico sobre adultos de *A. fraterculus* e potencialmente pode vir a integrar um programa de manejo da mosca-das-frutas sul-americana.

Molina et al. (2010) testaram 115 para *C. capitata* variedades entre isolados comerciais e novas culturas, estas cepas causaram 68-94% de mortalidade para larvas. Nos trabalhos onde 80% de mortalidade foram identificados, destacam-se Karamanlidou et al. (1991) e Yamvrias e Anagnou (1989), contudo, esses testes foram eficientes apenas para larvas de Tephritidae, os resultados que ficaram entre 65-80% foram eficientes apenas com 10 dias ou mais de exposição aos testes.

Na maioria dos trabalhos os testes são realizados com larvas, porém as pesquisas restringe-se ao laboratório visto que é difícil chegar nas larvas pois as mesmas encontram-se no interior dos frutos, logo o foco devem ser os adultos, pois reduzindo a população de adultos consequentemente irá diminuir o dano nos frutos, diminuindo as

perdas, visto que as larvas que causam a depreciação dos frutos cavam galerias ficando de difícil acesso das mesmas com o meio externo.

Todos os trabalhos que utilizaram adultos nos bioensaios associados a *Bt* utilizaram fontes de carboidrato, açúcares em geral e até mesmo dietas sintéticas utilizadas na criação das moscas (Robacker et al. 1996, Martinez et al. 1997). No entanto, o uso de atrativos formulados comercialmente e iscas comumente utilizadas na agricultura ainda não haviam sido testadas.

Poucas variedades de *Bt* foram testadas em espécies de Tephritidae em relação à ordem Díptera, em que mais de 53 toxinas já foram isoladas e testadas em 23 espécies (Frankenhuyzen 2009). Sendo assim, são necessários mais estudos com diferentes variedades e toxinas a fim de encontrar uma variedade que cause uma maior mortalidade em um menor tempo, e assim contribuir nos estudos de manejo integrado de pragas.

Deste modo, é indicado para controlar *A. fraterculus* com uma eficiência de controle acima de 80% em um período de sete dias, o uso de Ceratrap® associado as três variedades de *Bt* utilizadas no bioensaio (*Bti*, *Btk* e *Bto*), da proteína hidrolisada com *Bti* e *Bto*, assim como calda de pêssego com *Btk*.

Referências Citadas

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology, 18:265-267.

Aboussaid, H. El-aouame, L. El-messoussi, S. Oufdou, K. 2010. Biological Activity of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) strains on larvae and adults of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera:Tephritidae). Journal of Environmental Protection, 1: 337-345.

AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit> . Acesso em: 26 jan. 2017.

Aronson, AI. Shai, Y. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. FEMS Microbiol Letters. 195:1–8.

Azevedo, J.L. Maccheroni JR, W. Pereira, J.O. Araújo, W.L. 2000.Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electronic Journal of Biotechnology, v.3.

Azevedo, F.R. Gurgel, L.S. Santos, M.L.L. Silva, F.B. Moura, M.A.R. Nere, D.R. 2012.Eficácia de armadilhas e atrativos alimentares alternativos na captura de moscas-das-frutas em pomar de goiaba. Arquivos do Instituto Biológico. 79:343–352.

Bortoli, L.C. Machota Jr, R. Garcia, F.R.M. Botton, M. 2016. Evaluation of food lures for fruit flies (Diptera:Tephritidae) captured in a citrus orchard of the Serra Gaúcha. Florida Entomologist. 99:3.

Bravo, A. Sarabia, S. Lopez, L. Ontiveros, H. Abarca, C. Ortiz, A. Ortiz, M. Lina, L. Villa-lobos, F.J. Guadalupe, P. Nunez-valdez, M.E. Soberón, M. Quintero, R. 2002. Characterization of *cry* genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. Applied and Environmental Microbiology. 64:4965-4972.

Carvalho, R. S. Nascimento, A. S. Matrangolo, W. J. R. 2000.Controle biológico. In: Malavasi, A. Zucchi, R. A. (Eds.) Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Ed. Holos.113-117.

Crickmore, N. Zeigler, D.R. Feitelson, J. Schnepf, E. Van Rie, J. Lerecus, D. Baum, J. Dean, D.H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal protein. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 807-813.

Daí, S.M. e Gill, S.S. 1993. In vitro and in vivo proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* CRYIVD protein by *Cullex quinquefasciatus* larval midgut proteases. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 23: 273-283.

Fiuza, L.M. 1996. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of Chilo suppressalis (Lepidoptera:Pyralidea): evidence of shared binding sites. Applied and Environmental Microbiology. 62:1544-1549.

Fiuza, L. M. 2004. Receptores de *Bacillus thuringiensis* em insetos. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 32: 84-89.

Frankenhuyzen, K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. Journal of Invertebrate Pathology, 101:1-16.

Garcia, F.R.M. Campos, J.V. e Corseuil, E. 1999. Avaliação de atrativos na captura de adultos de *Anastrepha fraterculus* (Wied, 1830) (Diptera, Tephritidae). Biociências 7: 43-50.

Garcia, F.R.M. 2009. Fruit fly: biological and ecological aspects. Em Bandeira RR (Ed.) Current Trends in Fruit Flies Control on Perennial Crops and Research Prospects. Transworld Research Network. Kerala. 1:35.

Garcia, F.R.M. Campos, J.V. Corseuil, E. 2003. Flutuação populacional de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) na Região Oeste de Santa Catarina, Brasil. Revista Brasileira de Entomologia. 47: 415–420.

Gingrich, R.R. 1991. Demonstration of *Bacillus thuringiensis* a potential control agent for the adult mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wied.),Journal of Applied Entomology. 104:378-385.

Harter, W.R. Botton, M. Nava, D.E. Grutzmacher, Gonçalves, A. Machota, R. Jr, Bernardi, D. and Zanardi, O. 2015. Toxicities and residual effects of toxic baits containing spinosad or malathion to control the adult *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). Florida Entomologist. 98:202-208.

Hassani, F. e Gaouar Benyelles, N. 2008. Application of *Bacillus thuringiensi*s (Bti) Struggling Microbiological Control of the Fruit Fly *Ceratitis capitata* (wied) (Diptera: Tephritidae).IBSCientific Journal of Science. 3:10-13.

Höfte, H. Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Reviews. 53:242-255.

Karamanlidou, A. F. Lambropoulos, S. I. Koliais, T. Manousis, D. Ellar, C. 1991. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the olive fruit fly (*Dacus oleae*). Applied and Environmental Microbiology. 57: 2277-2282.

Machota Junior, R. Bortoli, L.C. Loeck, A.E. Garcia, F.R.M. Botton, M. 2013. Estratégia atrativa. Cultivar HF. 11: 20–23.

Martinez, A. J. Robacker, D. C. e Garcia, J. A. 1997. Toxicity of an isolate of *Bacillus thuringiensis* subspecies *darmstadiensis* to adults of the Mexican fruit ßy (Diptera: Tephritidae) in the laboratory. Journal of Economic Entomology. 90: 130-134.

Molina, C.A. Cana-Roca, J.F.Osuna, A. e Vilchez, S. 2010. Selection of a *Bacillus pumilus* Strain Highly Active against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) Larvae. Applied and Environmental Microbiology. 76:1320-1327.

Monnerat, R.G., Bravo, A. 2000.Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: Melo, I.S. Azevedo, J.L. Controle biológico. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. v: 163-200.

Monteiro, L.B, Mio, L.L.M. Motta, A.C.V. Serrat, B.M. Cuquel, F.L. 2007. Avaliação de atrativos alimentares utilizados no monitoramento de mosca-das-frutas em pessegueiro na Lapa – PR. Revista Brasileira de Fruticultura. 29: 72–74.

Monteiro, L.B.e Souza, A. 2010. Controle de tortricídeos em macieira com duas formulações de *Bacillus thuringiensis* var. *kustaki* em fraiburgo-sc1. Revista Brasileira Fruticultura. 32: 423-428.

Navrozidis, E. I. Vasara, E. Karamanlidou, G. Salpiggidis, G.K. Koliais, S. I. 2000. Biological Control of *Bactocera oleae* (Diptera: Tephritidae) Using a Greek *Bacillus thuringiensis* Isolate. Journal Of Economic Entomology. 93: 1657-1666.

Nunes, A.M. Costa, K. Faggioni, K. Costa, M. Gonçalves, R. Walder, J. Garcia, M. Nava, D. 2013. Dietas artificiais para a criação de larvas e adultos da mosca-das-frutas sul-americana Pesquisa Agropecuária Brasileira. 48:1309-1314.

Pogerre, P. 2007. Efeito de atrativos alimentares para monitoramento, flutuação populacional de adultos e efeito do dano causado por *Anastrepha fraterculus* (Weidemann, 1830) (Diptera:Tephritidae) em videira sobre as características físico-químicas e sensoriais do vinho Moscato Embrapa. Monografia (Tecnóloga em Viticultura e Enologia) – Curso Superior de Viticultura e Enologia: Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves, RS, Brazil.

Raga, A. Machado, R.A. Dinardo, W. Strikis, P.C. 2006. Eficácia de atrativos alimentaresna captura de moscas-das-frutas em pomar de citros. Bragantia. 65:337–345.

Robacker, C.D. Martinez, J.A. Garcia, A. J. Diaz, M. Romero, C. 1996. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). Biological and Microbial Control. 89:104-110.

Rupp, L. C. D. Boff, M. I. C. Botton, M. Boff, P. 2006. Percepção do agricultor frente à mosca-das-frutas na produção orgânica de pêssego. Agropecuária Catarinense. 19: 53-56.

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

Scoz, P.L.Botton, M. Garcia, M.S. Pastori, P.L. 2006. Avaliação de atrativos alimentares e armadilhas para o monitoramento de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) na cultura do pessegueiro (*Prunus persica* [L.] Batsh). Idesia 24: 7-13.

Schnepf, E. Crickmore, N. Van Rie, J. Lereclus, D. Baum, J. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology Molecular Biology Review. 62:775–806.

Polanczyk, R. e Alves, S. 2003. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. Agrociência. 7:1-10.

Toledo, J.Liedo,P.Williams,T. Ibarra, J. 1999. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* b-exotoxin to Three Species of Fruit Flies (Diptera: Tephritidae). Ecotoxicology. 92: 1052-1056.

Yamvrias, C. e Anagnou, M. 1989. Preliminary tests on the sensitivity of the larvae of *Dacus oleae* to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Fruit Flies of Economic Importance. 87: 345-348.

Yousten, A.A. 1984. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. Adv Biotechnol Processes. 3: 315-343.

Zilli, G. Garcia, F.R.M. 2010. Análise faunística e flutuação populacional de moscas-das-frutas (Diptera, Tephritidae) em pomar de *Citrus sinensis* no município de Chapecó, Santa Catarina. Biodiversidade Pampeana. 8: 39–45.

Considerações Finais

Variedades do entomopatógeno *B. thuringiensis* podem ser utilizadas como entomopatógeno para *A. fraterculus*, visto que as mesmas acarretaram mortalidade de larvas e má formação de larvas, pupas e adultos que ingeriram *Btk* na dieta artificial a uma concentração de $2x10^9$, assim como pupas e adultos que consumiram *Bto* a uma concentração de $2x10^8$ e $2x10^7$ UFC mL^{-1}. A variedade *Bti* não é indicada para imaturos de *A. fraterculus*.

O controle de *A. fraterculus* é eficiente quando as cepas de *Bt* são associadas ao atrativo alimentar Ceratrap®. Para as cepas de *Bti* e *Bto* também é recomendada a utilização de proteína hidrolisada de milho associada às bactérias. Quando utilizado calda de pêssego a variedade que apresentou a maior eficiência foi *Btk.*

Referências

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. Disponível em: <http://www.grupogaz.com.br/editora/anuarios/show/4718.html > . Acesso em: 8 ago. 2015.

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários.** 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit> . Acesso em: 26 jan. 2017.

ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos. **Revista Biotecnolgia Ciência e Desenvolvimento**, v. 20, n. 2, p. 30-33, 2001.

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

ARONSON, AI.; SHAI, Y. Why **Bacillus thuringiensis** insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiol Letters**, v. 195, p.1–8, 2001.

AZEVEDO, J.L .; MACCHERONI JUNIOR, W.; AGUILARVILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.;. ARAÚJO, W.L.Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.229-236, 2001.

BOTTON, M.; MACHOTA JUNIOR, R.; NAVA, D.E.; ARIOLI, C.J. Novas alternativas para o monitoramento e controle de Anastrepha fraterculus (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae) na fruticultura de clima temperado. **Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho**, 2012. 14 p

BRAVO, A.; SÁNCHEZ ,J.; KOUSKOURA, T.; CRICKMORE, N. N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *B. thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 227, n. 27, p. 23985–23987, 2002.

CAVADOS, C.F.G.; FONSECA, R.N.; CHAVES, .JQ.; RABINOVITCH, L.; ARAÚJO COUTINHO. Identification of entomopathogenic *Bacillus* isolated from Simulium (Diptera: Simuliidae) larvae and adults. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 96, n. 1, p. 1017-1021, 2001.

CAPALBO, D.M.F.; VILAS-BÔAS, G.T.; ARANTES, O.M.N. SUZUKI, M.T. *Bacillus thuringiensis* Formulações e plantas transgênicas. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. v.34, p: 78-85. 2005.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal protein. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n.3, p. 807-813, 1998.

FACHINELLO, J. C.; PASA, M. S.; SCHMTIZ, J. D.; BETEMPS, D. L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. E. p.109-120, 2011.

FIUZA, L. M. Receptores de *Bacillus thuringiensis* em insetos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.32, n.1, p. 84-89, 2004.

GARCIA, F.R.M.; CORSEUIL, E. Análise faunística de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em pomares de pessegueiro em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.15, n.4, p.1111-1117, 1998.

GARCIA, F.R.M.; CAMPOS, J.V.; CORSEUIL, E. Análise faunística de espécies de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) na Região Oeste de Santa Catarina. **Neotropical Entomology**, v.32, n.3, p. 421-426, 2003.

GARCIA, F.R.M.; LARA, D.B. Análise faunística e flutuação populacional de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em pomar cítrico no município de Dionísio Cerqueira, Santa Catarina. **Biotemas**, Florianópolis, v.19, n.3, p.65-70, 2006.

GLARE, T.R.; O'CALLAGHAM, M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley and Sons. 350p. 2000.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Inseticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Reviews,** v.53, n.1, p. 242-255, 1989.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola.** Rio de Janeiro, v.26, n.5, p.1-84, 2013.

KOVALESKI, A. **Processos adaptativos na colonização da maçã (*Malus domestica)* por *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) na região de Vacaria**, **RS**. 1997. 122p. Tese (Doutorado) Instituto Biológico – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H.E.; Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, v.37, n.1, p.409–433, 2003.

MALAVASI, A. Áreas livres ou de baixa prevalência. In.: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Ed. Holos, 2000. p.175-181.

MALAVASI, A. Mosca-da-carambola, *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae). In: VILELA, E.F.; ZUCCHI, R.A.; CANTOR, F. **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Ed. Holos, 2001. p.39-41.

MALAVASI, A.; NASCIMENTO, A.S. Programa Biofábrica Moscamed Brasil. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., 2003, Águas de São Pedro. **Resumos do 8º Simpósio de Controle Biológico**. Águas de São Pedro: SEB, 2003. 52p.

NAVROZIDIS, E. I.; VASARA, E.; KARAMANLIDOU, G.; SALPIGGIDIS, G.K.; KOLIAIS, S. I. Biological Control of *Bactocera oleae* (Diptera: Tephritidae) Using a Greek *Bacillus thuringiensis* Isolate. **Journal Of Economic Entomology.** v. 93, n.6, p. 1657-1666, 2000.

NORA, I.; HICKEL, E.R.; PRANDO, H.F. Moscas-das-frutas nos Estados Brasileiros: Santa Catarina. In: A. MALAVASI e R.A.; ZUCCHI. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Ed. Holos, 2000. p.271-275.

NORRIS, R. F.; CASWELL-CHEN, E. P.; KOGAN, M. Pesticides. In: NORRIS, R. F.; CASWELL-CHEN, E. P.; KOGAN, M. (Ed.). **Concepts in Integrated Pest Management**. New Jersey: Prentice Hall, 2002. p.242-313.

NUNES, A. M. **Moscas frugívoras (Tephritoidea), seus parasitoides e estudos bioecológicos de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) e *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae).** Tese-doutorado. Pelotas. 93p. 2010.

PARANHOS, B. A. J.; WALDER, J. M.; ALVARENGA, C. D. Parasitismo de larvas da mosca-do-mediterrâneo por *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) em diferentes cultivares de goiaba. **Neotropical Entomology**, v.36, n.2, p.243-246, 2007.

ROBACKER, C.D.; MARTINEZ, J.A.; GARCIA, A. J.; DIAZ, M.; ROMERO, C. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). **Biological and Microbial Control.** v. 89. n. 1. p.104-110, 1996.

SALLES, L.A.B.; KOVALESKI, A. Moscas-das-frutas em macieira e pessegueiro no Rio Grande do Sul. **Hortisul**, v.1, n.1, p.5-9, 1990.

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

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 62, p.775–806, 1998.

SHELTON, A. M.; ZHAO, J.Z.; ROUSCH, R.T. Economic, Ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. **Annual Review of Entomology**, v. 47, n.1, p. 845-851, 2003

TOLEDO, J.; LIEDO,P.; WILLIAMS,T.; IBARRA, J. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* b-exotoxin to Three Species of Fruit Flies (Diptera: Tephritidae). **Ecotoxicology**, v. 92, n.5. p. 1052-1056, 1999.

WHITE, I.M.; ELSON-HARRIS, M.M. Fruit flies of economic significance: Their identification and bionomics. **Redwood Press Ltd**. Melksham, 601 p. 1992a.

ZUCCHI, R.A Fruit flies in Brazil - *Anastrepha* species and their hosts plants, 2014. Contém informações institucionais, técnicas, notícias e publicações. Disponível em: http://www.lea.esalq.usp.br/anastrepha. 2014