



UNIVERSIDADE DOS AÇORES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**Contribuição para o Controlo Biológico de *Ceratitis capitata*
Wiedemann (Diptera: Tephritidae) – ilha de São Miguel,
Açores**



Laura Medeiros Tavares

PONTA DELGADA

Outubro 2011

Universidade dos Açores

**Contribuição para o Controlo Biológico de *Ceratitis capitata*
Wiedemann (Diptera: Tephritidae) – ilha de São Miguel,
Açores**

Dissertação apresentada à Universidade
dos Açores como parte das exigências
para a obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia em Controlo Biológico

Orientador: Maria Luísa de Melo Oliveira

Co-orientador: Aida Maria Correia Medeiros

Laura Medeiros Tavares

Ponta Delgada, Outubro 2011

Os meus Pais...

Agradecimentos

Grande parte deste trabalho só foi possível pelo facto de estar ligada ao projecto de cooperação existente entre a Direcção Regional do Desenvolvimento Agrário e a empresa Syngenta Crop Protection Lda., pelo que agradeço ao Director da Direcção de Serviços de Agricultura e Pecuária/Laboratório Regional de Sanidade Vegetal, Dr. Carlos Santos, a possibilidade da minha integração na equipa de trabalho coordenada pela Mestre Aida Medeiros, a qual foi também co-orientadora deste estudo. Agradeço ainda todo o incentivo e apoio que ambos demonstram ao longo da sua execução.

À minha Orientadora, Doutora Luísa Oliveira, pela orientação, confiança e disponibilidade demonstradas durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Professor Doutor Nelson Simões e à Mestre Gisela Nascimento pelos ensinamentos e fulcral apoio técnico na realização do trabalho.

Ao Roberto, pelo incessante encorajamento e incentivo para ir mais além, disponibilidade, paciência e força...Muito Obrigado.

Aos meus colegas Fábio Carvalho, Hilário Arruda e Midá Oliveira pelo estímulo, amizade e apoio na concretização dos trabalhos de campo.

A todos os meus colegas da Direcção de Serviços de Agricultura e Pecuária que mesmo indirectamente me deram força para conquistar mais uma vitória.

À Marisa Medeiros pela preciosa ajuda na correcção da escrita em inglês.

A todos o meu Muito Obrigado!

Índice

Resumo	i
Abstract	iii
1. <i>Ceratitis capitata</i>	1
1.1 – Aspectos Gerais	3
1.2 – Importância Económica	5
1.3. Controlo de <i>Ceratitis capitata</i>	8
1.3.1 – Nemátodes Entomopatogénicos	9
1.3.2 – Controlo Biotécnico	11
2. Referências Bibliográficas	15
I. Avaliação do Impacto de Unidades de Controlo ADDRESS® sobre a população de <i>Ceratitis capitata</i> em São Miguel - Açores.....	23
Resumo	25
1. Introdução	26
2. Material e Métodos	28
2.1 – Análise de Abundância Populacional.....	28
2.2 – Infestação dos frutos.....	32
3. Resultados.....	33
3.1 - Análise de Abundância Populacional	33
3.2 - Infestação dos frutos	36
4. Discussão	38
5. Referências Bibliográficas	40
II. Impacto do complexo <i>Steinernema carpocapsae/Xenorhabdus nematophila</i> na indução de genes de resposta imune por <i>Ceratitis capitata</i>	43
Resumo	45
1. Introdução.....	45

2. Material e Métodos	48
2.1- Infecção de Larvas L3 de <i>C. capitata</i>	48
2.1.1 - Bioensaio – Selecção dos melhores isolados contra <i>C. capitata</i>	49
2.2 – RT-PCR.....	50
2.3 - Confirmação da presença de <i>Xenorhabdus nematophila</i>	50
2.4 - Confirmação da expressão de genes de resposta imune	51
3. Resultados.....	52
3.1 - Infecção causada por 7 isolados de EPN em larvas de <i>C. capitata</i>	52
3.2- Confirmação da infecção por <i>Xenorhabdus nematophila</i>	54
3.3- Identificação da resposta imune de <i>C. capitata</i> à infecção	55
4. Discussão	57
5. Referências Bibliográficas.....	58
3. Conclusões Gerais.....	63

Resumo

A mosca-do-Mediterrâneo, *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) é uma praga importante de diversas espécies de fruta nos Açores, comprometendo economicamente a sua produção. Para o controlo de *C. capitata* tem-se recorrido essencialmente ao uso de insecticidas, daí que o estudo de métodos de controlo alternativos seja de grande importância para a redução populacional da praga. Pretendeu-se com este trabalho contribuir para o estudo do impacto da utilização de armadilhas de esterilização de *C. capitata*, ADDRESS[®], instaladas na principal zona de produção de citrinos de São Miguel, em Rabo de Peixe. Esta avaliação foi efectuada mediante o estudo da abundância populacional da praga, bem como da verificação da infestação dos frutos hospedeiros, ao longo de dois anos. Através da análise destes dois parâmetros, verificou-se uma ligeira redução da população da praga no segundo ano de estudo, em comparação com uma zona controlo (Lagoa); quanto à infestação dos frutos, verificou-se uma redução significativa no número de picadas por grama de fruta colhida. Os resultados obtidos indicam que o efeito cumulativo da esterilização química ocorreu de um ano para o outro. Estes resultados são considerados como preliminares, no entanto podem ser encarados como promissores, aguardando-se a obtenção de mais dados nos próximos anos.

A segunda parte deste trabalho debruçou-se sobre o impacto do complexo *Steinernema carpocapsae/Xenorhabdus nematophila* na indução de genes de resposta imune por *C. capitata*. Foi observada, a presença de nemátodes em adultos de *C. capitata*, quando estes tinham sido infectados na fase larvar (L3), bem como a presença destes em pupas vivas. Foi confirmada a presença de *X. nematophila* em pupas e adultos de *C. capitata* infectados, através de análise do 16S da bactéria. Com este trabalho,

pretendeu-se criar linhas orientadoras para futuros estudos, nomeadamente a optimização de todas as condições, no que diz respeito a programas de PCR, para o estudo da expressão de genes de resposta imune por *C. capitata*.

Palavras-chave: *Ceratitis capitata*, controlo biotécnico, ADDRESS®, nemátodes entomopatogénicos, genes de resposta imune.

Abstract

The Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) is a prominent pest that spoils various types of fruits in the Azores, compromising the production of fruit at an economical level. The control of *C. capitata* is usually done with insecticides. For that reason, the studies of alternative control methods to reduce pest population are very important. It was intended to contribute to the study of the impact of *C. capitata* sterilization traps, ADDRESS[®], installed in the main citrus production area of São Miguel, Rabo de Peixe. This evaluation was made through the study of the fruit fly population as well as the infestation of the host fruits, during two years. Through the analyses of these two aspects, it was verified a slight reduction of the pest population in the second year of the study in comparison to a control area (Lagoa); in respect to the fruit infestation, it was verified that there were a significant reduction in the number of infected fruits per gram. The results obtained in this study indicates that the chemo sterilizer cumulative effect occurs from first to second year. These results are considered preliminary, however, can be regarded as promising, waiting to obtain more data in the coming years.

The second half of this study was focused on the *Steinernema carpocapsae* / *Xenorhabdus nematophila* complex impact, in the induction of immune response genes by *C. capitata*. For this purpose the presence of nematodes in *C. capitata* adult insects were ascertained when they had been infected in the larval stage (L3), as well as the presence of these in live pupae. The presence of *X. nematophila* in pupae and infected adults was confirmed through analysis of the bacterial 16 S gene. It was intended to create guidelines for future studies, namely the optimization of all conditions when it

comes to PCR programs for the study of expression of immune response genes by *C. capitata*.

Keywords: *Ceratitidis capitata*, biotecnico control, ADDRESS®, chemosterilisation, entomopathogenic nematodes, immune response genes.

1. *Ceratitis capitata*

1. *Ceratitis capitata*

1.1 – Aspectos Gerais

Os insectos fitófagos da família Tephritidae, vulgarmente referidos como "verdadeiras" moscas-da-fruta, oferecem diferentes histórias de casos de invasões de sucesso, principalmente mediadas pelo Homem. Esta família inclui mais de 5.000 espécies em todo o mundo, aproximadamente 1.400 das quais desenvolvem-se em frutos carnosos. Os quatro géneros principais desta família são *Ceratitis*, *Bactrocera*, *Anastrepha* e *Rhagoletis*, que incluem espécies de pragas importantes (White e Elson-Harris, 1992). Nos últimos anos, os insectos destes géneros têm sido encontrados fora da sua área original, como resultado do crescente comércio de frutas e da indústria do turismo (Figura 1).

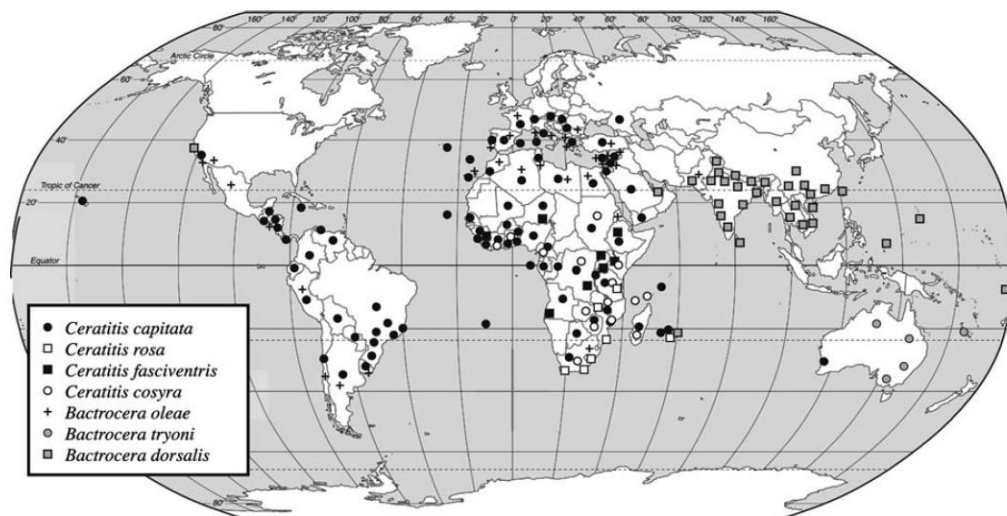


Figura 1- Mapa de distribuição mundial de algumas das principais espécies de moscas-da-fruta (modificado de CABI/EPP0 1998).

Através do movimento de frutas infestadas durante os séculos XIX e XX, as moscas-da-fruta estabeleceram-se na região Mediterrânica, Havai e numerosas ilhas

do Oceano Índico e Atlântico, e na maioria das principais regiões continentais, com exceção da Ásia e da América do Norte (White e Elson-Harris, 1992).

As moscas do género *Ceratitis*, que abrange cerca de 78 espécies, mostram padrões altamente evoluídos de comportamento, que lhes permite superar as pressões da selecção natural e contínua para otimizar o seu sucesso reprodutivo. Entre essas espécies, a mais notória (White *et al.* 2000) é a mosca-do-Mediterrâneo, *Ceratitis capitata*, que está distribuída na maioria das regiões tropicais e temperadas do mundo, e constantemente ameaça invadir novas áreas (Carey, 1991).

Ceratitis capitata (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), também designada de mosca-do-Mediterrâneo, é uma das pragas mais devastadoras de frutas, devido à sua distribuição global, grande variedade de hospedeiros (Liquido *et al.*, 1991), dispersão rápida (Papadopoulos *et al.*, 2003) e adaptação a baixas temperaturas (Del Pino, 2000).

C. capitata é um insecto holometabólico. O ciclo de vida ocorre em três ambientes: no solo, no fruto e na vegetação. As fêmeas adultas, ao atingirem a maturação e depois de fecundadas, dirigem-se para os frutos jovens da planta hospedeira, depositando os ovos em número variável. Cada fêmea pode por 800 ovos, embora a média se situe próximo dos 300 ovos (Thomas *et al.*, 2001). Após a postura dos ovos e para temperaturas médias de 29°C, as larvas desenvolvem-se na polpa da fruta durante 6 a 11 dias, originando galerias. No fim do seu desenvolvimento as larvas saem da fruta e as pupas desenvolvem-se no solo (2 a 10 cm de profundidade), estando mais protegidas de possíveis inimigos e adversidades ambientais. Ao fim de 9 a 11 dias, a temperaturas de 26 a 27°C, dá-se a emergência dos adultos. Depois da emergência, o insecto adulto inicia a procura de alimentos de que necessita para atingir a maturidade

sexual, de forma a acasalar-se e proceder à postura de ovos, dando início a um novo ciclo (Pereira, 2003).

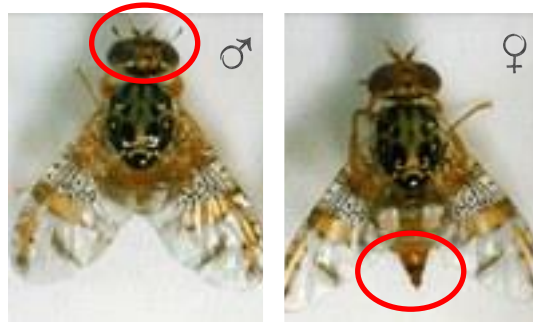


Figura 2- Adultos machos e fêmeas de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Madeira- Med)

1.2 – Importância Económica

Ceratitis capitata é endémica da região tropical subsaariana (Gasparich *et al.*, 1997), e pode completar o seu desenvolvimento em mais de 400 espécies de plantas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Copeland *et al.*, 2002). Este insecto é uma das mais difundidas e graves pragas de frutos comestíveis (Weems, 1981; Liquido *et al.*, 1990, White e Elson-Harris, 1992). Os danos nos frutos iniciam-se quando uma fêmea oviposita sob a pele externa do fruto. Um a dois dias após a oviposição dos ovos, as larvas começam imediatamente a alimentar-se da polpa da fruta. A rápida deterioração resultante desta alimentação faz com que os frutos não sejam comercializáveis, nem comestíveis.

A presença de *C. capitata* pode ter graves implicações económicas para os produtores e exportadores, reduzindo o rendimento das culturas, aumentando os custos de gestão e afectando negativamente o comércio entre os países ou dentro do mesmo país (Siebert, *et al.*, 1995). A sua presença pode ser prejudicial para a biodiversidade natural de uma região (Messing, 1993). Além da influência negativa na agricultura,

investigações recentes têm também destacado a influência negativa de *C. capitata* sobre a saúde humana como um vector de transmissão de doenças de origem alimentar (Lauzon, 2003; Sela, *et al.* 2005).

A incidência de *C. capitata* é também um factor de preocupação por causa do aumento dos custos de produção, devido às frequentes aplicações de insecticidas e perdas de produção (Nora *et al.* 2000).

De entre as espécies de frutas hospedeiras mais frequentes de *C. capitata*, destacam-se: nas Rosaceae, ameixas (*Prunus domestica*), pêssegos (*Prunus persica*) e maçãs (*Malus sylvestris*); nas Rutaceae, laranjas (*Citrus sinensis*), limão doce (*Citrus aurantifolia*) e toranja (*Citrus paradisi*); nas Rubiaceae, café (*Coffea arabica*); nas Anacardiaceae, manga (*Mangifera indica*); nas Myrtaceae, feijoa (*Feijoa sellowiana*); nas Lauraceae, abacate (*Persea americana*); e, nas Caricaceae, papaia (*Carica papaya*) (Figura 3)(Krainacker *et al.* 1987; Fimiani 1989; Zucoloto 1993^a; Carvalho e Aguiar, 1997; Papadopoulos *et al.* 2002; Ovruski *et al.* 2003; Medeiros, 2005).



Figura 3 – Espécies de fruta hospedeira de *C. capitata* (1 – *Citrus* sp., 2 – *Prunus persica*, 3 – *Eriobotrya japonica*, 4 – *Pyrus* sp., 5 – *Psidium cattleianum*, 6 – *Ficus carica*).

Um dos parâmetros a considerar relativamente aos prejuízos causados por *C. capitata* é o Nível Económico de Ataque (NEA), definido como a densidade do inimigo da cultura a que devem ser tomadas medidas de combate para impedir que o aumento da população atinja o nível prejudicial de ataque (Amaro, 2003).

Se a praga não é combatida, surge, em pleno Verão e no Outono, com densidades populacionais elevadas, tornando-se mais difícil e dispendioso o seu combate. É por isso que se aconselha uma vigilância permanente e que a luta se inicie logo que as capturas se tornam consistentes, isto é, deixam de ser esporádicas independentemente do baixo número de capturas. Para se proceder a estas capturas deve recorrer-se à utilização de armadilhas, especialmente concebidas para atraírem este insecto. (Shelly e Mcinnis, 2001).

1.3 - Controlo de *Ceratitis capitata*

As moscas-da-fruta afectam a produção e comercialização de frutas de dois modos. O primeiro através do prejuízo causado pelas larvas, que destroem a polpa dos frutos, tornando-os impróprios para o consumo *in natura* ou para processamento industrial, favorecendo também infecções por fungos e bactérias. O segundo, e talvez mais importante modo, é a imposição de medidas de quarentena pelos países importadores, devido ao risco de introdução de pragas e doenças provenientes das regiões produtoras de frutas (Vidal e Silva, 2005).

O desenvolvimento de técnicas de controlo de *C. capitata* é de fundamental importância, devido às consideráveis perdas económicas causadas na fruticultura (Corsato, 2004).

Para Azevedo Junior *et al.* (1998), *C. capitata* assume grande importância porque pode ocorrer durante todo o ano, devido à grande diversidade de frutos que ataca, apresentando o que normalmente é chamado de “sucessão de hospedeiros”, ou seja, passa de uma fruteira para outra, à medida que estas vão frutificando ao longo do ano.

A existência de hospedeiros silvestres próximos de pomares comerciais agrava o problema na regulação da densidade populacional (Malavasi, 1980). Quando existem hospedeiros em abundância, a população de moscas-da-fruta aumenta e ocorre migração à procura de habitat e condições mais favoráveis, em particular quando a disponibilidade de frutos diminui, sendo através da sucessão de hospedeiros que as populações se mantêm em níveis elevados (Malavasi e Morgante, 1981).

Como alternativa ao uso de insecticidas nos sistemas ecológicos, vários métodos de controlo têm sido aplicados, visando uma rápida acção sobre a praga de forma a obter a redução da população para níveis economicamente aceitáveis. Assim, de entre os métodos mais utilizados destacam-se: a luta biotécnica, pelo uso massivo de armadilhas, a luta autocida, através da Técnica do Insecto Estéril, e a luta biológica, através do uso de inimigos naturais como sejam parasitóides e nemátodes entomopatogénicos.

1.3.1 – Nemátodes Entomopatogénicos

Os programas de Protecção Integrada de pragas têm incentivado o uso de medidas alternativas de controlo de moscas-da-fruta, sendo o controlo biológico o mais indicado.

Nemátodes entomopatogénicos (EPN) das famílias *Steinernematidae* e *Heterorhabditidae* estão disponíveis comercialmente em muitas partes do mundo para controlar um número distinto de insectos pragas do solo (Kaya e Gaugler, 1993).

A biologia de EPN torna-os excelentes candidatos para o controlo de insectos pragas do solo. Os nemátodes de ambas as famílias estão associados a bactérias mutualistas. No género *Steinernema* as bactérias associadas são do género *Xenorhabdus*, enquanto que no género *Heterorhabditis* as bactérias associadas são do género *Photorhabdus*. As células bacterianas são transportadas como simbiontes no trato intestinal apenas no estado de vida livre do nemátode, as formas infecciosas jovens (IJ – Infective Juveniles) (Kaya *et al.* 2006). As IJ entram no insecto hospedeiro através dos orifícios naturais (boca, ânus, e espiráculos) e, posteriormente, penetram no hemocélio, onde as células bacterianas são libertadas, causando a morte do insecto num período de 48 h.

Há muito interesse na utilização de EPNs como agentes de controlo biológico já que são seguros de usar, fáceis de produzir em massa e podem ser aplicados usando equipamento de pulverização padrão (Wright *et al.*, 2005).

A Organização Europeia e Mediterrânea de Protecção de Plantas considera *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) e *C. capitata* como pragas de quarentena A2, e recomenda o desenvolvimento de novos métodos de controlo (OEPP / EPPO, 2006). Estudos de virulência de estirpes de EPNs contra *S. littoralis* e *C. capitata* são raros (Abdel-Razek, 2006).

Ao tentar encontrar uma alternativa eficaz e mais segura de controlo de *C. capitata*, vários estudos têm sido realizados para avaliar a eficiência de EPNs contra esta praga. Tem sido observada elevada susceptibilidade deste insecto, indicando que os

nemátodes são potenciais agentes de controlo biológico contra *C. capitata*. Além disso, *C. capitata* passa parte do seu ciclo de vida no solo, onde os EPNs são encontrados (Lindgren *et al* 1989, Gazit *et al*, 2000). Terminada a fase de alimentação das larvas no fruto, quando estas completam o seu desenvolvimento, vão para o solo e penetram alguns centímetros (Manica *et al.* 2000), sendo este o momento propício para o controlo biológico com EPNs.

A temperatura do solo pode afectar muito a actividade de EPNs. As temperaturas óptimas para locomoção, infecção e reprodução variam entre as espécies e isolados de nemátodes (Grewal *et al* 1994). Em geral, as temperaturas extremas de 0 e 40 ° C são letais para os EPNs; por outro lado, temperaturas abaixo de 10-15 ° C podem limitar a sua mobilidade, enquanto temperaturas superiores a 30-40 ° C podem inactivá-los. Os EPNs também exigem níveis adequados de humidade do solo para a sua sobrevivência e locomoção, que podem variar entre as espécies de nemátodes e entre diferentes tipos de solo. Níveis de humidade do solo baixos podem ser letais para os EPNs. No entanto algumas espécies desenvolvem estratégias de sobrevivência sob condições de stress, reduzindo a área de superfície corporal exposta ao ar. Este processo, conhecido como anidrobiose permite aos nemátodes tornarem-se resistentes à dessecação e pode ser reversível quando o solo se tornar húmido novamente. Por outro lado, níveis elevados de humidade do solo, podem causar depleção de oxigénio e restringir a mobilidade do entomopatógeno (Koppenhöfer *et al*, 1995, Patel *et al* 1997).

1.3.2 – Controlo Biotécnico

Um dos métodos utilizados no controlo de *C. capitata* baseia-se na erradicação através do uso de insecticidas, no entanto, a aplicação deste tipo de produtos tem as suas

desvantagens (Edwards, *et al.*, 2007). A utilização indiscriminada de insecticidas no controlo de moscas-da-fruta ocasiona graves desequilíbrios ecológicos, desencadeia o surgimento de populações de outras pragas ao eliminar os inimigos naturais, além de acarretar a contaminação humana e do meio ambiente (Mendes *et al.*, 2007).

Outro método convencional, usado há mais de 40 anos, para o controlo de *C. capitata* é a utilização de armadilhas com iscos. São utilizadas armadilhas com feromonas e iscos alimentares e/ou ambos separados para detectar quaisquer introduções acidentais da praga.

A influência de agentes químicos sobre o comportamento de oviposição dos insectos pode também ser usada para controlo de pragas. Alguns produtos naturais exibem actividade de impedimento de oviposição contra diferentes insectos (Kulkarni *et al.* 1987).

Os insecticidas têm sido eficazes no controlo de moscas da fruta. Actualmente, a nível mundial utiliza-se o malatião, o lufenurão, o fipronil e o spinosade. Os insecticidas usados no campo em pulverização vão acabar no ambiente, enquanto os utilizados em dietas de criação podem ser recolhidos e eliminados de forma segura (Chang C, *et al.*, 2011)

O lufenurão é um inibidor de síntese de quitina que tem efeitos notáveis no desenvolvimento e reprodução de diversos insectos. Estudos recentes têm mostrado que o lufenurão, testado durante vários anos a uma taxa de 10-50 g / ha em Espanha, é muito eficaz contra a mosca-do-Mediterrâneo *C. capitata* (Navarro-Llopis *etal.*,2007). A utilização de lufenurão como esterilizante químico conduz ao controlo através da redução das populações de moscas da fruta. Quando as fêmeas de *C. capitata* ingerem um isco contendo 1000 mg/g de lufenurão a eclosão dos ovos é inibida. As fêmeas que

acasalaram com machos tratados com lufenurão (5 mg/g na dieta) originam ovos não viáveis (Katsoyannos *etal.*, 1999).

2. Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Abdel-Razek, A.; (2006); Infectivity prospects of both nematodes and bacterial symbionts against cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Biosduval) (Lepidoptera: Noctuidae); *Journal of Pest Science*. 79, 11–15.
- Amaro, P., Baggiolini M; (1982); Introdução à protecção integrada; FAO/DGPPA, Lisboa, 276 pp.
- Amaro, P.; (2003); A Protecção Integrada; ISA/PRESS, Lisboa; 458 pp.
- Azevedo Junior, G.; (1998); Levantamento de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) na cultura da manga, no município de Mossoró-RN; *Cctinga*, Mossoró, v.11, p.85-90.
- Broza, M., Green, N., Gertler, S., Steiner, L.; Miyashita, D.; (1961); New attractants for the Mediterranean fruit fly. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.9, 361-365.
- Carey, J.; (1991); Establishment of the Mediterranean fruit fly in California; *Science* 253:1369–1373.
- Carvalho, J., Aguiar, A.; (1997); Pragas dos citrinos na Ilha da Madeira. Direcção Regional de Agricultura da Região Autónoma da Madeira. Madeira, Portugal. 410 pp.
- Chang, C., Cho, I., Li, Q.; (2011); Laboratory evaluation of the chemosterilant lufenuron against the fruit flies *Ceratitis capitata*, *Bactrocera dorsalis*, *B. cucurbitae*, and *B. latifrons*; *Journal of Asia-Pacific Entomology* 15, 13–16.
- Copeland, R., Wharton, R., Luke, Q., De Meyer, M.; (2002); Indigenous hosts of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Kenya; *Annals of Entomological Society America* 95, 672-694.
- Corsato, C.; (2004); Moscas-das-frutas (Díptera: Tephritidae) em pomares de goiaba no norte de Minas Gerais: biodiversidade, parasitóides e controle biológico; Ph.D. Thesis. Piracicaba, São Paulo. 95 pp.

- Del Pino, A.; (2000); Efecto de factores abióticos y edáficos naturales en el ciclo biológico de *Ceratitits capitata* (Wiedemann), Diptera: Tephritidae; Ph.D. Thesis. Dep. Producción Vegetal.ETSIA. Universidad Politécnica de Valencia. 217 pp
- Edwards, J.; Lee, S.; Heath, L.; Pisaniello, D.; (2007); Worker exposure and a risk assessment of Malathion and Fenthion used in the control of Mediterranean fruit fly in South Australia; *Environmental Research*, 103, 38–45.
- Fimiani, P.; (1989); Mediterranean region. Pp. 39-50 in: Robinson, A.S. & G. Hooper (Eds). World CropPests Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control. Vol. 3A. Amsterdam, *Elsevier Science*. 372 pp.
- Gasparich, G., Silva, J., Han, J-Y., McPherson, B., Steck, G., Sheppard, W.; (1997); Population genetic structure of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) and implications for worldwide colonization patterns; *Annals of the Entomological Society of America* 90, 790-797.
- Gazit, Y., Rossler, Y., Glazer, I.; (2000); Evaluation of entomopathogenic nematodes for the control of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae); *Biocontrol Science and Technology* 10: 157-164.
- Grewal, P., Selvan, S., Gaugler, R.; (1994); Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction; *Journal of Thermal Biology* 19: 245-253.
- Karagoz, M., Gulcu, B., Hazir, C., Kaya, H., Hazir, S.; (2009); Biological control potential of Turkish entomopathogenic nematodes against the Mediterranean fruit fly *Ceratitits capitata*; *Phytoparasitica* 37:153–159.
- Katsoyannos, B., Papadopoulos, N., Heath, R., Hendrichs, J., Kouloussis, N.; (1999); Evaluation of synthetic food-based attractants for female Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in McPhail type traps; *Journal of Applied Entomology*. 123, 607–612.
- Kaya, H., Aguilera, M., Alumai, A., Choo, H., Torre, M., Fodor, A., Ganguly, S., Hazir, S., Lakatos, T., Pye, A., Wilson, M., Yamanaka, S., Yang, H., Ehlers, R.; (2006). Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world; *Biological Control*, 38, 134–155.

- Kaya, H., Gaugler, R.; (1993); Entomopathogenic nematodes; *Annual Review of Entomology*, 38, 181–206.
- Koppenhöfer, A., Kaya, H., Taormino, S.; (1995); Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures; *Journal of Invertebrate Pathology* 65: 193-199.
- Krainacker, D., Carey, J., Vargas, R.; (1987); Effect of larval host on life history traits of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *Oecologia*73: 583-590.
- Kulkarni, M., Nagasampagi, B., Deshpande, S., Sharma, R.; (1987); Five chromenes from *Blepharispermum subsessile*; *Phytochemistry* 6: 2969–71.
- Lauzon, C.; (2003); Symbiotics Relationships of Tephritids, In: Bourtzis, K.; Miller, T. A. (eds.), *Insect Symbiosis*; CRC Press: Boca Raton, FL; pp. 115–129.
- Lindgren, J., Wong, T., Mcinnis, D.; (1989); Response of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* in field tests in Hawaii; *Environmental Entomology* 19: 383-386.
- Liquido, N., Cunningham, R., Nakagawa, S.; (1990); Host plants of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) on the Island of Hawaii (1949-1985 survey); *Journal of Economic Entomology* 83, 1863-1878.
- Liquido, N., Shinoda, L., Cunningham, R.; (1991); Host plants of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera:Tephritidae): an annotated world review; *Miscellaneous publications of the Entomological Society of America*.77: 1–52.
- Malavasi, A., Morgante, J.; (1981); Adult and larval population fluctuation of *Anastrepha fraterculus* and its relationship to host availability; *Environmental Entomology*, v. 10, p. 275-278.
- Malavasi, A.; (1980); Biologia de moscas-das-frutas (Díptera: Tephritidae). II: Índices de infestação em diferentes hospedeiros e localidades; *Revista Brasileira de Biologia*, v. 40, n. 1, p. 17–24.
- Manica, I., Icum, I., Junqueira, N., Salvador, J., Moreira, A., Malavolta, E.; (2000); *Fruticultura tropical* 6. Goiaba; Porto Alegre: Editora Cinco Continentes. 374p.

- Medeiros, A.; (2004); Bioecologia e controlo com nematodes entomopatogénicos de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) em S. Miguel. M.S. Thesis, Universidade dos Açores, Açores. 72 pp.
- Mendes, P., Ambrosano, E., Guirado, N., Rossi, F., Arévalo R., Groppo, G.; (2007); Avaliação populacional de moscas-das-frutas (Díptera: Tephritidae) e de seus parasitóides larvais (Hymenoptera: Braconidae); Resumos do II Congresso Brasileiro de Agroecologia. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v.2, n.1.
- Messing, R.; (2003); In Fruit Flies: Biology and Management; Aluja, M.; Liedo, P. (eds.); *Springer: New York*, pp. 321–333.
- Navarro-Llopis, V., Sanchis, J., Primo-Millo, J., Primo-Yúfera, E.; (2007); Chemosterilants as control agents of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in field trials; *Bulletin of Entomological Research* 97, 359–368.
- Nora, I., Hickel, E., Prando, H.; (2000); Moscas-das-Frutas nos estados brasileiros: Santa Catarina. In: Malavasi, A.; Zucchi, R. A. (Eds.). Moscas-das-frutas de importância económica no Brasil: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos. pp. 271-275
- OEPP/EPPO, 2006. EPPO Alert List from <<http://www.eppo.org/QUARANTINE/>
- Ovruski, S., Schliserman, P., Aluja, M.; (2003); Native and introduced host plants of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Northwestern Argentina; *Journal of Economic Entomology*96: 1108-1118.
- Papadopoulos, N., Katsoyannos, B., Carey, N.; (2002); Demographic Parameters of the Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Reared in Apples; *Annals of the Entomological Society of America*95: 564-569.
- Papadopoulos, N., Katsoyannos, B., Nestle, D.; (2003); Spatial autocorrelation analysis of a *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) adult population in a mixed deciduous fruit orchard in Northern Greece. *Environmental Entomology*. 32: 319–326.
- Patel, M., Perry, R., Wright, D.; (1997); Desiccation survival and water content of entomopathogenic nematodes, *Steinernema* spp. (Rhabditida: Steinernematidae) response to soil texture and bulk density; *Environmental Entomology* 28: 1021-1035.

- Pereira, J. (2003). O comportamento da Mosca-do-Mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (Wied.) (Díptera: Tephritidae) em Pegões; Mestrado em Agricultura e Horticultura sustentáveis; Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 138 pp.
- Shelly TE, Mcinnis D; (2001); Exposure to Ginger Root Oil Enhances Mating Success of Irradiated, Mass-Reared Males of Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae); *Journal of Economic Entomology*, 94: 1413-1418.
- Siebert, J., Cooper, T.; (1995); Embargo on California produce would cause revenue Job loss. *California Agriculture*, 49, 7–12.
- Thomas, M., Heppner, J., Woodruff, R., Weems, H.; Steck, G., Fasulo, T.; (2001); Mediterranean Fruit Fly. Florida Department of Agriculture and Consumer Services and University of Florida.
- Vidal, D., Silva, J.; (2005); Ocorrência de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no Sul da Bahia. In: 57º Reunião Anual da SBPC, Fortaleza. Resumos
- Weems, H.; (1981); Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae); Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, *Entomological Circular*230, 1-8.
- White, I., De Meyer, M., Stonehouse, J.; (2000); A review of native and introduced fruit flies (Diptera, Tephritidae) in the Indian Ocean Islands of Mauritius, Réunion, and Seychelles; In: Price NS, Seewooruthun SI (eds) Proceedings, Indian Ocean Commission, regional fruit fly symposium, Indian Ocean Commission/European Union, Flic en Flac, Mauritius, pp 15–21.
- White, I., Elson-Harris, M.; (1992); Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics; CAB International, Wallingford and ACIAR, Canberra.
- Wright, D., Peters, A., Schroer, S., Fife, J.; (2005); Application technology. In: Grewal, P.S., Ehlers, R.-U., Shapiro-Ilan, D.I. (Eds.), *Nematodes as Biocontrol Agents*. CABI Publishing, pp. 91–106.
- Zucoloto, F.; (1993); Acceptability of Different Brazilian Fruits to *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) and Fly Performance on Each Species; *Brasilian Journal of Medical and Biological Research*26: 291-298.

**I. Avaliação do Impacto de Unidades de Controlo
ADRESS® sobre a população de *Ceratitis capitata*
em São Miguel - Açores**

Resumo

A mosca-do-Mediterrâneo, *Ceratitidis capitata*, é nativa do norte de África, contudo a sua elevada plasticidade ecológica leva a que este insecto invada diversos habitats. Sendo *C. capitata* um insecto polífago, podendo infestar uma grande variedade de espécies de fruta hospedeira, torna-se de grande importância o seu controlo, uma vez que esta praga compromete economicamente a fruta, devido à postura dos ovos e desenvolvimento das larvas no interior dos frutos. O controlo de *C. capitata* recorrendo ao uso de esterilizantes químicos tem demonstrado ser capaz de reduzir a população, bem como os danos que causa. Com o objectivo de reduzir a população de *C. capitata* numa zona de fruteiras com grande infestação por esta praga na ilha de São Miguel, Açores, foi implementado um projecto com a instalação de unidades de controlo ADRESS[®]. O nosso estudo teve como objectivo a avaliação do impacto deste sistema na dinâmica populacional da praga e nos danos por infestação dos frutos ao longo dos dois primeiros anos. Tal como o esperado, no primeiro ano não se verificou diferença significativa entre os resultados obtidos na zona com e sem ADRESS[®]. No entanto, no segundo ano, já se observou uma redução na dinâmica populacional da praga. Os índices de eficácia anual calculados demonstraram um aumento de 36,0 para 51,0%, no primeiro e segundo ano de estudo, respectivamente. Em relação aos danos causados nos frutos verificou-se uma redução significativa no número de picadas. Este é um método que demonstra ser promissor para o controlo de *C. capitata*. No entanto, serão necessários mais anos de aplicação continuada deste método, para que a eficácia cumulativa ao longo dos anos seja mais evidente.

Palavras-chave: *Ceratitidis capitata*; ADRESS[®]; Dinâmica populacional; Infestação nos frutos.

1. Introdução

Ceratitis capitata (Wiedemann), é uma das principais pragas da fruticultura mundial (Christenson e Foote, 1960; Ciolfi, *et al.*, 2005; Copeland *et al.*, 2002; Liquido *et al.*, 1998), que causa perdas económicas consideráveis à agricultura na zona Mediterrânea (Enkerlin e Mumford, 1997), daí ser conhecida vulgarmente como mosca-do-Mediterrâneo. Em 1829, MacLeay referiu a presença de *C. capitata* em laranjas produzidas nos Açores e exportadas para Inglaterra (Piedade-Guerreiro, 1987). Nos Açores, esta praga encontra condições climáticas favoráveis para o seu desenvolvimento, nomeadamente em zonas de baixa altitude, onde se encontram a maior parte das fruteiras (Medeiros, 2004; Lopes, 2005).

O seu sucesso como espécie invasora é parcialmente devido à sua gama de hospedeiros, invulgarmente ampla e à sua capacidade para se adaptar a uma elevada diversidade de condições climáticas e habitats (Malacrida, *et al.*, 2007). Programas de monitorização e controlo biológico são desenvolvidos em todo o mundo na tentativa de suprimir ou erradicar populações desta espécie, devido aos prejuízos económicos provocados (Joachim-Bravo, *et al.*, 2010).

Tradicionalmente o controlo da mosca-da-fruta tem sido realizado com insecticidas, tais como o malatião e mais recentemente o spinosade (Calkins e Malavasi 1995; Moreno e Mangan, 2000; Nascimento e Carvalho, 2000; Peck e McQuate, 2000; McQuate, *et al.*, 2005), no entanto, esta forma de controlo contribui marcadamente para o desequilíbrio do agro-ecossistema e tem efeitos negativos especialmente contra os inimigos naturais. Além disso, alguns destes produtos deixam resíduos tóxicos sobre os frutos, que se tornam prejudiciais para a saúde pública ao serem consumidos como fruta fresca (Thomas e Mangan, 2005). Actualmente, um método de controlo alternativo

demonstrado como bem sucedido para o controlo de *C. capitata* é a esterilização química (Moya, *et al.*, 2009).

A unidade de controlo ADRESS® é um novo e poderoso método de controlo da mosca da fruta, baseado na redução populacional da praga, mediante esterilização. Este sistema baseia-se em três modos de atracção: cromática, sexual e fagoestimulante. A atracção cromática serve para que os insectos adultos de *C. capitata* detectem facilmente a unidade ADRESS®, a sexual provoca o circundar da armadilha pelos insectos e o gel fagoestimulante faz com que o insecto ingira o composto esterilizante presente no gel. Este composto é um insecticida (lufenurão) que, de acordo com o seu modo de acção, inibe o desenvolvimento dos insectos (Aguiar *et al.*, 2005), mais concretamente inibe a formação de quitina nos estados imaturos (larvas e ninfas) de artrópodes sensíveis. Através do método de esterilização provocado por esta unidade de controlo, irá decorrer uma diminuição da descendência de *C. capitata*, levando a uma redução da sua população.

Este trabalho tem como principal objectivo estudar o impacto desta nova metodologia de controlo da praga *C. capitata*, que se rege pelos princípios da Protecção e Produção Integradas, numa área que se considera claramente com elevados níveis populacionais da referida praga. A avaliação dos benefícios deste novo método de controlo será feita através da análise da abundância populacional observada ao longo dos anos. Estes dados serão também comparados com dados observados numa zona controlo, sem a unidade de controlo ADRESS®. Será também comparada a infestação nos frutos. Com este estudo, espera-se comprovar que este é um método de controlo que contribui para a diminuição da população de *C. capitata* e que poderá ser utilizado em programas de Protecção Integrada no Arquipélago dos Açores.

2. Material e Métodos

A área em estudo neste trabalho refere-se a uma zona de 80 hectares, essencialmente de fruteiras, sita em Rabo de Peixe, ilha de São Miguel, coberta pelo efeito da unidade de controlo ADDRESS[®] (armadilhas de esterilização). Estes pomares caracterizam-se pela presença de diversas culturas, no entanto, predominam os citrinos.

Desde o ano de 2009, nos 80 ha que equivalem a 164 pomares, foram instaladas 1920 armadilhas de esterilização, o que corresponde a 24 armadilhas/ha (de acordo com instruções do fabricante). O estudo para a avaliação do impacto das unidades de controlo ADDRESS[®] iniciou-se a partir da data em que foram colocadas as armadilhas.

2.1 – Análise de Abundância Populacional

Para o estudo da abundância populacional de *C. capitata* foram capturados adultos, através de 18 armadilhas Tephri-trap[®], colocadas aleatoriamente (Figura 1), contendo o atractivo trimedlure (TML), isco sintético frequentemente utilizado em programas de monitorização e erradicação, e uma pastilha insecticida de DDVP (2,2 dichlorovinil-fosfato de dimetilo). Os insectos adultos capturados foram recolhidos semanalmente e contabilizados, durante todo o ano. Os iscos de TML e de DDVP foram substituídos de 15 em 15 semanas.

Como área de controlo para este estudo, foi utilizado um pomar situado na Lagoa a aproximadamente 6 Km da zona tratada com ADDRESS[®]. Este é um pomar com características semelhantes às de Rabo de Peixe, onde não foram colocadas quaisquer armadilhas de esterilização. A monitorização da população de *C. capitata* nesta área foi,

igualmente, feita por meio da captura em apenas uma armadilha Tephri-trap[®], com os iscos de TML e de DDVP.

A avaliação da população de *C. capitata* iniciou-se na segunda semana de Agosto e prolongou-se até à segunda semana de Março nos anos de 2009/2010 e 2010/2011. Os restantes meses não foram considerados para análise estatística, devido à instalação das armadilhas de esterilização ter ocorrido nos finais de Julho de 2009 e dos níveis populacionais da praga serem reduzidos entre os meses de Março a Julho.

Tal como o referido por Navarro- Llopis *et al.* (2009), a evolução da população da praga em São Miguel, em função do tempo, é claramente não-linear, daí ter sido utilizado um modelo de regressão não-linear para a análise estatística. Tendo em conta que os picos são simétricos, foi utilizado um modelo multimodal Gaussiano com nove parâmetros: três dos parâmetros fornecem informações sobre o pico 1 (m_1, t_{p1}, w_1), três sobre o pico 2 (m_2, t_{p2}, w_2) e os restantes são responsáveis pelo pico 3 (m_3, t_{p3}, w_3).

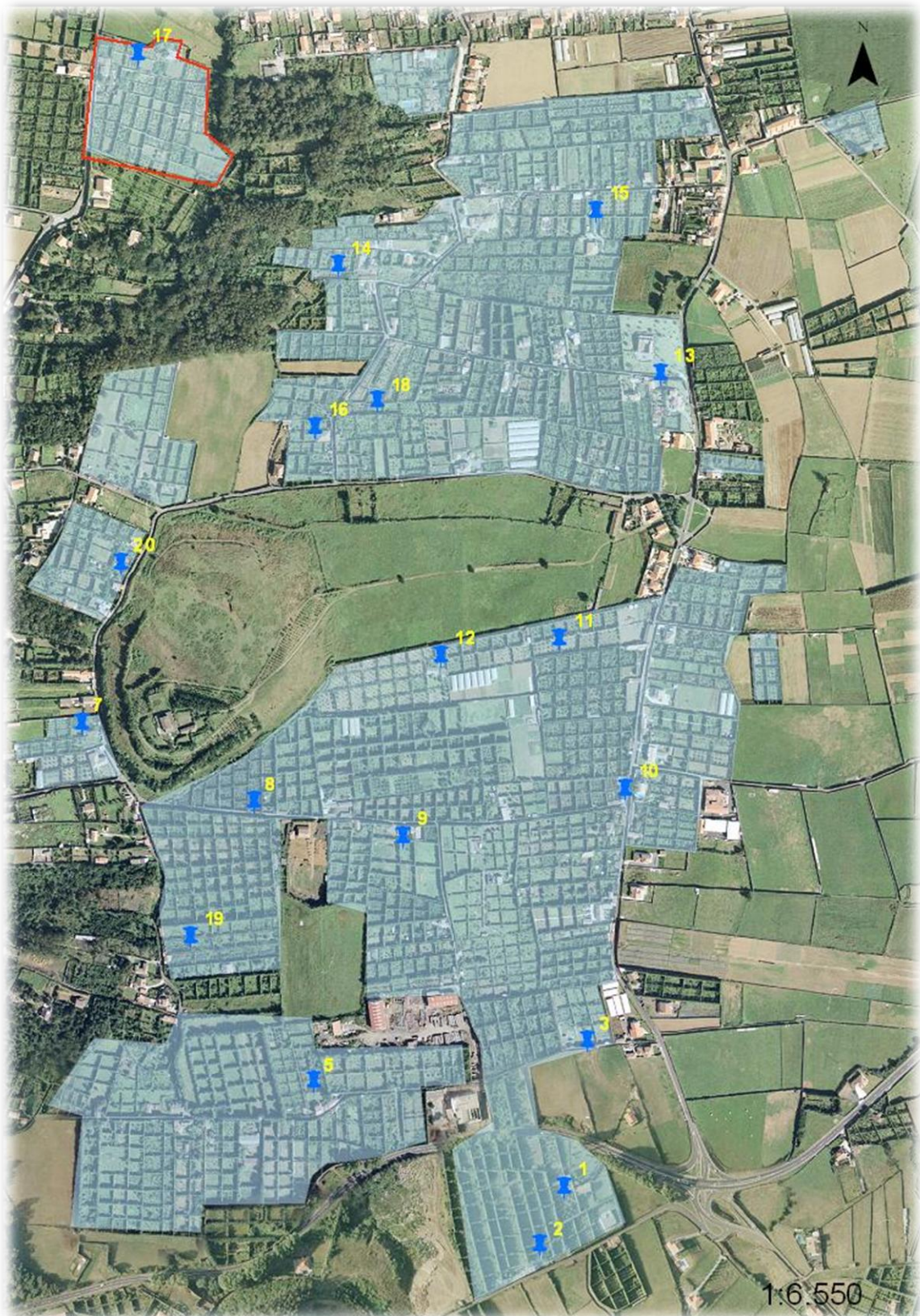


Figura 1 - Área de estudo em Rabo de Peixe, onde se encontram instaladas as unidades de controlo ADRESS[®], com sinalização das 18 armadilhas de monitorização.

A variável dependente é uma transformação logarítmica do número de capturas por armadilha por dia (FTD). Este tipo de transformação foi utilizado porque os dados não são normalmente distribuídos. A variável independente t indica a semana do ano em que os dados de captura foram recolhidos e variam de 32 (11-10 de Agosto 09/10) a 62 (11-10 de Março 10/11).

Os parâmetros m_i referem-se à altura do pico i , enquanto os parâmetros t_{pi} indicam a semana em que a variável dependente atinge o máximo relativo. Os parâmetros w_i são proporcionais à largura do pico i (Navarro-Llopis *et al.* 2009).

$$\log_{10}(1 + \text{FTD}) = m_1 \cdot \exp \left[- \left(\frac{t - t_{p1}}{w_1} \right)^2 \right] + m_2 \cdot \exp \left[- \left(\frac{t - t_{p2}}{w_2} \right)^2 \right] + m_3 \cdot \exp \left[- \left(\frac{t - t_{p3}}{w_3} \right)^2 \right]$$

(1)

De ano para ano, a densidade populacional de *C. capitata* difere, devido a factores biológicos e ambientais. Por isso, para avaliarmos a eficácia anual das unidades de controlo ADDRESS[®] usamos a fórmula usada por Navarro-Llopis *et al.* (2007), que mede a diferença do nível populacional da praga na zona tratada (RP) em relação a uma zona não tratada (L), para cada ano.

$$\text{Eficácia Anual} = \left(1 - \frac{\sum_{n=1}^{31} \text{FTD}_{\text{RP}}}{\sum_{n=1}^{31} \text{FTD}_{\text{L}}} \right) \times 100$$

(2)

Nesta fórmula, n = número de semanas de 11-10 de Agosto a 11-10 de Março do ano seguinte; FTD_{RP} = número médio de moscas capturadas por armadilha e por dia em Rabo de Peixe; e FTD_L = número médio de moscas capturadas por armadilha e por dia na Lagoa.

2.2 – Infestação dos frutos

Uma outra maneira de averiguar a eficácia das unidades de controlo ADRESS[®] foi através da avaliação da infestação dos frutos. Para tal, durante o tempo em que decorreu o estudo, foram recolhidas amostras, na área em questão, de fruta madura de espécies hospedeiras de *C. capitata*, Diospiro(*Diospyrus kaki*), Feijoa(*Feijoa sellowiana*) e Figo (*Ficus carica*). No total foram colhidos 50 frutos de cada espécie, que apresentavam sintomas de infestação, tendo este número sido mais reduzido em 2009, dada a pouca disponibilidade de fruta neste ano. No laboratório os frutos foram unitariamente pesados e contabilizado o número de picadas em cada fruto. Depois foram colocados em recipientes individuais e foi contabilizado o número de larvas de *C. capitata* existente em cada fruto (Figura 2). Foram determinadas a média de picadas e de pupas por grama de fruto amostrado.

A comparação entre os resultados obtidos nos dois anos em avaliação, foi efectuada através do teste-t para um $P < 0,05$. Os dados foram previamente transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$, o que permitiu reduzir a heterogeneidade da variância (Zar, 1996). As análises foram realizadas usando o programa SPSS 15.0 Windows (SPSS 2006).

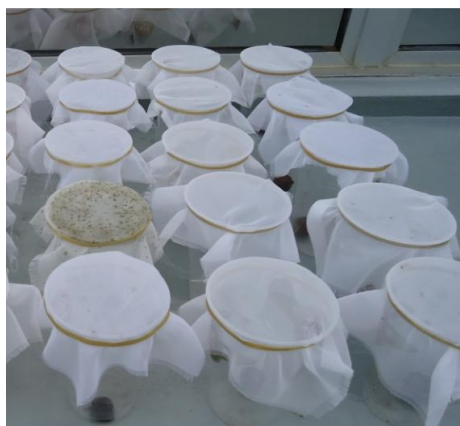


Figura 2 – Recipientes utilizados para a determinação da infestação por grama de fruto.

3. Resultados

3.1 - Análise de Abundância Populacional

A Figura 3 mostra a dinâmica da população de *C. capitata* nas zonas tratada e não tratada com ADRESS[®], durante os dois anos considerados para estudo. No primeiro ano (2009/2010) não foram observadas diferenças significativas na dinâmica populacional de *C. capitata*, como comprovado pelos resultados presentes na Tabela 1.

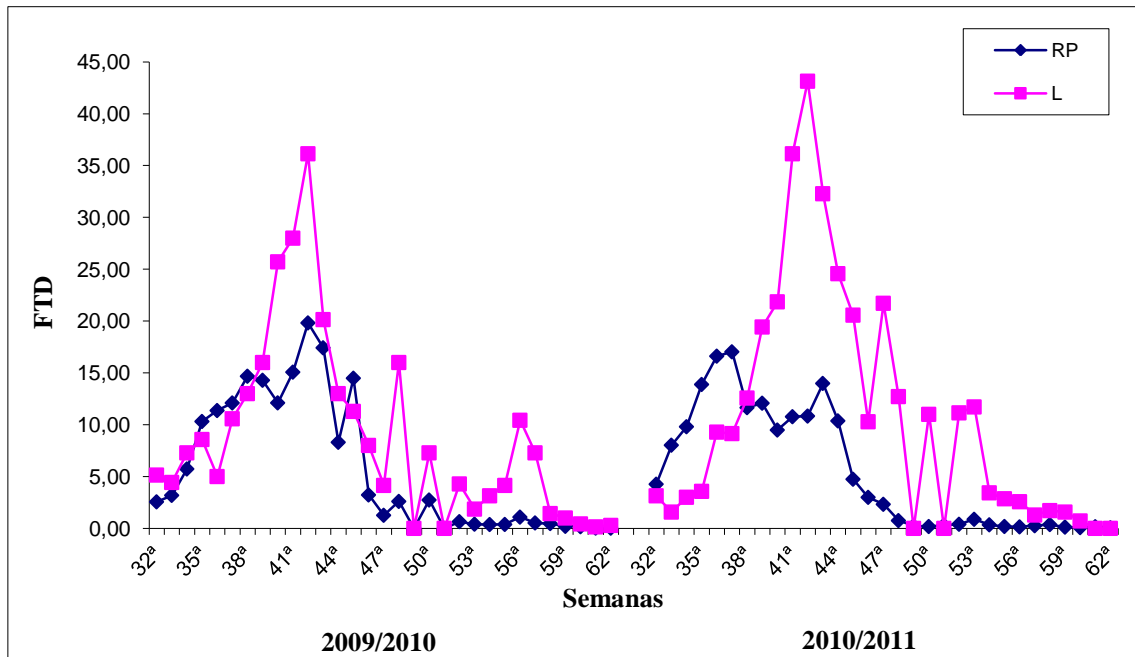


Figura 3 – Número médio de adultos capturados por armadilha e por dia (FTD) na zona de Rabo de Peixe (RP - zona com ADRESS[®]) e Lagoa (L - zona sem ADRESS[®]), desde a segunda semana de Agosto até à segunda semana de Fevereiro, nos anos de 2009/2010 e 2010/2011.

No entanto, na zona de Rabo de Peixe, tratada com as armadilhas de esterilização o nível da população manteve-se sempre mais baixo do que na zona da Lagoa, durante os dois anos de estudo, como se observa na Figura 3. Além disso, no segundo ano de estudo, 2010/2011, existe claramente diferença significativa no número de FTD capturado em Rabo de Peixe e na Lagoa, sendo este último notoriamente mais elevado (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação entre o número médio de FTD capturados em Rabo de Peixe (RP) e na Lagoa (L) nos dois anos de estudo.

Local	2009/2010	2010/2011
RP	5,66±1,15a	5,27±1,05b
L	8,84±1,60a	10,74±2,08a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula (coluna) não são significativamente diferentes, teste-t com $P < 0,05$

Para avaliarmos a eficácia do sistema de controlo ADRESS[®] utilizamos o índice de eficácia anual, que tem em conta o número de adultos de *C. capitata* capturado em dois locais. Neste caso comparamos a utilização do sistema ADRESS[®] (RP) com a sua não utilização (L). Os índices de eficácia anual demonstraram um aumento da eficácia de 36,0 para 51,0%, respectivamente em 2009/2010 e 2010/2011.

Os resultados da regressão não linear são apresentados na Tabela 2. Os altos valores de R^2 indicam que a equação (1) encaixa correctamente nos dados semanais obtidos nos dois períodos em estudo. Os valores dos parâmetros de regressão reflectem as diferenças entre os modelos ajustados. Os valores de t_{p1} , t_{p2} e t_{p3} são muito semelhantes entre o primeiro ano de estudo e o segundo, o que indica uma sincronização notável da dinâmica da população da praga. O valor de w_3 foi maior no primeiro ano de estudo do que no segundo, o que indica que o modelo Gaussian se tornou mais amplo. Em contraste, o pico 3 no segundo ano foi o mais estreito, o que indica que a duração deste pico foi mais reduzida. O parâmetro FTD_i , indicado na Tabela 2, é o valor estimado de FTD alcançado em $t = t_{pi}$ de acordo com a equação ajustada. Os valores da FTD_i provavelmente fornecem as informações mais relevantes contidas na Tabela 2, porque permitem uma comparação geral da população de pragas entre os modelos ajustados.

Tabela 2 – Resultado da análise de regressão não linear para comparar a zona com utilização de ADRESS[®] nos dois anos de estudo.

		Coeficientes do modelo [equação (1)] ^a																	
		Pico 1			Pico 2			Pico 3											
Ano	Local	m_1	w_1	t_{p1}	m_2	w_2	t_{p2}	m_3	w_3	t_{p3}	R^2 ^b	FTD ₁ ^c	FTD ₂	FTD ₃	data ₁ ^d	data ₂	data ₃	t_{p1-2} ^e	t_{p2-3}
2009/2010	RP	1,11	5,37	36,77	0,95	3,72	43,45	0,20	6,92	53,33	0,933	14,45	18,20	1,62	24-Set	22-Out	17-Dez	46,78	69,13
2010/2011	RP	1,22	5,37	35,87	0,92	3,78	43,55	0,21	2,09	53,04	0,988	16,22	12,88	1,62	16-Set	28-Out	06-Jan	53,74	66,43

^a Equação (1) prevê o logaritmo de (1 + FTD), sendo FTD o número de capturas de moscas, armadilha⁻¹, dia⁻¹
^b Coeficiente de Determinação
^c Valor máximo estimado de FTD alcançado em t_{p1} , que é obtido em $t = t_{p1}$ de acordo com o modelo ajustado
^d Data correspondente ao t_{p1} do ano indicado na primeira coluna
^e Número de dias entre data₁ e data₂, que também pode ser calculado como $7 \times (t_{p2} - t_{p1})$

Como podemos observar na figura 4, os valores previstos através da equação (1) demonstram que a partir da semana 38 do segundo ano existe uma ligeira redução nos valores de FTD.

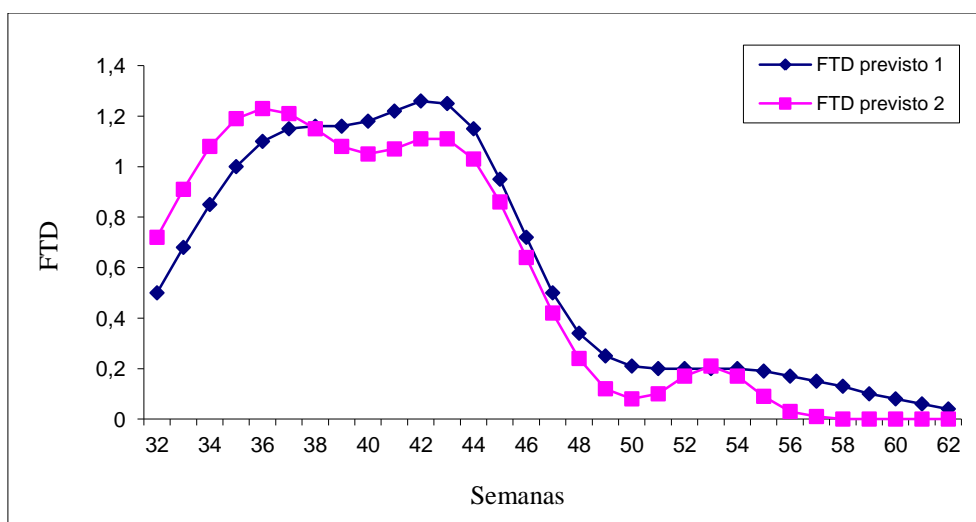


Figura 4 – Previsão da dinâmica populacional de *C. capitata* no primeiro (1) e segundo (2) ano em estudo. Cada curva foi obtida através da equação (1) usando os valores dos coeficientes estimados. FTD = moscas capturadas por armadilha por dia.

3.2 - Infestação dos frutos

Os resultados da infestação nas amostras de frutos colhidos (diospiros, feijoas e figos) são apresentados na Tabela 3. De uma forma geral verificou-se diferenças

significativas no número de picadas por grama de fruta colhida, isto é, nas amostras de feijoas e de figos, houve uma diminuição significativa no número de picadas por grama de fruto, do ano 2010 em relação ao de 2009, enquanto que no caso dos diospiros os valores foram semelhantes.

No que diz respeito ao número de pupas por grama de fruta colhida, a amostra de feijoas não apresentou diferenças significativas de 2009 para 2010. No entanto, as amostras de diospiros e de figos apresentaram diferenças significativas, uma vez que tanto os diospiros como os figos apresentaram maior número de pupas por grama de fruto em 2010 (Tabela 3).

Tabela 3 – Comparação entre o peso dos frutos, e o número de picadas e de pupas de *C. capitata*, por grama de fruto (média±erro padrão), obtido nos anos de 2009 e 2010.

Ano	Frutos	n	Peso fruto	Nº picadas/g	Nº pupas/g
2009	Diospiros	26	111,97±5,19b	0,047±0,018a	0,004±0,002b
2010		50	164,25±4,60a	0,020±0,002a	0,018±0,003a
2009	Feijoas	50	31,79±1,46b	0,205±0,020a	0,388±0,050a
2010		50	45,00±1,33a	0,079±0,007b	0,276±0,039a
2009	Figos	37	11,08±0,33b	0,913±0,060a	0,000±0,000b
2010		50	32,64±1,48a	0,450±0,039b	0,074±0,014a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula (coluna) não são significativamente diferentes, teste-t com $P < 0,05$, tendo em conta o tipo de fruta e o ano.

Comparando os resultados obtidos em amostras de feijoa colhidas em dois locais, com tratamentos diferentes, Rabo de Peixe (zona com ADRESS[®]) e Ponta Delgada (zona sem ADRESS[®]), verifica-se que o número de picadas por grama, bem como o número de pupas foi reduzido na zona tratada com ADRESS[®] (Tabela 4).

Estes resultados são consistentes com a diminuição da população observada na zona tratada em relação a uma zona sem qualquer tipo de tratamento. O número de pupas por grama de fruto foi inferior, no entanto, não foi estatisticamente significativo.

Tabela 4 – Comparação do número de picadas e de pupas de *C. capitata*, por grama de fruto (média±erro padrão), obtido em feijoa, colhida em dois locais com (RP) e sem (PD) ADRESS[®], no ano de 2010

Ano	Local	n	Peso fruto	Nº picadas/g	Nº pupas/g
2010	PD	50	32,02±1,38b	0,217±0,015a	0,536±0,049a
2010	RP	50	45,00±1,33a	0,079±0,007b	0,276±0,039a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula (coluna) não são significativamente diferentes, teste-t com $P < 0,05$

4. Discussão

Está demonstrado que a ingestão de lufenurão por fêmeas de *C. capitata* provoca a redução de emergência dos seus ovos. Do mesmo modo reduz a viabilidade dos ovos de fêmeas que acasalam com machos tratados com aquele insecticida (Casaña-Giner *et al.*, 1999; Navarro-Llopis, *et al.*, 2009).

As armadilhas de esterilização ADRESS[®], contendo lufenurão, instaladas em Rabo de Peixe, têm como principal objectivo reduzir a população de *C. capitata*, e assim reduzir os focos de maior densidade populacional desta praga.

Os resultados obtidos neste estudo são ainda muito escassos, pois com este tipo de abordagem a redução da população é progressiva e cumulativa ao longo dos anos (Navarro-Llopis, *et al.*, 2009), daí que se obtenham resultados mais imediatos,

recorrendo a tratamentos com insecticidas como o malatião e, mais recentemente, com o spinosade (Peck e McQuate, 2000; McQuate, *et al.*, 2005).

De acordo com Navarro-Llopis, *et al.* (2009), para se obter um efectivo controlo da praga com o sistema ensaiado é necessário que esta se mantenha activa no campo durante o maior período de tempo possível, o que tendo em conta as condições climáticas dos Açores e o tipo de fruteiras existentes em Rabo de Peixe, nos permite esperar resultados muito satisfatórios.

Em relação aos danos causados nos frutos, os resultados obtidos ainda não são muito expressivos, no entanto, de um modo geral, observou-se uma redução no número de picadas e de pupas de *C. capitata* obtidas. Para uma melhor avaliação, encontra-se neste momento em curso a mesma abordagem tendo em conta outras espécies de fruta hospedeiras de *C. capitata*. Este estudo será efectuado durante todo o tempo em que decorrer o projecto ADRESS[®] em Rabo de Peixe, bem como a recolha de outras amostras de frutas em zonas sem qualquer tratamento (controlo). Os pomares da zona onde foi efectuado o estudo, caracterizam-se pela presença de diversas espécies de árvores de fruta, o que se torna o pior cenário para o controlo de *C. capitata*, uma vez que esta praga encontra hospedeiros durante praticamente todo o ano. Além disso, a existência de hospedeiros silvestres próximos destes pomares, como a *Solanum mauritianum* Scop., (Pimentel, 2010), agrava o problema da regulação da densidade populacional (Malavasi, 1980).

Este trabalho demonstrou que o uso do sistema ADRESS[®] poderá ser efectivo na redução das populações de *C. capitata* tendo em conta os resultados obtidos no índice de eficácia anual e na análise dos danos da infestação dos frutos, que indicam que o efeito cumulativo quimioesterilizante ocorre ano após ano. No entanto, considerando

que as capturas de adultos de *C. capitata* diferem de ano para ano, devido a factores biológicos e climáticos, os resultados obtidos até ao momento ainda são considerados como preliminares, mas podem ser encarados como promissores. Tornam-se, por isso, necessários mais anos de aplicação deste método de controlo em São Miguel, de modo a que os resultados obtidos sejam mais fiáveis e se possa apresentar com maior garantia os benefícios do seu uso.

Agradecimentos: Agradecemos à Direcção Regional do Desenvolvimento Agrário a possibilidade de integração neste estudo dos resultados obtidos nas unidades de controlo ADRESS[®] na zona de Rabo de Peixe.

5. Referências Bibliográficas

- Aguiar, A., Godinho, M., Costa C.; (2005); *Produção Integrada*; Sociedade Portuguesa de Inovação; Porto; 104 pp.
- Amaro, P.; (2003); *A Protecção Integrada*; ISA/Press, Lisboa; 458 pp.
- Calkins, C., Malavasi A.; (1995); Biology and control of fruit flies (*Anastrepha*) in tropical and temperate fruits. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 17: 36-45.
- Casana-Giner, V., Gandia-Balaguer, A., Mengod-Puerta, C., Primo-Millo, J., Primo-Yufera, E.; (1999); Insect growth regulators as chemosterilants for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 92, 303–308.
- Christenson, L., Foote, R.; (1960); Biology of fruit flies; *Annual review of entomology*5: 171-192.
- Ciolfi, S., Filippis, T., Torti, C., Malacrida, A., Dallai, R.; (2005); Molecular characterization and chromosomal localization of female-specific genes from the Mediterranean fruit fly

- Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae); *National Research Council Genome*, 48:(1) 139-144, 10.1139/g04-080.
- Copeland, R., Wharton, R., Luke, Q., De Meyer, M.; (2002); Indigenous hosts of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Kenya. *Annals of Entomological Society America* 95, 672-694.
- Enkerlin, W., Mumford, J.; (1997); Economic evaluation of three alternative methods for control of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Israel, Palestinian Territories, and Jordan. *Journal of Economic Entomology* 90: 1066–1072.
- Joachim-Bravo, I., Guimarães, A., Magalhães, T., Nascimento, A.; (2010); Performance de *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) em Frutos: Comparação de Duas Populações Criadas em Laboratório; *Neotropical Entomology* 39(1):009-014.
- Liquido, N., Barr, P., Cunningham, R.; (1998); Med host, an encyclopedic bibliography of the host plants of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann). In “Fruit Fly Expert Identification System and Systematic Information Database” (F. C. Thompson, Ed.). Volume 1, Diptera Data Dissemination Disk. North American Dipterists Society, Smithsonian, Washington, D.C.
- Lopes, D., Pimentel, R., Nunes, L., Costa, R., Silva, N., Dantas, L., Mumford, J., Mexia, A.; (2005); A mosca-do-Mediterrâneo (*Ceratitis capitata* Wied.) (Diptera: Tephritidae) nos pomares da Ilha Terceira, Açores; A Fruticultura na Macaronesia: O contributo do projecto Interfruta para o seu desenvolvimento.
- Malacrida, A., Gomulski, L., Bonizzoni, M., Bertin, S., Gasperi, G., Guglielmino, C.; (2007); Globalization and fruit fly invasion and expansion: the medfly paradigm. *Genetica*, 131:1-9.
- Malavasi, A.; (1980); Biologia de moscas-das-frutas (Díptera: Tephritidae). II: Índices de infestação em diferentes hospedeiros e localidades; *Revista Brasileira de Biologia*, v. 40, n. 1, p. 17–24.
- McQuate, G., Peck, S., Barr, P., Sylva, C.; (2005); Comparative evaluation of spinosad and ploxin B as toxicants in protein bait for suppression of three fruit flies (Diptera: Tephritidae) species. *Journal of Economic Entomology* 98:1170–1178.
- Medeiros, A.; (2004); Bioecologia e controlo com nematodes entomopatogénicos de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) em S. Miguel. M.S. Thesis, Universidade dos Açores, Açores. 72 pp.

- Moreno, D., Mangan, R., (2000); Novel insecticide strategies such as phototoxic dyes in adult fruit fly control and suppression programmes, p.421-432. In K. Tan (ed.), Area-wide control of fruit flies and other insect pests. Pulau Pinang, Penerbit Universiti Sains Malaysia, 782p.
- Moya, P., Flores, S., Ayala, I., Sanchis, J., Montoyab P., Primoa J.; (2010); Evaluation of lufenuron as a chemosterilant against fruit flies of the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae); *Pest Management Science*; 66: 657–663.
- Nascimento, A., Carvalho, R.; (2000); Manejo integrado de mosca-das-frutas p.169-174. In Malavasi A, Zucchi R A Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto, Holos, 324p.
- Navarro-Llopis, V., Domínguez-Ruiz, J., Zarzo, M., Alfaro, C., Primo, J.; (2009); Mediterranean fruit fly suppression using chemosterilants for area-wide integrated pestmanagement; *Pest Management Science*; 66: 511– 519.
- Navarro-Llopis, V., Sanchis, J., Primo-Millo, J., Primo-Yúfera, E.; (2007); Chemosterilants as control agents of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in field trials; *Bulletin of Entomological Research* 97, 359–368
- Peck, S., McQuate. G., (2000); Field test of environmental friendly malathion replacements to suppress wild Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) populations; *Journal of Economic Entomology* 93:280–289.
- Piedade-Guerreiro, J.; (1987); A mosca da fruta *Ceratitis capitata* Wiedemann, (Diptera: Tephritidae) e a sua esterilização por meio de radiações ionizantes; Ph.D. thesis, Universidade dos Açores, Açores.
- Pimentel, R.; (2010); Contributo para o conhecimento da mosca-do-Mediterrâneo (*Ceratitis capitata* Wiedemann) (Díptera: Tephritidae) na ilha Terceira); Ph.D. thesis, Universidade dos Açores.
- SPSS Inc., (2006). SPSS advanced modelsTM. Chicago, IL, USA
- Zar, J.; (1996); Biostatistical Analysis. 3rd ed. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ.718 pp.

II. Impacto do complexo *Steinernema carpocapsae/Xenorhabdus nematophila* na indução de genes de resposta imune por *Ceratitidis capitata*

Resumo

Ceratitidis capitata, designada vulgarmente por mosca-do-Mediterrâneo é um insecto polífago, pois apresenta uma vasta gama de hospedeiros, constituindo assim, uma séria ameaça a nível mundial como praga de frutas frescas, uma vez que acarreta graves prejuízos económicos na sua produção. Como alternativa ao uso de insecticidas, a utilização de nemátodes entomopatogénicos num programa de Protecção Integrada desta praga revela-se de grande importância. Como tal, o estudo do seu comportamento e de mecanismos subjacentes à infecção por nemátodes entomopatogénicos torna-se de elevado interesse. Com este propósito, foi avaliado o impacto do complexo *Steinernema carpocapsae* / *Xenorhabdus nematophila* na indução de genes de resposta imune, por *C. capitata*. Este trabalho permitiu a identificação de linhas orientadoras para estudos futuros, no que diz respeito a programas de PCR (Reacção em Cadeia da Polimerase) para amplificação de genes de resposta imune da via *Imd*, a *cecropina*, e da via *toll*, com os respectivos controlos endógenos, actina e tubulina. Foi possível amplificar o conjunto *cecropina* e actina a uma temperatura de *annealing* de 60°C, e de 55°C para o conjunto *toll* e tubulina.

Palavras-chave: Nemátodes entomopatogénicos; *Steinernema carpocapsae*; *Ceratitidis capitata*; genes de resposta imune; via *toll*; via *Imd*

1. Introdução

A mosca-do-Mediterrâneo, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann), é reconhecida em todo o mundo como uma das principais pragas, no que se refere à produção de frutos. *C. capitata* é polífaga e encontra-se distribuída em diferentes regiões biogeográficas,

estando altamente adaptada a diferentes ecossistemas, causando diversos danos nas frutas (Rohde, *et al.*,2010).

Os nemátodes entomopatogénicos (EPN) são conhecidos desde o século XVII, mas foi apenas na década dos anos 30 do séc. XX que foi dada séria consideração ao uso deste tipo de nemátodes para o controlo de insectos (Smart, 1995). Estes nemátodes ocorrem naturalmente no solo e, juntamente com as suas bactérias simbióticas são patógenos letais de muitos insectos, com fases do seu ciclo de vida no solo (Griffinet *al.*, 2005). Existe por todo o mundo interesse na utilização de EPN como agentes de controlo biológico, uma vez que são seguros de usar, fáceis de produzir em massa e a sua aplicação pode ser realizada mediante equipamento de pulverização padrão (Wright *et al.*, 2005). Diversas espécies de insectos, incluindo *C. capitata*, foram enunciadas como sendo susceptíveis a EPN (BeaverseCalkins, 1984; Lindegrenetal, 1990; PattersonLacey, 1999; PionareHislop,1981;Toledoetal, 2006; YeeeLacey, 2003).

Como consequência da sua importância do ponto de vista agrícola e económico, o estudo de *C. capitata*, tem sido, de entre as moscas pragas de frutas, o mais aprofundado, tanto a nível genético como molecular (Gasperi *et al*, 2002;. Gomulski *et al*, 2004;. Malacrida *et al*, 2007), o que tem permitido a identificação e o estudo de genes envolvidos em numerosos processos biológicos deste insecto (Gomulski *et al.*, 2008).

Os insectos desenvolveram uma forte e diversificada imunidade, a fim de se defenderem contra microorganismos de diversas origens, tais como bactérias, fungos ou vírus (Ferrandon *et al*, 2007; Kemp e Imler, 2009). O sistema imunológico do insecto envolve reacções de defesa celular e humoral que incluem fagocitose (Costa *et al.*, 2005) encapsulamento e formação de nódulos (Cruz *et al*, 2001; Russo *et al*, 1996),

coagulação (Theopold *et al.*, 2004), melanização (Kanost *et al.*, 2004) e indução de genes de resposta imune (Lemaitre e Hoffmann, 2007), dependendo do número, tamanho e tipo de microrganismo. No entanto, a defesa imune de insectos é baseada principalmente em factores humorais como genes de resposta imune (PAMs) que matam o patógeno directamente (Gillespie, *et al.*, 1997). Por exemplo, a *Drosophila* spp. utiliza duas vias distintas para controlar a expressão de genes de resposta imune. As bactérias Gram-positivas e fungos patogénicos são conhecidos por estimularem a via *toll* (Lemaitre *et al.*, 1997) enquanto que as bactérias Gram-negativas estimulam a via *Imd* (Lemaitre *et al.*, 1995).

A partir da descoberta do primeiro gene de resposta imune encontrado na hemolinfa de pupas de *Hyalophora cecropia* (Steiner *et al.*, 1981), que têm sido isolados e caracterizados um grande número de tais factores em várias espécies de insectos. Esses genes são classificados em cinco grandes grupos. A *cecropina* é um dos grupos de genes de resposta imune melhor estudados e generalizada a uma variedade de organismos, pois mostra uma actividade de amplo espectro contra os dois grupos de bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas. A expressão da *cecropina* é principalmente regulada pela via *Imd* (Wang, *et al.*, 2007).

Uma vez que o uso de nemátodes é promissor para o controlo de *C. capitata*, o estudo de mecanismos ligados à defesa imune destes insectos torna-se importante para o conhecimento do complexo nemátode-bactéria aquando da infecção de *C. capitata*.

Neste estudo, tivemos como objectivos: i) confirmar a presença de nemátodes entomopatogénicos em insectos adultos de *C. capitata*, quando estes foram infectados na fase larvar (L3), bem como a sua presença em pupas vivas de *C. capitata*; ii) confirmar a presença de *X. nematophila* em pupas e adultos de *C. capitata* infectados; e

iii) analisar o impacto do complexo *S. carpocapsae/X. nematophila* na expressão de genes de resposta imune. No entanto, o principal objectivo deste trabalho, incidiu na criação de linhas orientadoras para estudos futuros, no que diz respeito a programas de PCR para amplificação de genes de resposta imune encontrados em *C. capitata*.

A informação genética obtida será importante para a melhoria dos métodos de controlo desta praga ou para o desenvolvimento de estratégias de controlo que permitem reduzir os danos causados por esta praga na agricultura.

2. Material e Métodos

2.1 - Infecção de Larvas L3 de *C. capitata*

Os nemátodes entomopatogénicos foram isolados nos Açores e pertencem à colecção de nemátodes entomopatogénicos da Universidade dos Açores. Estes nemátodes são mantidos em água a 10 °C e cultivados a cada seis meses em larvas no último estado de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae), de acordo com a metodologia utilizada por Dutky *et al.* (1964), e conservados no máximo durante seis semanas, até serem utilizados. Sete isolados de nemátodes, recolhidos nos Açores, foram testados: *S. carpocapsae* (Az150, Az157 e R1), e *Heterorhabditis bacteriophora* (Az29, Az36, Az144 e Az148).

As larvas de *C. capitata* foram criadas em laboratório com uma dieta artificial, de acordo com a metodologia descrita por Albajes e Santiago-Álvarez (1980).

Os bioensaios foram realizados em copos de plástico de 60 cm³ de volume, contendo 15 cm³ de areia seca esterilizada (48 h, a 50 °C). Em cada copo, foi colocado 1 ml da suspensão de nemátodes com 300 IJs, no ponto médio da superfície da areia. Para

homogeneizar a humidade, foram adicionados 0,5 ml de água destilada à areia, originando uma humidade final, correspondente a 10,0% (v/v), tendo em conta a quantidade de água da suspensão de nemátodes. Nos controlos a suspensão de nemátodes foi substituída por igual volume de água estéril.

2.1.1 - Bioensaio – Selecção dos melhores isolados contra *C. capitata*

Foi feito um teste com os sete isolados acima referidos, a três temperaturas diferentes: 15, 20 e 25 °C. Para tal foi colocado 1 ml da suspensão de nemátodes com 300 IJs, no ponto médio da superfície da areia, tal como descrito anteriormente. Vinte e quatro horas depois, foi colocada uma larva do terceiro estado de *C. capitata* sobre a superfície de areia. Cada copo foi fechado com a respectiva tampa de plástico para manter a humidade e colocado à temperatura correspondente. Cada combinação insecto/isolado/temperatura foi repetida duas vezes. Em cada combinação usaram-se 15 insectos por repetição. Após o período de emergência, foi contabilizado o número de adultos emergidos e os mesmos foram dissecados de forma a averiguar a presença de nemátodes no seu interior. As pupas das quais não emergiram adultos (pupas mortas) foram contabilizadas e verificada, também, a presença de nemátodes.

Os adultos que emergiram foram contabilizados. Para verificar a presença de nemátodes no seu interior, os insectos foram cuidadosamente lavados em água corrente e dissecados. Quando a presença de nemátodes se confirmou, estes foram retirados e os insectos (sem as asas), conservados a – 80°C para serem submetidos à detecção da bactéria simbiote e à análise de genes de defesa por PCR.

Para a confirmação da presença de bactéria simbiote, *X. nematophila*, bem como a análise da expressão de genes de resposta imune, nomeadamente *toll* e

cecropina, em pupas provenientes de larvas infectadas, efectuou-se paralelamente um ensaio, utilizando a metodologia anteriormente descrita. Seis dias após a infecção as pupas foram dissecadas e quando foi confirmada a presença de um número reduzido de nemátodes (1 ou 2) no seu interior, estas foram imediatamente conservadas a – 80 °C.

2.2 – RT-PCR

Foi realizado RT-PCR a fim de verificar a expressão de genes de resposta imune, tanto nas amostras de pupas como nas de adultos obtidas anteriormente. Para tal, a estas amostras que se encontravam congeladas a – 80°C foi extraído o RNA total com TRIzol® (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante deste reagente. Os RNAs extraídos foram solubilizados em 25µl de água DEPC. Foram usados 3µl de RNA na Retro Transcrição, usando SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen), com o *primer* do 16 S para ser utilizado no posterior PCR do 16 S e com *primers* aleatórios para subsequente PCR da análise de expressão de genes de resposta imune. Os cDNAs foram diluídos em 1µl de RNase H, para que as reacções subsequentes de PCR não fossem inibidas pelos componentes da preparação RT.

2.3 - Confirmação da presença de *Xenorhabdus nematophila*

O PCR para confirmação da presença de *X. nematophila* em pupas e em adultos de *C. capitata*, foi feito com 5µl de cDNA e utilizado um primer específico para o 16SrRNA de *X. nematophilus*, (forward 5' –GGAGAGTTTGATCATGGCTC -3'); (reverse 5'-AAGGAGGTCATCCAGCCGCA-3'). As condições de PCR utilizadas foram 1 ciclo de 2 min a 94 °C, 30 ciclos de 30 sec a 94 °C, 30 sec a 55 °C e 50 sec a 72

°C e por fim 1 ciclo de 7 min a 72 °C. A confirmação dos produtos de PCR foi feita numa electroforese em 1% de agarose.

2.4 - Confirmação da expressão de genes de resposta imune

O PCR para análise de expressão de genes de resposta imune nas amostras de pupas e adultos foi efectuado utilizando o *primer* de um gene regulado pela via *Imd*, a *cecropina* (forward 5' – GGTCCCCGCGTCTTAAACAG – 3'; reverse 5' – CGTATCTTGGTAATGAAGCTCGC – 3'), utilizando como controlo endógeno a actina (forward 5' – GGGACGATATGGAGAAGATCTGGC – 3'; reverse 5' – ACGGTCCATGGCCACATACATGGC – 3') e por um *primer* do gene *toll* (forward – 5' GCTTTCGTCTCGTACTC – 3'; reverse 5' – GCCTGTAACCTCGCTATCC – 3'), tendo como controlo endógeno a tubulina (forward 5' – TCGTCGAATGGATTCCAAAT – 3'; reverse 5' – TTTCATCCATACCTTCGCCTG – 3'). Os controlos endógenos foram seleccionados para cada gene de acordo com a temperatura de melting: *cecropina* + actina – aproximadamente 60 °C e *toll* + tubulina – aproximadamente 55 °C.

Para o PCR efectuado com os *primers* da *cecropina* e da actina, foi utilizado 4µl de cDNA e as condições foram as seguintes: 1 ciclo de 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 30 sec a 94 °C, 30 sec a 60 °C e 30 sec a 72 °C e por fim 1 ciclo de 5 min a 72 °C. Para o PCR efectuado com os *primerstoll* e da tubulina, foi utilizado 4µl de cDNA e as condições foram as seguintes: 1 ciclo de 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 30 sec a 94 °C, 30 sec a 55 °C e 30 sec a 72 °C e por fim 1 ciclo de 5 min a 72 °C.

A confirmação dos produtos de PCR foi feita em electroforese em 2% de agarose.

3. Resultados

3.1 - Infecção causada por 7 isolados de EPN em larvas de *C. capitata*

A infecção de larvas L3 de *C. capitata*, com os sete isolados de nemátodes de *S. carpocapsae* de *H. bacteriophora* às diferentes temperaturas, originou resultados distintos no que se refere ao número de pupas mortas ($\chi^2=58,0$; $df=7$; $P<0,001$ $\chi^2=58,1$; $df=7$; $P<0,001$ $\chi^2=51,4$; $df=7$; $P<0,001$, respectivamente a 15, 20 e 25°C), bem como o número de pupas que estavam infectadas com a presença de nemátodes ($\chi^2=25,1$; $df=6$; $P<0,001$, $\chi^2=57,7$; $df=6$; $P<0,001$ e $\chi^2=19,9$; $df=6$; $P=0,03$, respectivamente a 15, 20 e 25°C) (Tabela 1 e 2). Os isolados que causaram maior mortalidade nas três temperaturas estudadas, foram Az29, Az148 (*H. bacteriophora*) e Az150 (*S. carpocapsae*).

Ao dissecar os adultos emergidos dos diferentes tratamentos, verificou-se que os provenientes de larvas infectadas com isolados de *S. carpocapsae* (Az150, Az157 e R1), a 15 e 20°C, apresentavam nemátodes vivos no seu interior (Tabela 3). A 25°C não foram detectados adultos vivos com nemátodes, enquanto que a 20°C, esta percentagem foi reduzida (<16%) e sem diferença significativa entre os diferentes isolados ($\chi^2=3,6$; $df=5$; $P=0,605$). A 15°C observou-se uma elevada percentagem de adultos com nemátodes (>65%) nos tratamentos com os isolados de *S. carpocapsae*. A esta temperatura observou-se uma diferença significativa entre tratamentos ($\chi^2=32,0$; $df=5$; $P<0,001$).

Tabela 1 – Percentagem de mortalidade nas pupas provenientes de larvas infectadas com os diferentes isolados testados à temperatura de 15, 20 e 25 °C.

Mortalidade nas pupas (%)				
Tratamento	n	15°C	20°C	25°C
Controlo	30	20,0a	23,3a	13,3a
Az29	30	93,3b	90,0b	73,3bc
Az36	30	50,0ac	63,3bc	16,7a
Az144	30	80,0bc	76,7bd	46,7acd
Az148	30	73,3bc	96,7b	83,3b
Az150	30	70,0bc	63,3bc	56,7bde
Az157	30	33,3a	46,7acd	43,3ace
R1	30	80,00bc	36,7ac	36,7ae

Percentagens seguidas pela mesma letra minúscula (coluna) não são significativamente diferentes, Kolmogorov-smirnov com $P < 0,05$.

Tabela 2 – Percentagem de pupas mortas em que se verificou a presença de nemátodes no seu interior, provenientes de larvas infectadas com os diferentes isolados testados à temperatura de 15, 20 e 25 °C.

Presença de nemátodes nas pupas mortas (%)						
Tratamento	n	15°C	n	20°C	n	25°C
Az29	28	96,4b	27	85,2bc	22	95,5a
Az36	15	60,0ab	19	94,7bc	5	100,0a
Az144	24	83,3ab	23	87,0bc	14	85,7a
Az148	22	95,5b	29	100,0b	25	96,0a
Az150	21	85,7ab	19	21,1a	17	58,8a
Az157	10	20,0a	14	50,0ac	13	100,0a
R1	24	62,5a	11	36,4a	11	90,9a

Percentagens seguidas pela mesma letra minúscula (coluna) não são significativamente diferentes, Kolmogorov-smirnov com $P < 0,05$. n= ao número de pupas das quais não emergiram adultos nos vários tratamentos.

Tabela 3 – Percentagem de adultos de *C. capitata* com nemátode no seu interior, de entre aqueles que emergiram, provenientes de larvas infectadas com os diferentes isolados testados à temperatura de 15, 20 e 25 °C.

Adultos c/ nemátodes no seu interior (%)						
	n	15 °C	n	20 °C	n	25 °C
Az29	2	0,0a	3	0,0a	8	0,0a
Az36	15	0,0a	11	0,0a	25	0,0a
Az144	6	0,0a	7	0,0a	16	0,0a
Az148	8	0,0a	1	0,0a	5	0,0a
Az150	9	66,7b	11	9,1a	13	0,0a
Az157	20	65,0b	16	6,3a	17	0,0a
R1	6	83,3b	19	15,8a	19	0,0a

Percentagens seguidas pela mesma letra minúscula (coluna) não são significativamente diferentes, Kolmogorov-smirnov com $P < 0,05$. n= ao número de adultos emergidos nos vários tratamentos.

3.2 - Confirmação da infecção por *Xenorhabdus nematophila*

Todas as pupas e adultos de *C. capitata* foram analisados para a presença de nemátodes através de observação microscópica e nas pupas e adultos vivos em que isto se verificou, foi analisada a presença da bactéria simbiote por PCR. Observou-se a presença de nemátodes num total de 14 pupas e 7 adultos, obtidos a partir do bioensaio anterior, infectadas com R1. A confirmação da presença da bactéria simbiote *X.nematophila* foi feita através da identificação da presença do gene 16 S da bactéria. Verificou-se que em todos as pupas e adultos a bactéria simbiote estava presente e activa (Figura 1).

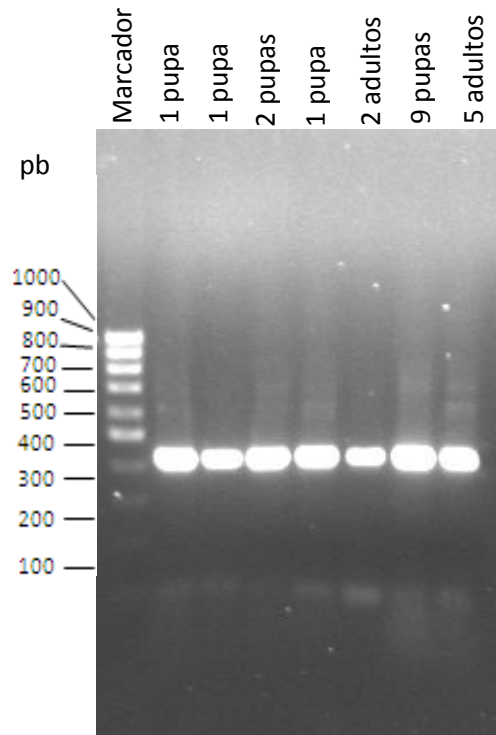


Figura 1—Fotografia do gel resultante da electroforese que permite confirmar a presença da bactéria simbiote *X. nematophila*, em pupas e adultos de *C. capitata*, infectados com nemátodesdo isolado R1 (*S. carpocapsae*), na fase larvar, nomeadamente L3. A separação deste gene foi efectuada em gel de Agarose 1%.

3.3 - Identificação da resposta imune de *C. capitata* à infecção

Para a confirmação da expressão de genes de resposta imune, relacionados com as vias *Imd* e *toll*, foram utilizados os genes *cecropina* e *toll*, respectivamente. Para tal foi confirmada a sua presença nas amostras de pupas e de adultos, obtidas através do bioensaio e as mesmas foram comparadas com o seu controlo. Assim, confirmou-se a expressão do gene da *cecropina* nos controlos de uma pupa, bem como em uma pupa infectada, no conjunto controlo de dois adultos e no conjunto de cinco adultos infectados, bem como o seu controlo.

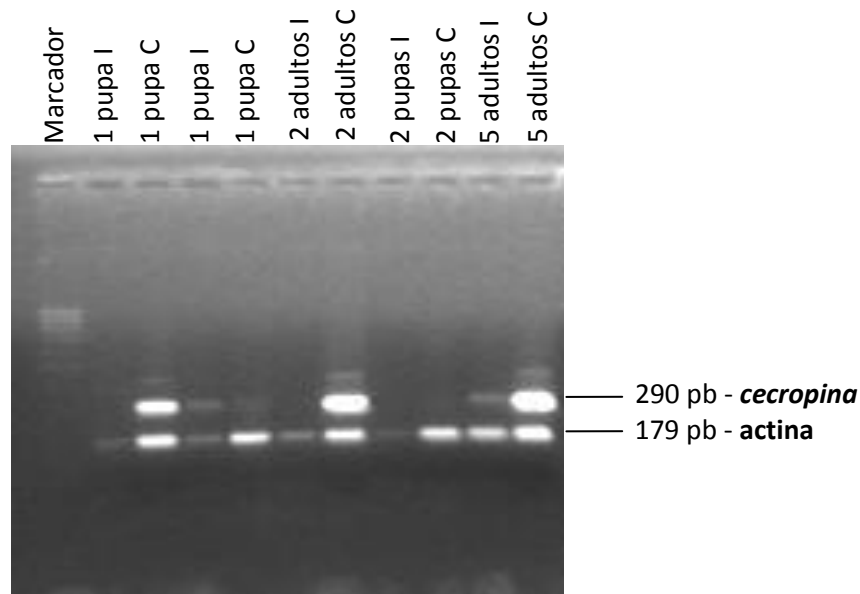


Figura 2 – Fotografia do gel resultante da electroforese que permite confirmar a expressão do gene de resposta imune *cecropina* e do seu controlo endógeno, actina. As designações “I” na legenda referem-se a pupas ou adultos infectados e as “C” aos respectivos controlos desses organismos. A confirmação da amplificação destes genes foi efectuada em gel de Agarose 2%.

A confirmação da expressão do gene *toll*, só foi feita em pupas infectadas e comparada com os seus controlos. Foi também efectuada para o gene *toll* isolado e para este em conjunto com o da tubulina como controlo endógeno. Em ambos os conjuntos de pupas infectadas verificou-se a expressão do gene *toll* (Figura 3).

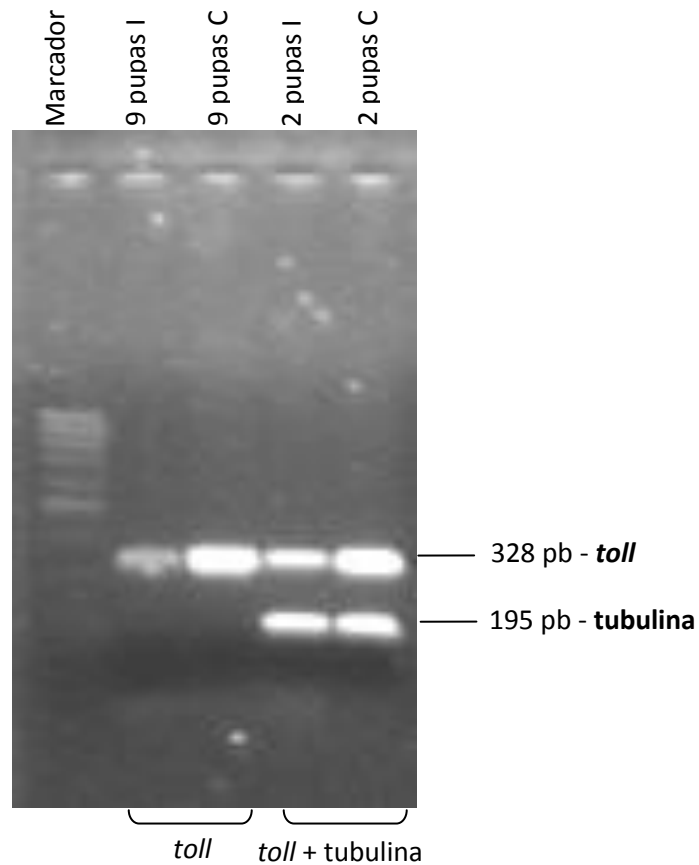


Figura 3 – Fotografia do gel resultante da electroforese que permite confirmar a expressão do gene de resposta imune *toll* testado em 9 pupas de *C. capitata* infectadas (9 pupas I) com nemátodes do isolado R1 (*S. carpocapsae*), na fase larvar, nomeadamente L3, e o seu controlo correspondente (9 pupas C). Para o conjunto de 2 pupas de *C. capitata* infectadas (2 pupas I), bem como para o seu controlo (2 pupas C), foi confirmada a expressão do mesmo gene *toll*, em conjunto com o gene da tubulina, usado como controlo endógeno. A confirmação da amplificação destes genes foi efectuada em gel de Agarose 2%.

4. Discussão

Este estudo mostrou que as pupas e adultos de *C. capitata* infectados com isolados da espécie *S. carpocapsae* são capazes de sobreviver à infecção, contendo nemátodes e bactérias vivas no seu hemocélio. O facto de se encontrar nemátodes entomopatogénicos no interior de insectos adultos vivos, levanta a questão de como foi possível a sua sobrevivência. De forma a responder a esta questão foi averiguado se o

complexo nemátode/bactéria activava uma resposta imune da parte do insecto que resultasse na expressão de alguns genes de defesa (Karagoz, 2009).

Foi possível realizar o PCR de ambos os genes de resposta imune estudados, com 4µl de cDNA de cada amostra, obtidos a partir da Retro Transcrição com 3µl de RNA. Foi também possível amplificar o conjunto gene e controlo endógeno a 60 °C para a *cecropina* e actina e a 55 °C para o *toll* e a tubulina.

Para se protegerem de reacções de defesa celular e humoral por parte dos insectos infectados, quer os nemátodes quer as bactérias, secretam genes de virulência com actividade imuno-supressora (Karagoz *et al.*, 2009). Futuramente seria interessante estudar a expressão de genes de virulência de *X. nematophila*. O *primer* 16 S já está optimizado para este estudo e por isso poderá ser utilizado como controlo endógeno. Seria também importante estudar o “mecanismo da transglutaminase” para verificar se o insecto está a responder aos nemátodes (Hyrsl *et al.*, 2010).

5. Referências Bibliográficas

- Beavers, J., Calkins, C.; (1984); Susceptibility of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) to steinernematid and heterorhabditid nematodes in laboratory studies; *Environmental Entomology* 13, 137–139.
- Costa, S., Ribeiro, C., Girard, P., Zumbihl, R., Brehelin, M.; (2005); Modes of phagocytosis of Gram-positive and Gram-negative bacteria by *Spodoptera littoralis* granular haemocytes; *Journal of Insect Physiology* 51, 39 – 46.
- Cruz, N., Rosa, J., Simoes, N.; (2001); Encapsulation response of 6th instar of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae); *Journal of Invertebrate Pathology* 78, 272–274.

- Dutky, S.; Thompson, J.; Cantwell, G.; (1964); A Technique for the Mass Propagation of the DD136 nematode. *Journal Insect Pathology*, 6: 417-422.
- Ferrandon, D., Imler, J., Hetru, C., Hoffmann, J.; (2007); The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signaling during bacterial and fungal infections. *Nature Reviews Immunology* 7, 862–874.
- Gasperi, G., Bonizzoni, M., Gomulski, L., Murelli, V., Torti, C., Malacrida, A., Guglielmino, C.; (2002); Genetic differentiation, gene flow and the origin of infestations of the medfly, *Ceratitidis capitata*; *Genetica* 116, 125–135.
- Gillespie, J., Kanost, M., Trenczek, T. (1997); Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* 42, 611–643.
- Gomulski, L., Dimopoulos, G., Xi, Z., Soares, M., Bonaldo, M., Malacrida, A., Gasperi, G.; (2008); Gene discovery in an invasive tephritid model pest species, the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*; *BMC Genomics* 9, 243.
- Gomulski, L., Torti, C., Murelli, V., Bonizzoni, M., Gasperi, G., Malacrida, A.; (2004); Medfly transposable elements: diversity, evolution, genomic impact and possible applications; *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 139–148.
- Griffin, C., Boemare, N., Lewis, E.; (2005); Biology and behaviour. In: Greval, P.S., Ehlers, R.-U., Shapiro-Ilan, D.I. (Eds.), *Nematodes as Biocontrol Agents*. CABI Publishing, pp. 47–64
- Hominick, W.; (2002); Biogeography. In: Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 115–143.
- Hyrsl, P., Dobes, P., Wang, Z., Hauling, T., Wilhelmsson C., Theopold, U; (2010); Clotting Factors and Eicosanoids Protect against Nematode Infections; *Journal of Innate Immunity* DOI: 10.1159/000320634.
- Kanost, M., Jiang, H., Yu, X.; (2004); Innate immune responses of a lepidopteran insect *Manduca sexta*; *Immunological Reviews* 198, 97–105.
- Karagoz, M., Gulcu, B., Hazir, C., Kaya, H., Hazir S.; (2009); Biological control potential of Turkish entomopathogenic nematodes against the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. *Phytoparasitica* 37:153–159.
- Kaya, H., Aguilera, M., Alumai, A., Choo, H., Torre, M., Fodor, A., Ganguly, S., Hazâr, S., Lakatos, T., Pye, A., Wilson, M., Yamanaka, S., Yang, H., Ehlers, R.U.; (2006); Status

of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world; *Biological Control* 38, 134–155.

Kemp, C., Imler, J.; (2009); Antiviral immunity in *Drosophila*; *Current Opinion in Immunology* 21, 3–9.

Lemaitre, B., Hoffmann, J.; (2007); The host defense of *Drosophila melanogaster*; *Annual Review of Immunology* 25,697–743.

Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1995). A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense; *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92, 9465–9469.

Lemaitre, B., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94, 14614–14619.

Lindgren, J., Wong, T., McInnis, D.; (1990); Respons of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* in field tests in Hawaii; *Environmental Entomology* 19, 383–386.

Malacrida, A., Gomulski, L., Bonizzoni, M., Bertin, S., Gasperi, G., Guglielmino, C.; (2007); Globalization and fruitfly invasion and expansion: the medfly paradigm. *Genetica* 131, 1–9.

Medeiros, J., Rosa, J., Tavares, J., Simoes, N.; (2000); Susceptibility of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) to entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) isolated in the Azores: effect of nematode strain and host age; *Journal of Economic Entomology* 93,1403 – 1408.

Patterson Stark, J., Lacey, L.; (1999); Susceptibility of western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae) to five species of entomopathogenic nematodes in laboratory studies; *Journal of Invertebrate Pathology* 72, 204–208.

Poinar Jr., G., Hislop, R.; (1981); Mortality of Mediterranean fruit fly adults *Ceratitits capitata* from parasitic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* spp. *IRCS. Microbiology Parasitology and Infectious Disease* 9, 641 –652.

Rohde, C., Moino JR, A., Silva, M., Carvalho, F., Ferreira, C.; (2010); Influence of Soil Temperature and Moisture on the Infectivity of Entomopathogenic Nematodes

- (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) against Larvae of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae); *Neotropical Entomology* 39(4):608-611.
- Russo, J., Dupas, S., Frey, F., Carton, Y., Brehelin, M.; (1996); Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*; *Parasitology* 112(Pt1), 135–142.
- Simoes, N., Caldas, C., Rosa, J., Bonifassi, E., Laumond, C.; (2000); Pathogenicity caused by high virulent and low virulent strains of *Steinernema carpocapsae* to *Galleria mellonella*; *Journal of Invertebrate Pathology* 75,47–54.
- Smart, JR. G.; (1995); Entomopathogenic Nematodes for the Biological Control of Insects; *Supplement to the Journal of Nematology* 27(4S):529-534.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., Boman, H.G.; (1981); Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292, 246–248.
- Theopold, U., Schmidt, O., Soderhall, K., Dushay, M.S.; (2004); Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing; *Trends in Immunology* 25, 289–294.
- Toledo, J., Rasgado, M., Ibarra, J., Gómez, A., Liedo, P., Williams, T.; (2006); Infection of *Anastrepha ludens* following soil applications of *Heterorhabditis bacteriophora* in a mango orchard; *Entomologia Experimentalis et Applicata* 119, 155–162.
- Toledo, J., Rojas, R., Ibarra, J.; (2006); Efficiency of *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae) on *Anastrepha serpentina* (Diptera: Tephritidae) larvae under laboratory conditions; *Florida Entomologist* 89, 524–526.
- Wang L., Li, Z., Du, C., Chen, W., Pang, Y.; (2007); Characterization and expression of a cecropin-like gene from *Helicoverpa armigera*; *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 148, 417–425
- Wright, D., Peters, A., Schroer, S., Fife, J.; (2005); Application technology. In: Grewal, P.S., Ehlers, R.-U., Shapiro-Ilan, D.I. (Eds.), *Nematodes as Biocontrol Agents*. CABI Publishing, pp. 91–106.
- Yee, W., Lacey, L.; (2003); Stage-specific mortality of *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae) exposed to three species of *Steinernema* nematodes; *Biological Control* 27, 349–356.

3. Conclusões Gerais

Os resultados obtidos neste estudo vêm confirmar a importância de *C. capitata* em São Miguel como praga das fruteiras. É uma praga que apresenta valores de densidade populacional elevados nesta Região e que por isso deve ser tomada como relevante para a fruticultura.

Medidas de controlo alternativo ao uso de insecticidas, como os estudados neste trabalho, devem ser tidos em conta em programas de Protecção Integrada. Se o controlo de *C. capitata* com nemátodes entomopatogénicos, conduz a resultados promissores para a redução dos níveis populacionais, o controlo com esterilizantes químicos, nomeadamente o ADRESS[®], proporciona uma acção preventiva no controlo da praga, tendo em conta a redução efectiva da sua população.

Os resultados obtidos ao nível da utilização das armadilhas de esterilização ADRESS[®] em Rabo de Peixe nos últimos dois anos, embora sejam promissores, são ainda pouco consistentes, sendo necessários mais anos de utilização deste método de controlo nesta zona.

O estudo de mecanismos de defesa de *C. capitata*, nomeadamente em relação a nemátodes entomopatogénicos, é também de grande importância e devem ser estudados com maior atenção, uma vez que os nematodes entomopatogénicos constituem um promissor agente de controlo biológico desta praga, dado que parte do ciclo de vida de *C. capitata* ocorre no solo, estando por isso relativamente facilitada a acção deste tipo de nemátodes.