

**CONTROLE BIOLÓGICO DA MOSCA-DO-MEDITERRÂNEO *Ceratitis capitata*
UTILIZANDO NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM LABORATÓRIO****BIOLOGICAL CONTROL OF FRUIT FLY *Ceratitis capitata* USING
ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES IN LABORATORY**

Ramon Santos de MINAS¹
Claudia DOLINSKI²
Rômulo da Silva CARVALHO³
Ricardo Moreira de SOUZA⁴

RESUMO

O presente trabalho avaliou em laboratório, a utilização de diferentes linhagens de nematoides entomopatogênicos (NEPs) individualmente e combinadas visando ao controle biológico da mosca-do-Mediterrâneo, *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera, Tephritidae). No primeiro bioensaio foram utilizadas oito linhagens individualizadas de NEPs (*Steinernema carpocapsae* NCALL, *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, *H. baujardi* LPP7, *H. indica* LPP1, *H. indica* LPP14, *H. sp.* LPP9, *H. sp.* LPP17 e *H. sp.* LPP12) sendo que para cada tratamento foram utilizados 20 tubos de ensaio cada um contendo areia, 10 larvas L3 de *C. capitata* e 100 juvenis infectantes (JIs) diluídos em 1 cm³ de água destilada. No tratamento controle foi adicionado 1 cm³ de água destilada. No segundo bioensaio, foram utilizadas cinco larvas de *C. capitata* e as linhagens de nematoides foram combinadas duas a duas num total de 100 juvenis por repetição (50 JIs de cada linhagem) Os bioensaios foram conduzidos a 28 °C, 80% UR e 12 de fotoperíodo. A mortalidade média das larvas foi avaliada pelo teste de Tukey a 1%. Individualmente as linhagens *H. baujardi* LPP7, *H. indica* LPP14, *H. sp.* LPP17 e *H. sp.* LPP12 foram as mais eficientes e causaram mortalidade entre 75 e 98,5%. As combinações mais eficientes foram *H. indica* LPP14 + *H. sp.* LPP9 e *H. sp.* LPP17 + *H. sp.* LPP12 com mortalidade de larvas L3 de 60 e 82%, respectivamente. Conclui-se que tanto separadamente ou em combinação, algumas linhagens de NEPs podem ser usadas no controle biológico de *C. capitata*, sendo que quando usadas separadamente, a eficiência é maior.

Palavras-chave: mortalidade; juvenis; combinações; biocontrole.

ABSTRACT

The present study investigated under laboratory conditions the use of entomopathogenic nematodes strains separately or in combinations, as biological control agent of Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera, Tephritidae). In the first bioassay, eight strains were used separately (*Steinernema carpocapsae* NCALL, *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, *H. baujardi* LPP7, *H. indica* LPP1, *H. indica* LPP14, *H. sp.* LPP9, *H. sp.* LPP17 e *H. sp.* LPP12). For each treatment, 20 test tubes with sand, 10 larvae of *C. capitata* and 100 infective juveniles (IJs) diluted in 1 cm³ of distilled water were used. In the treatment control only 1 cm³ of distilled water was added. In the second bioassay it was used the same material; however, the number of *C. capitata* larvae was reduced to five and strains of nematodes combined in pairs, in a total of 100 IJs per replicate (50 individuals of each strain). All treatments were stored in an incubator for 15 days (28 °C, 80% RU and 12 h photoperiod). The average mortality of larvae L3 was evaluated by Tukey test at 1%. The strains *H. baujardi* LPP7, *H. indica* LPP14, *H. sp.* LPP17 and *H. sp.* LPP12 were the most efficient ones, reaching mortalities range between 75 and 98.5%. In the second experiment, the most effective combinations were *H. indica* LPP14 + *H. sp.* LPP9 and *H. sp.* LPP17 + *H. sp.* LPP12 with mortality of 60 and 82%, respectively. We concluded that the use of NEPs in the biological control of *C. capitata* is a feasible alternative either using species separated or in combination, but the first one may reach higher mortality.

Key-words: mortality; juveniles; pairs; biocontrole; Tephritidae

¹ Estudante doutorado, CCTA/LEF, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil. E-mail: ramonminas@bol.com.br

² CCTA/LEF, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. E-mail: claudia.dolinski@censanet.com.br

³ Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua Embrapa, s/nº. Cruz das Almas, BA - Brasil - CEP 44380-000. E-mail: romulo@cnpmf.embrapa.br

⁴ CCTA/LEF, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. E-mail: ricmsouza@censanet.com.br

INTRODUÇÃO

Várias pragas atacam as fruteiras e, dentre elas, as moscas-das-frutas (Tephritidae) dos gêneros *Anastrepha* (Macquart) e *Ceratitis* (Wied.) são as que causam maiores prejuízos à fruticultura mundial (Malavasi et al., 2000). Uma das espécies-praga mais freqüente e de maior importância econômica para os fruticultores é a mosca-do-Mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (Wied.), por suas larvas se alimentarem da polpa das frutas, facilitando podridões e queda prematura de frutos infestados. Além dos danos diretos, as moscas-das-frutas causam problemas para a exportação de frutos "in natura" uma vez que os países importadores aplicam rigorosas leis de quarentena exigindo um tratamento eficaz de controle na pré e pós-colheita (Agriannual, 2006).

A utilização indiscriminada de agrotóxicos no controle de moscas-das-frutas provoca desequilíbrios na cadeia alimentar devido à eliminação de inimigos naturais e problemas de segurança alimentar e quarentenária. Tais problemas têm levado a comunidade científica a buscar alternativas ecologicamente apropriadas como a utilização de agentes biológicos visando ao controle desta importante praga da fruticultura. Dentre esses agentes benéficos, os nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Rhabditida: Steinematidae, Heterorhabditidae), têm demonstrando potencialidade para controle de insetos que possuam pelo menos uma fase do seu ciclo biológico no solo (Molina & López, 2003), característica essa peculiar às moscas-das-frutas em geral.

Os nematoides no terceiro estágio ou juvenis infectantes (JIs) podem permanecer um determinado tempo no solo a procura de um hospedeiro suscetível. Nematoides nesse estágio não se alimentam nem se desenvolvem, sendo a sobrevivência deles limitada por suas reservas energéticas na forma de glicogênio. Uma vez dentro de um inseto hospedeiro, liberam células da bactéria simbiote que carregam. Estas produzem toxinas que ocasionam a morte do inseto-hospedeiro em 24 a 48 h. As bactérias e os tecidos degradados do inseto-hospedeiro fornecem nutrientes para o desenvolvimento dos nematoides (duas a três gerações dentro do hospedeiro), que se dá em um período de sete a quatorze dias, dependendo da temperatura, espécie de nematoide e densidade inicial de inóculo (Adams & Nguyen, 2002). Casos de sucessos têm sido relatados na literatura quanto ao uso de nematoides entomopatogênicos no controle de diversas pragas, dentre elas as moscas das frutas (Stark & Lacey, 1999; Gazit et al., 2000; Laborda et al., 2003; Toledo et al., 2005). Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de oito linhagens de nematoides entomopatogênicos, utilizadas separadamente e em combinações, visando ao controle biológico de larvas L3 da mosca-do-Mediterrâneo, *C. capitata*, em laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia da

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro em Campos dos Goytacazes, RJ, no período de setembro a novembro de 2006. Os nematoides entomopatogênicos utilizados nos experimentos foram multiplicados em larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), segundo procedimento descrito por Woodring & Kaya (1988). Os JIs que emergiam das larvas mortas foram coletados com uma pipeta de vidro durante 6 dias e acondicionados em garrafas de cultura de células em suspensão aquosa a 16 °C, para posterior utilização nos experimentos.

O bioensaio 1 foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com oito linhagens de nematoides entomopatogênicos (NEPs) utilizadas individualmente (*Steinernema carpocapsae* (Weiser) NCALL, *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) HP88, *H. baujardi*, Phan, Subbotin, Nguyen & Moens LPP7, *H. indica* Poinar, Karunakar & David LPP1, *H. indica* LPP14, *H. sp.* LPP9, *H. sp.* LPP17 e *H. sp.* LPP12). Foram utilizados para cada linhagem 20 tubos de ensaio (3 cm diâmetro X 8 cm altura) contendo 32 g de areia autoclavada, onde foram adicionados 100 JIs em 1 cm³ de água destilada e dez larvas (L3) de mosca-do-Mediterrâneo. Os tubos foram fechados com filme plástico de PVC, que foi perfurado com uma agulha para facilitar a aeração, e armazenados em câmara climatizada (28 °C, 80% UR, 12 h fotoperíodo), onde permaneceram por 15 dias, quando então começaram a emergir os adultos provenientes das larvas não infectadas por JIs. O tratamento controle foi estabelecido seguindo os mesmos procedimentos dos demais, exceto pela ausência de nematoides (total de nove tratamentos e 200 repetições/tratamento). Através do programa Infostat / F (Infostat, 2010), foi feita a análise de variância, e a média de mortalidade dos tratamentos comparados pelo teste de Tukey a 1%. O experimento foi repetido logo após a obtenção dos primeiros resultados, seguindo os mesmos parâmetros estabelecidos no primeiro ensaio visando à confirmação destes.

No bioensaio 2, as mesmas linhagens utilizadas anteriormente foram ordenadas em combinações pareadas, baseadas em aspectos biológicos particulares de cada linhagem, tais como facilidade de manuseio e capacidade de infecção. A unidade experimental para cada tratamento foi o tubo de ensaio, contendo 24 g de areia autoclavada umedecida a 30%, acrescida de 5 larvas L3 de *C. capitata* e 100 JIs (50 de cada linhagem) nas seguintes combinações: T1=*S. carpocapsae* NCALL + *H. bacteriophora* HP88; T2 = *H. baujardi* LPP7 + *H. sp.* LPP1; T3= *H. indica* LPP14 + *H. sp.* LPP9; T4=*H. sp.* LPP17 + *H. sp.* LPP12. A testemunha teve a mesma composição dos demais tratamentos, exceto pela adição dos JIs (total de cinco tratamentos e 100 repetições/tratamento). Vinte dias após a avaliação dos dados, o experimento foi repetido de maneira idêntica, visando confirmar a consistência dos resultados primeiramente obtidos. As médias das mortalidades dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 1% com o uso do programa Infostat/F (Infostat, 2010), considerando o número de adultos emergidos e contabilizando a mortalidade por

diferença a partir do número inicial de larvas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Larvas L3 de *C. capitata* foram susceptíveis quando expostas a diferentes linhagens de nematoides isoladamente. Todas as oito linhagens avaliadas foram virulentas e causaram elevados percentuais de mortalidade, que variaram entre 71% (*H. bacteriophora* HP88) e 98,5% (*H. sp.* LPP17). As linhagens *Heterorhabditis* sp. LPP17 e *H. indica*

LPP14 foram as mais eficientes no controle de larvas de *C. capitata* (Tabela 1). Quando os nematoides foram testados em conjunto, houve uma queda no percentual de mortalidade das larvas L3 de *C. capitata* (Tabela 2), quando comparado com a mortalidade causada pelas as mesmas individualmente. A repetição do ensaio mostrou que os experimentos foram conduzidos adequadamente e os resultados foram semelhantes.

TABELA 1 – Mortalidade média de larvas L3 de mosca-do-Mediterrâneo, *Ceratitis capitata*, quando as linhagens foram adicionadas isoladamente. Média de 200 repetições/tratamento em cada ensaio.

Tratamentos	Mortalidade %	
	Ensaio 1	Ensaio 2
<i>Heterorhabditis</i> sp. LPP17	98,5 D	96,5 D
<i>H. indica</i> LPP14	97,0 D	95,0 D
<i>H. baujardi</i> LPP7	85,0 C	83,0 C
<i>Steinernema carpocapsae</i> NCALL	82,0 BC	78,5 BC
<i>H. sp.</i> LPP12	81,0 BC	77,0 BC
<i>H. indica</i> LPP1	78,5 BC	75,5 BC
<i>H. sp.</i> LPP9	73,0 B	72,0 B
<i>H. bacteriophora</i> HP88	73,0 B	71,0 B
Controle	13,5 A	13,5 A

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna, não se diferenciam estatisticamente pelo teste de Tukey a 1%. Ensaio 1: CV= 10,31; DMS = 0,4164 e Ensaio 2: CV=9,70 DMS =0,3970.

TABELA 2 - Mortalidade média de larvas L3 de mosca do Mediterrâneo, *Ceratitis capitata*, utilizando combinações de linhagens de nematoides entomopatogênicos.

Tratamentos	Mortalidade (%)	
	Ensaio 1	Ensaio 2
Controle	8,0 A	10,0 A
T1= <i>S. carpocapsae</i> NCALL + <i>H. bacteriophora</i> HP88	58,0 B	60,0 B
T2 = <i>H. baujardi</i> LPP7 + <i>H. sp.</i> LPP1	64,0 B	60,0 B
T3 = <i>H. indica</i> LPP14 + <i>H. sp.</i> LPP9	68,0 BC	68,0 BC
T4= <i>H. sp.</i> LPP17 + <i>H. sp.</i> LPP12.	80,0 C	82,0 C

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna, não se diferenciam estatisticamente pelo teste de Tukey a 1%. Ensaio 1: CV= 16.67, DMS = 0.5164 e Ensaio 2: CV=16.35, DMS =0.4970.

Diferentes pesquisas têm demonstrado o potencial dos NEPs como excelentes agentes de controle de moscas-das-frutas. Lezama *et al.* (1996), utilizando 4.000 JIs/cm² de *Heterorhabditis* sp. por larva de *Anastrepha ludens* (Loew) observou mortalidade de 82%. Gazit *et al.* (2000) avaliaram a eficiência do nematóide *S. riobrave* Cabanilhas, Poinar e Raulston Texas contra larvas L3 de *C.*

capitata, utilizando dosagem de 2.000 JIs/cm² de solo, e obtiveram mortalidade de 90%. Taylor *et al.* (1998) utilizando *S. carpocapsae* observaram 50% de mortalidade utilizando 58 JIs por larva de *C. capitata*. Lindegren & Vail (1986) encontraram 50% de mortalidade utilizando 560 JIs de *Heterorhabditis* sp. por larva de *C. capitata*. As linhagens utilizadas no presente trabalho apresentaram resultados bas-

tante expressivos quando comparadas às utilizadas nas demais pesquisas, demonstrando serem bastante eficientes no controle de larvas L3 de *C. capitata* com baixa dosagem (4,2 Jls/cm² ou 10 Jls por lar). Quando foi feita a combinação de linhagens foi observada uma queda no percentual de mortalidade de larvas de *C. capitata* oscilando entre 58% (*S. carpocapsae* NCALL + *H. bacteriophora* HP88) e 82% (*H. sp.* LPP17 + *H. sp.* LPP12). Koppenhofer et al. (1995) observaram que em infecções de *G. mellonella*, utilizando cada linhagem separadamente, a mortalidade do hospedeiro foi superior aos tratamentos com duas linhagens de nematóides combinadas.

A especificidade e a eficiência de cada isolado de nematóide entomopatogênico sobre um determinado hospedeiro estão diretamente ligadas à sua eficiência na busca, e capacidade de penetração, causar doença e reprodução driblando as resistências naturais do sistema imunológico do inseto. Essa especificidade revela a existência de um processo complexo, cuja compreensão pode esclarecer porque existe tanta variabilidade na eficiência de diferentes linhagens ou mesmo de isolados sobre determinados hospedeiros (Lewis et al., 2006).

Estudando as interações de diferentes linhagens de NEPs em colunas de areia Neumann & Shields (2006) observaram que em algumas camadas nas colunas, *S. feltiae* (Filipjev) e *H. bacteriophora* foram altamente infectantes, porém quando outras linhagens de NEPs estavam presentes na arena experimental houve inibição na taxa de infecção. Os autores observaram também, não haver infecção múltipla nos insetos hospedeiros. Tais observações demonstram que a concorrência pelo hospedeiro pode inibir a infecção de uma ou mais linhagens. Da mesma forma, no presente trabalho foi observado que linhagens como *H. baujardi*

LPP7, *H. indica* LPP14, *H. sp.* LPP17 e *H. sp.* LPP12 tiveram um destaque maior no primeiro bioensaio quando cada linhagem atuou separadamente, mas não foram da mesma forma eficientes, quando foram combinadas umas com as outras (Tabela 1 e 2).

Ao estudar duas linhagens de gêneros diferentes, Mracek et al. (2005) estabeleceram uma mistura 1:1 dessas linhagens e observaram que apenas uma das espécies desenvolveram até a fase adulta. Tal fato sugere que a competição entre espécies prejudica o desenvolvimento normal das populações em um mesmo hospedeiro, sendo que as habilidades de cada linhagem para se adaptar ao hospedeiro é que determina o seu sucesso. Em contrapartida, algumas espécies preferem hospedeiros mortos, pois não necessitam superar o sistema imunológico do inseto ou estratégias de vedação. Portanto, o que vai determinar o sucesso das populações é o potencial adaptativo de cada uma, e essa variabilidade ocorre em nível de linhagem (San-Blas et al., 2008).

Existe uma infinidade de possibilidades a serem estudadas sobre o comportamento dos nematóides. A sua utilização tanto separadamente como em combinação com outras linhagens deve ser estudada sempre se levando em conta a sua afinidade com o hospedeiro e sua habilidade de infecção, para que possam ser utilizadas com sucesso em programas de controle biológico de insetos-praga.

CONCLUSÕES

Conclui-se que todas as oito linhagens de NEPs testadas possuem alto potencial para o controle de larvas L3 de *C. capitata* em laboratório. Contudo, a combinação delas afeta seu poder de infecção.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B.; Taxonomy and systematic. In: Gaugler, R. (Edit.). **Entomopathogenic Nematology**. New Jersey: Rutgers University, p. 1-28, 2002.
- AGRIBUS. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2006, 521 p.
- GAZIT, Y.; ROSSLER, Y.; GLAZER, I. Evaluation of entomopathogenic nematodes for the control of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, n. 2, p. 157-164, 2000.
- Infostat. Software estatístico. Disponível em: <<http://www.infostat.com.ar/>>. Acesso em: 01 nov. 2010.
- KOPPENHÖFER, A. M.; KAYA, H. K.; TAORMINO, S. P. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 65, p. 193-199, 1995.
- LABORDA, R.; BARGUES, L.; NAVARRO, C.; BARAJAS, O.; ARROYO, M.; GARCIA, E. M.; MONTORO, E.; LLOPIS, E.; MARTINEZ, A.; SAYAGUES, J. M. Susceptibility of the Mediterranean fruit fly (*Ceratitidis capitata*) to entomopathogenic nematode *Steinernema* spp. ("Biorend C"). **Bulletin OILB/SROP**, v. 26, p. 95-97, 2003.
- LEWIS, E. E.; CAMPBELL, J.; GRIFFIN, C.; KAYA, H.; PETERS, A. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 38, n. 1, p. 66-79, 2006.
- LEZAMA, G. R.; ALATORRE, R. R.; BODAJIL, J. L. F. Virulência de cinco cepas de los hongos entomopatogénicos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en huevros y larvas neonatas. **Revista Internacional de Control Biológico**, v. 3, n. 1, p.35-39, 1996.
- LINDEGREN, J. E.; VAIL, P. V. Susceptibility of mediterranean fruit fly, melon fly, and oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* in laboratory tests. **Environmental Entomology**, v. 15, n. 3, p. 465-468, 1986.
- MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A.; SUGAYAMA, R. L. Biogeografia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A., (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 93-98.
- MOLINA J. P.; LÓPEZ N. J. C. Supervivencia y parasitismo de nematodos entomopatogénicos para el control de *Hypothenemus hampei*, (Coleoptera: Scolytidae) en frutos de café. **Boletín Sanidad Vegetal de Plagas**, v. 29, n. 4, p. 523-533. 2003.

12. MRÁČEK, Z.; BECVÁR, S.; KINDLMANN, P.; JERSÁKOVÁ, J. Habitat preference for entomopathogenic nematodes, their insect hosts and new faunistic records for the Czech Republic. **Biological Control**, v. 34, p. 27–37, 2005.
13. NEUMANN, G.; SHIELDS, E. J. Interspecific interactions among three entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae*, and *Heterorhabditis bacteriophora*, with different foraging strategies for hosts in multi-piece sand columns. **Environmental Entomology**, v. 35, p. 1578-1583, 2006.
14. SAN-BLAS, E.; GOWEN, S. R. Facultative scavenging as a survival strategy of entomopathogenic nematodes. **International Journal Parasitology**, v. 38, p. 85–91, 2008.
15. STARK, J. E. P.; LACEY, L. A. Susceptibility of western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae) to five species of entomopathogenic nematodes in laboratory studies. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 74, n. 2, p. 206-208, 1999.
16. TAYLOR, D. B.; SZALANSKI, A. L.; ADAMS, B. J.; PETERSON II, R. D. Susceptibility of house fly (Diptera: Muscidae) larvae to entomopathogenic nematodes (Rhabditidae, Steinernematidae). **Biological Control**, v.27, n, 6, p. 1514-1519, 1998.
17. TOLEDO, J.; IBARRA, J. E.; LIEDO, P.; GÓMEZ, A.; RASGADO, M. A.; WILLIAMS, T. Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae by *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) under laboratory and field conditions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 15, n, 6, p. 627-634, 2005.
18. Woodring L, Kaya H. K. **Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of techniques**. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, Arkansas. Series Bulletin 331. 30 p, 1988.

Recebido em 07/10/2010

Aceito em 29/03/2011