



Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical
Mestrado e Doutorado
UNIFAP / EMBRAPA-AP / IEPA / CI-Brasil



BRUNA DAVID BRITO

**ISOLADOS AMAZÔNICOS DE *Metarhizium* SÃO EFICIENTES PARA O
CONTROLE DE IMATUROS E ADULTOS DE *Bactrocera carambolae* Drew &
Hancock (DIPTERA: TEPHRITIDAE)**

MACAPÁ, AP

2017

BRUNA DAVID BRITO

**ISOLADOS AMAZÔNICOS DE *Metarhizium* SÃO EFICIENTES PARA O
CONTROLE DE IMATUROS E ADULTOS DE *Bactrocera carambolae* Drew &
Hancock (DIPTERA: TEPHRITIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGbio) da Universidade Federal do Amapá, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Orientador: Dr. Ricardo Adaime da Silva

Co-Orientador: Dr. Adilson Lopes Lima

MACAPÁ, AP

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

620.5

B862i Brito, Bruna David.

Isolados amazônicos de *Metarhizium* são eficientes para o controle de imaturos e adultos de *Bactrocera carambolae* Drew & Hancock (DIPTERA: TEPHRITIDAE) / Bruna David Brito; orientador, Ricardo Adaime da Silva; coorientador, Adilson Lopes Lima. – Macapá, 2017. 60 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical.

1. Controle biológico. 2. Fungos entomopatogênicos. 3. Moscas-das-frutas. 4. Moscas-da-carambola. I. Silva, Ricardo Adaime da, orientador. II. Lima, Adilson Lopes, coorientador. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

BRUNA DAVID BRITO
ISOLADOS AMAZÔNICOS DE *Metarhizium* SÃO EFICIENTES PARA O
CONTROLE DE IMATUROS E ADULTOS DE *Bactrocera carambolae* Drew &
Hancock (DIPTERA: TEPHRITIDAE)

Dr. Ricardo Adaime da Silva
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Amapá)

Dr. Adilson Lopes Lima
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Amapá)

Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto
Universidade Federal do Amapá (Unifap)

Dr. Dori Edson Nava
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Clima Temperado)

Aprovada em 26 de abril de 2017, Macapá, AP, Brasil.

Dedico à minha família, em especial, aos meus pais, Maria de Lourdes e Raimundo, pela paciência e amor;

Ao meu esposo Kennedy, pelo companheirismo e fundamental ajuda prestada;

À minha filha Agnes, pela obstinada motivação fornecida através do amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

- A Deus pela saúde, força e perseverança concedidas durante toda a trajetória até aqui;
- Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Topical – PPGbio - da Universidade Federal do Amapá, pela oportunidade da progressão profissional representada pelo Curso de Mestrado;
- À Capes, pela concessão da bolsa de estudo para o custeio do trabalho científico;
- À Embrapa Amapá, pela disponibilidade de todo o aparato logístico responsável pela execução das atividades científicas;
- Ao meu orientador, Dr. Ricardo Adaime, pelos ensinamentos, paciência, humildade e seriedade na orientação desse trabalho, essenciais para o desenvolvimento do mesmo;
- Ao meu co-orientador, Dr. Adilson Lopes, pelos conhecimentos repassados sempre com muita alegria e paciência e pelo grande auxílio na construção do artigo científico;
- A pesquisadora da Embrapa, Cristiane Jesus Barros, pelas valiosas contribuições fornecida na elaboração introdutória do trabalho;
- À técnica da Embrapa, Ms. Adriana Bariani, pela grande ajuda prestada no desenvolvimento metodológico dessa dissertação;
- Ao meu esposo, Kennedy Rodrigues, pelo importante auxílio prestado na execução dos experimentos;
- Ao demais integrantes da equipe do Laboratório de Proteção de Plantas da Embrapa, Ezequiel, Jacivaldo, Josielson, Paulo, Leonardo, Jairo e Valéria, por toda e qualquer ajuda prestada e pelos prazerosos momentos de descontração;
- Aos meus amados pais, pelo amor, paciência, confiança e ajuda concedidos durante todo o tempo em que precisei;
- As minhas queridas amigas, Elisângela, Idenir, Déia, Rita, Francilene e Maiara, pelos constantes gestos de apoio e carinho e, por acreditarem verdadeiramente no meu sucesso.

Ser sábio, não é ser conhecedor dos astros, da ciência ou da biologia;

Ser sábio, é ser honesto consigo mesmo, conhecer suas estruturas e não abusar da sua autoconfiança;

Ser sábio, é saber que pra tudo há tempo determinado, tempo de vitórias e de derrotas;

Ser sábio, é compreender a dor do seu próximo e oferecer um ombro amigo quando necessário;

Nem sempre em uma corrida aquele que chega na frente é o campeão, mas são os acúmulos de bons resultados que o torna diferente dos demais.

Vinilson Barbosa

RESUMO

Brito, Bruna David. Isolados amazônicos de *Metarhizium* são eficientes para o controle de imaturos e adultos de *Bactrocera carambolae* Drew & Hancock (Diptera: Tephritidae). Macapá, 2017. Dissertação (Mestre em Biodiversidade Tropical) – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá

Bactrocera carambolae Drew & Hancock é uma praga quarentenária presente no Brasil e se constitui na principal barreira fitossanitária para a exportação de frutos *in natura* desse país. Nesse trabalho foi avaliado o efeito de isolados amazônicos de *Metarhizium* no controle de imaturos e adultos de *B. carambolae* em aplicações no solo. A mortalidade de imaturos em solo estéril tratado com *Metarhizium anisopliae* foi de 70%. Adicionalmente, 100% dos adultos emergidos desse substrato morreram até 5 dias após a emergência. Esse isolado causou mortalidade de imaturos em solo não estéril, porém seu efeito ficou mais evidente após a emergência dos adultos (70% de mortalidade até 10 dias após a emergência). *Metarhizium robertsii* se mostrou eficiente na redução da população de imaturos da praga, especialmente em solo não estéril, além de proporcionar uma redução de 60% na sobrevivência dos adultos 50 dias após a emergência. Esses resultados viabilizam a utilização desses isolados para o controle de imaturos e adultos de *B. carambolae*, sugerindo a possibilidade de utilização dessa modalidade de biocontrole como mais uma alternativa de controle dessa praga quarentenária.

Palavras-chave: controle biológico, fungos entomopatogênicos, moscas-das-frutas, mosca-da-carambola.

ABSTRACT

Brito, Bruna David. Amazonian isolates of *Metarhizium* are effective for controlling immatures and adults of *Bactrocera carambolae* Drew & Hancock (Diptera: Tephritidae). Macapá, 2017. Dissertação (Mestre em Biodiversidade Tropical) – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá

Bactrocera carambolae Drew & Hancock is a quarantine pest present in Brazil and constitutes the main phytosanitary barrier for the export of fresh fruits from that country. In this work, we evaluated the effect of Amazonian isolates of *Metarhizium* on the control of immatures and adults of *B. carambolae* in soil applications. The mortality of immatures in sterile soil treated with *Metarhizium anisopliae* was 70%. In addition, 100% of the adults that emerged from this substrate died up to 5 days later. This isolate caused the mortality of immatures in non-sterile soil, but its effect was more evident after adult emergence (70% mortality up to 10 days after emergence). *Metarhizium robertsii* was effective in reducing the immature population of the pest, especially in non-sterile soil, and caused a 60% reduction in adult survival 50 days after emergence. These results indicated the possible use of these isolates for the control of immatures and adults of *B. carambolae*, suggesting the possibility of using this biocontrol mode as another alternative in controlling this quarantine pest.

Key words: biological control, entomopathogenic fungi, fruit flies, carambola fruit fly

ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Percentual de sobrevivência de *B. carambolae*. (A) Solo estéril tratado com *M. anisopliae*; (B) Solo estéril tratado com *M. robertsii*; (C) Solo não estéril tratado com *M. anisopliae*; (D) Solo não estéril tratado com *M. robertsii*; (E) Solo estéril não tratado com entomopatógenos; e (F) Solo não estéril não tratado com entomopatógenos..... **34**

TABELAS

Tabela 1 - Hospedeiros da mosca-da-carambola no Brasil.....	14
Tabela 2 - Mortalidade (%) de imaturos de <i>B. carambolae</i> em solos estéril e não estéril tratados com <i>M. anisopliae</i> e <i>M. robertsii</i>	33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. HIPÓTESE.....	17
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 GERAL.....	17
3.2 ESPECÍFICOS.....	17
4. REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 1 - Isolados amazônicos de <i>Metarhizium</i> são eficientes para o controle de imaturos e adultos de <i>Bactrocera carambolae</i> Drew & Hancock (Diptera: Tephritidae).....	20
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	23
INTRODUÇÃO.....	24
MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
Obtenção dos insetos.....	25
Isolados de <i>Metarhizium</i>.....	25
Multiplicação dos isolados e obtenção da suspensão de conídios.....	26
Patogenicidade dos isolados de <i>Metarhizium</i> contra imaturos e adultos de <i>B. carambolae</i>	26
Análise Estatística.....	27
RESULTADOS.....	28
DISCUSSÃO.....	29
AGRADECIMENTOS.....	35
REFERÊNCIAS.....	36
5. CONCLUSÕES.....	38
APÊNDICE.....	39
ANEXO.....	43

1. INTRODUÇÃO GERAL

Bactrocera carambolae Drew & Hancock, conhecida popularmente como mosca-da-carambola, é uma das espécies de moscas-das-frutas originária da Indonésia, Malásia e Tailândia, e invasora no norte da América do Sul (Suriname, República da Guiana, Guiana Francesa e Brasil). No Brasil, está restrita aos estados do Amapá e Roraima (Godoy et al. 2011a). Sua introdução no continente sul-americano ocorreu em 1975, no Suriname, porém, só foi reportada oficialmente em 1989. Em 1993, foi registrada na Guiana Francesa. No Brasil, seu primeiro registro ocorreu no município de Oiapoque, Estado do Amapá, em 1996 (Godoy et al. 2011b; Malavasi 2001).

Acredita-se que a chegada da mosca-da-carambola na América ocorreu em consequência do trânsito de pessoas nas décadas de 60 e 70, uma vez que boa parte da população do Suriname é proveniente de países asiáticos, como a China, Índia e Indonésia. Por isso, o trânsito de pessoas entre esses países e o transporte de frutos são apontados como a hipótese mais provável para a introdução da praga na região (van Sauers-Muller 1991).

No Brasil, a mosca-da-carambola é considerada uma praga quarentenária presente, com distribuição restrita aos estados do Amapá e Roraima (Brasil 2013). Sua dispersão para áreas de produção de frutas causaria a perda de grandes mercados consumidores mundiais (Lemos et al. 2014).

Os impactos sócioeconômicos ocasionados pela presença de *B. carambolae* devem-se, especialmente, ao fato dessa praga ser considerada de importância quarentenária e países importadores de frutos *in natura* impõem restrições quarentenárias para evitar a introdução dessa espécie em seus territórios (Silva et al. 2005). A importância da mosca-da-carambola está associada aos prejuízos diretos que pode ocasionar à produção de frutos hospedeiros, às restrições impostas pelos mercados consumidores, às implicações de medidas de controle e aos impactos econômicos, políticos, sociais e ambientais decorrentes da presença e disseminação dessa praga (Barreto et al. 2011).

Atualmente, a lista de hospedeiros da mosca-da-carambola no Brasil (Tabela 1) está composta por 21 hospedeiros, pertencentes a nove famílias, todos assinalados no estado do Amapá (Adaime et al. 2016). No Suriname, van Sauers Muller (2005) relatou 20 hospedeiros em 9 famílias de plantas. No entanto, na região de origem da praga já foram registradas mais de 100 espécies de plantas hospedeiras para *B. carambolae* (Malavasi 2001).

Tabela 1- Hospedeiros da mosca-da-carambola no Brasil.

Famílias	Nomes vernaculares
Nomes científicos	
Anacardiaceae <i>Spondias mombin</i> L. <i>Anacardium occidentale</i> L. <i>Mangifera indica</i> L.	Taperebá Caju Manga
Annonaceae <i>Rollinia mucosa</i> (Jacq.) Baill.	Biribá
Malpighiaceae <i>Malpighia emarginata</i> Sessé & Moc. ex. DC. <i>Byrsonima crassifolia</i> (L) Kunth	Acerola Muruci ou Murici
Myrtaceae <i>Psidium guajava</i> L. <i>Eugenia stipitata</i> McVaugh <i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & L.M. Perry <i>Eugenia uniflora</i> L. <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels <i>Psidium guineense</i> Swartz	Goiaba Araçá-boi Jambo-vermelho Pitanga Ameixa-roxa Goiaba-araça ou araça
Oxalidaceae <i>Averrhoa carambola</i> L.	Carambola
Sapotaceae <i>Pouteria caimito</i> (Ruiz & Pav.) Radlk. <i>Manilkara zapota</i> (L.) P.Royen <i>Pouteria macrophylla</i> (Lam.) Eyma	Abiu Sapotilha Cutite
Solanaceae <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	Pimenta-de-cheiro
Chrysobalanaceae <i>Chrysobalanus icaco</i> L. <i>Licania</i> sp.	Ajuru -
Rutaceae <i>Citrus reticulata</i> Blanco <i>Citrus aurantium</i> L.	Tangerina Laranja-da-terra

No Brasil, para evitar a dispersão de *B. carambola* para outras Unidades da Federação, foi criado, em 1996, o Programa Nacional de Erradicação da Mosca-da-carambola (PNEMC). Esse programa é coordenado pelo Departamento de Sanidade Vegetal (DSV), vinculado à Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e tem por objetivo monitorar e controlar a mosca-da-carambola em regiões de fronteira, visando sua erradicação (Godoy et al. 2011c; Morais et al. 2016). Dessa forma, é

possível manter a qualidade dos produtos no mercado interno e garantir as exportações da fruticultura nacional. Dentre as ações realizadas pelo PNEMC, está o monitoramento correspondente aos levantamentos de detecção da praga em todas as Unidades da Federação onde não há o registro da mosca-da-carambola, bem como os levantamentos de verificação onde a mesma está presente (Godoy et al. 2011c).

A importância do PNEMC está relacionada ao efetivo controle da mosca-da-carambola, que é realizado por meio das seguintes técnicas: (i) aniquilação de machos, com blocos de fibra impregnados com metil-eugenol e o inseticida malation; (ii) iscas impregnadas com proteína hidrolisada e o inseticida malation; (iii) enterrio de frutos; e (iv) pulverização de inseticidas em pomares (Godoy et al. 2011c). Porém, apesar das técnicas empregadas serem eficientes, existe demanda pela incorporação de novas alternativas de controle consideradas mais sustentáveis, especialmente no que diz respeito ao meio ambiente, saúde dos trabalhadores e qualidade dos produtos (Silva 2015).

Dessa forma, a busca por métodos alternativos de controle de moscas-das-frutas se intensificou ao longo nos últimos anos em decorrência dos riscos ambientais associados à utilização de inseticidas químicos. Nesse contexto, o controle biológico pode representar uma estratégia viável para o manejo de moscas-das-frutas (Bautista et al. 1999). O uso de fungos do gênero *Metarhizium* se apresenta como uma alternativa para o controle biológico de pragas agrícolas, especialmente para aquelas pragas agrícolas que desenvolvem parte do seu ciclo de vida no solo, como é o caso das moscas-das-frutas. Uma das vantagens da utilização desse fungo entomopatogênico é sua capacidade de infectar seus hospedeiros através das estruturas externas, o que lhe proporciona maior potencial de controle se comparado a agentes como bactérias ou vírus, que devem ser ingeridos para atuarem sobre o hospedeiro (Dimbi et al. 2003).

Silva et al. (2016) comprovaram recentemente essa eficiência em experimentos de laboratório ao avaliar a ação de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *M. robertsii* J.F. Bisch., Rehner & Humber na mortalidade de imaturos de *B. carambolae* no Estado do Amapá. O trabalho apresentou resultados promissores, pois alcançou mortalidade de até 36% com um isolado de *M. anisopliae*. Além disso, mesmo não contemplando a avaliação da mortalidade dos adultos de *B. carambolae* após a emergência, foi possível realizar observações preliminares em laboratório que indicaram vida efêmera de adultos emergidos de substratos tratados com os diferentes isolados de *Metarhizium*, quando comparados com os adultos emergidos de substratos não tratados.

O potencial patogênico de isolado de *M. anisopliae* também já foi testado em larvas e pupas de outras espécies do gênero *Bactrocera*, como *Bactrocera zonata* (Saunders) (Diptera: Tephritidae) Gul et al. (2015). Outros ensaios com *M. anisopliae* demonstram também o potencial dos isolados desse fungo entomopatogênico como agente no controle biológico em outras espécies de moscas-das-frutas (Tephritidae), como *Ceratitis capitata*. Souza (2010) demonstrou o efeito do entomopatógeno sobre as pupas, além de provocar efeitos secundários e retardados, como o alongamento da fase pupal, anormalidades nos pupários e deformações nos adultos.

Outra vantagem adicional da utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de espécies praga de moscas-das-frutas é a possibilidade dos propágulos infectivos (conídios) do agente de controle serem transmitidos para insetos sadios (transmissão horizontal). Nesse sentido, Sookar et al. (2014) comprovaram a eficiência desse método transmissão ao realizarem testes para investigar se os adultos de *Bactrocera zonata* Saunders e *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) tratados com *M. anisopliae* poderiam transferir conídios infectivos do fungo para os parceiros sexuais durante o acasalamento e se a infecção poderia ter um efeito sobre o comportamento de acasalamento, fecundidade e fertilidade das fêmeas. Os testes mostraram que quando os machos tratados foram mantidos juntos com fêmeas não tratadas, ocorreu a transmissão de conídios, ocasionando a infecção das fêmeas não tratadas, resultando em altas mortalidades. Do mesmo modo, fêmeas infectadas mantidas com machos não tratados também ocasionaram infecções nos machos, com altas taxas de mortalidade.

Por fim, é importante ressaltar a adequabilidade do solo como meio para liberação de entomopatógenos que possuem capacidade de atacar fases do ciclo de vida dos insetos que se desenvolvem nesse ambiente, como é o caso das moscas-das-frutas (Dimbi et al. 2003). Essa possibilidade já foi sugerida por autores que consideram o solo altamente atrativo para a aplicação de agentes de controle biológico como *Metarhizium* spp., já que está menos sujeito a extremos de temperatura e umidade, principalmente. Além disso, o solo também é o habitat natural de espécies do gênero *Metarhizium* (Ekesi et al. 2002).

Assim, o presente trabalho objetivou avaliar a capacidade de isolados de *Metarhizium* infectarem imaturos de *B. carambolae* quando aplicados diretamente no solo. Além disso, o efeito desse entomopatógeno sobre a sobrevivência de adultos emergidos de solo tratado também foi considerado, uma vez que Silva et al. (2016) evidenciaram mortalidade em adultos da mosca-da-carambola oriundos de solo tratado com *M. anisopliae* e *M. robertsii*.

2. HIPÓTESE

Fungos entomopatogênicos do gênero *Metarhizium* causam mortalidade de imaturos e adultos de *Bactrocera carambolae* em condições de laboratório.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Avaliar a patogenicidade de fungos do gênero *Metarhizium* em imaturos e adultos de *B. carambolae* visando ao desenvolvimento de medidas de controle biológico para essa praga quarentenária.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a patogenicidade de *M. anisopliae* e *M. robertsii* sobre imaturos de *B. carambolae* em solo estéril e não estéril;
- Verificar a longevidade dos adultos de *Bactrocera carambolae* infectados pelos fungos *M. anisopliae* e *M. robertsii*.

4. REFERÊNCIAS

- Adaime, R., C. R. Jesus-Barros, A. Bariani, A. L. Lima, K. R. Cruz, and J. P. Carvalho. 2016. Novos Registros de Hospedeiros da Mosca-da-carambola (*Bactrocera carambolae*) no Estado do Amapá, Brasil. 146. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Embrapa Amapá; Macapá; Amapá; Brasil.
- Barreto, M. C., P. C. G. Silva, A. C. A. Carvalho, C. O. Almeida, and A. E. Wander. 2011. Impactos socioeconômicos da dispersão da mosca-da-carambola (*Bactrocera carambolae*) à fruticultura nacional. Pages 187-195 in R. A. Silva, W. Lemos, and R. Zucchi, editors. Moscas-da fruta na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais. Macapá: Embrapa Amapá, Amapá, Brasil.
- Bautista, R. C., N. Mochizuki, J. P. Spencer, E. J. Harris, and D. M. Ichimura. 1999. Mass rearing of the tephritid fruit fly parasitoid *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* **15**:137-144.
- Brasil. 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n° 59, de 18 de dezembro de 2013. Diário oficial da união, Brasília, DF, Brasil.
- Dimbi, S., N. K. Maniania, S. A. Lux, S. Ekesi, and J. K. Mueke. 2003. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitidis capitata* (Weidemann), *C. rosa var. fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera: Tephritidae). *Mycopathologia* **156**:375-382.
- Ekesi, S., N. K. Maniani, and S. A. Lux. 2002. Mortality in three African tephritidae fruit fly puparia and adults caused by the entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology* **12**:7-17.
- Godoy, M. J. S., W. S. P. Pacheco, and A. Malavasi. 2011a. Moscas-das-frutas quarentenárias para o Brasil. Pages 113-131 in R. Silva, W. Lemos, and R. Zucchi, editors. Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais. Macapá: Embrapa Amapá, Amapá, Brasil.
- Godoy, M. J. S., W. S. P. Pacheco, R. R. Portal, J. M. P. Filho, and L. M. M. Moraes. 2011b. Programa Nacional de Erradicação da Mosca-da-Carambola. Pages 135-158 in R. Silva, W. Lemos, and R. Zucchi, editors. Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais. Macapá: Embrapa Amapá, Amapá, Brasil.
- Godoy, M. J. S., M. E. C. Queiroz, A. K. M. N. Belfort, J. F. Maia, and A. C. F. Silva. 2011c. Educação sanitária como componente nas ações do Programa Nacional de Erradicação da Mosca-da-Carambola. Pages 175-183 in R. Silva, W. Lemos, and R. Zucchi, editors. Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais. Macapá: Embrapa Amapá, Amapá, Brasil.
- Gul, H.T., S. Freed, M. Akmal, and M. N. Malik. 2015. Vulnerability of different life stages of *Bactrocera zonata* (Tephritidae: Diptera) against Entomogenous Fungi. *Pakistan Journal of Zoology* **47(2)**:307-317.

- Lemos, L. N., R. Adaime, C. R. J. Barros, and E. G. Deus. 2014. New hosts of *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae) in Brazil. *Florida Entomologist* **97**:841-843.
- Malavasi, A. 2001. Mosca-da-carambola, *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae). Pages 39-41 in E. F. Vilela, R. A. Zucchi, and F. Cantor, editors. *Histórico e impacto de pragas introduzidas no Brasil*. Holos, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
- Morais, E. G. F., C. R. Jesus-Barros, R. Adaime, A. L. Lima, and D. Navia. 2016. Pragas de expressão quarentenária na Amazônia. Pages 521-559 in E. G. F. Moraes editor. *Pragas agrícolas e florestais na Amazônia*. Brasília: Embrapa, Distrito Federal, Brasil.
- Silva, R. A., A. L. Jordão, L. A. N. Sá, and M. R. V. Oliveira. 2005. Ocorrência da mosca-da-carambola no estado do Amapá. *Revista Científica Eletrônica de Agronomia* **7**:1677-0293.
- Silva, T. L. 2015. Controle biológico de imaturos de *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae) por *Metarhizium* spp. no Estado do Amapá Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-graduação/Mestrado em Desenvolvimento Regional.
- Silva, T. L., A. L. Lima, M. S. M. Sousa, C. R. Jesus-Barros, A. Bariani, J. F. Pereira, and R. Adaime. 2016. Potential of Amazonian Isolates of *Metarhizium* to control immatures of *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist* **99** (4):788-789.
- Sookar, P., S. Bhagwant, and M. N. Allymamod. 2014. Effect of *Metarhizium anisopliae* on the fertility and fecundity of two species of fruit flies and horizontal transmission of mycotic infection. *Journal of Insect Science* **14** (100):1-12.
- Souza, H. R. 2010. Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e azadiractina sobre *Ceratitis capitata* (Wied.). Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Montes Claros, Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal no Semiárido.
- van Sauers-Muller, A. 1991. An overview of the carambola fruit fly *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae), found recently in Suriname. *Florida Entomologist* **74**:432-440.
- van Sauers-Muller, A. 2005. Host plants of the carambola fruit fly, *Bactrocera carambolae* Drew & Hancock (Diptera: Tephritidae), in Suriname, South America. *Neotropical Entomology* **34**:203-214.

Isolados amazônicos de *Metarhizium* são eficientes para o controle de imaturos e adultos de *Bactrocera carambolae* Drew & Hancock (Diptera: Tephritidae)

Artigo submetido ao Periódico Florida Entomologist em: 15/04/2017

Isolados amazônicos de *Metarhizium* são eficientes para o controle de imaturos e adultos de *Bactrocera carambolae* Drew & Hancock (Diptera: Tephritidae)

Bruna David **Brito**¹, Adilson Lopes **Lima**², Kennedy Rodrigues **Cruz**³, Adriana **Bariani**²,
Cristiane Ramos de **Jesus-Barros**², José Francisco **Pereira**², Ricardo **Adaime**²

¹Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical,
Macapá, Amapá, 68902-280, Brasil

²Embrapa Amapá, Macapá, Amapá, 68903-419, Brasil

³Faculdade de Macapá (FAMA), Macapá, Amapá, 68906-801, Brasil

RESUMO

Bactrocera carambolae Drew & Hancock é uma praga quarentenária presente no Brasil e se constitui na principal barreira fitossanitária para a exportação de frutos *in natura* desse país. Neste trabalho avaliamos o efeito de isolados amazônicos de *Metarhizium* no controle de imaturos e adultos de *B. carambolae* em aplicações no solo. A mortalidade de imaturos em solo estéril tratado com *Metarhizium anisopliae* foi de 70%. Adicionalmente, 100% dos adultos emergidos desse substrato morreram até 5 dias após a emergência. Esse isolado causou mortalidade de imaturos em solo não estéril, porém seu efeito ficou mais evidente após a emergência dos adultos (70% de mortalidade até 10 dias após a emergência). *Metarhizium robertsii* se mostrou eficiente na redução da população de imaturos da praga, especialmente em solo não estéril, além de proporcionar uma redução de 60% na sobrevivência dos adultos 50 dias após a emergência. Esses resultados sugerem a utilização desses isolados para o controle de imaturos e adultos dessa praga quarentenária.

Palavras-chave: controle biológico, fungos entomopatogênicos, moscas-das-frutas, mosca-da-carambola

ABSTRACT

Bactrocera carambolae Drew & Hancock is a quarantine pest present in Brazil and constitutes the main phytosanitary barrier for the export of fresh fruits from that country. In this work, we evaluated the effect of Amazonian isolates of *Metarhizium* on the control of immatures and adults of *B. carambolae* in soil applications. The mortality of immatures in sterile soil treated with *Metarhizium anisopliae* was 70%. In addition, 100% of the adults that emerged from this substrate died up to 5 days later. This isolate caused the mortality of immatures in non-sterile soil, but its effect was more evident after adult emergence (70% mortality up to 10 days after emergence). *Metarhizium robertsii* was effective in reducing the immature population of the pest, especially in non-sterile soil, and caused a 60% reduction in adult survival 50 days after emergence. These results indicated the possible use of these isolates for the control of immatures and adults of *B. carambolae*, suggesting the possibility of using this biocontrol mode as another alternative in controlling this quarantine pest.

Key words: biological control, entomopathogenic fungi, fruit flies, carambola fruit fly

INTRODUÇÃO

A ocorrência da mosca-da-carambola (*Bactrocera carambolae* Drew & Hancock) (Diptera: Tephritidae) é considerada a principal barreira fitossanitária para a exportação de frutas brasileiras, uma vez que há restrições quarentenárias impostas por países que importam produtos oriundos de regiões onde essa praga ocorre (Godoy et al. 2011; Ferreira & Rangel 2015). Atualmente *B. carambolae* é classificada como praga quarentenária presente, com distribuição restrita aos estados do Amapá e Roraima, região Norte do país, e está sob controle oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil 2013; Morais et al. 2016).

O impacto da possível dispersão da mosca-da-carambola para regiões exportadoras de frutas do nordeste brasileiro implicará em prejuízos de cerca de USD 60 bilhões, apenas para a cultura da manga, já no quarto ano após o provável embargo internacional (Miranda et al. 2015). O potencial de adaptação da praga em áreas de fruticultura irrigada no Vale do São Francisco, região Nordeste do Brasil, foi avaliado por Pessoa et al. (2016). Esses autores registraram condições de temperatura e umidade média favoráveis ao desenvolvimento da praga. Além disso, a oferta de frutos hospedeiros como manga (*Mangifera indica*), acerola (*Malpighia emarginata*) e goiaba (*Psidium guajava*), produzidas na região, propiciam potencial para adaptação da espécie.

O controle de *B. carambolae* está baseado especialmente na utilização de iscas tóxicas contendo inseticidas e o atrativo metil eugenol. De acordo com Silva et al. (2016), embora esse método seja eficiente, tornou-se necessário eliminar gradualmente a utilização do composto malation, tendo em vista os impactos ambientais e toxicológicos dos organofosforados. Assim, a busca por técnicas alternativas de controle que possam ser acrescidas ao manejo de *B. carambolae* são necessárias (Midgarden et al. 2016). Dentre essas alternativas, destaca-se o controle biológico por ação de fungos entomopatogênicos, como os do gênero *Metarhizium*. Esses fungos vivem naturalmente no solo, o que possibilita a aplicação/liberação desses agentes de controle biológico para a eliminação de larvas de 3º instar e pupas de moscas-das-frutas (Ekesi et al. 2003; Maniania & Ekesi 2016).

A utilização de isolados de *Metarhizium* adaptados às condições ecológicas prevalentes nas quais eles serão utilizados é crucial, uma vez que a tolerância do agente de controle a estresses climáticos parece estar relacionada com sua origem geográfica (Vidal et al. 1997). Silva et al. (2016) avaliaram o potencial de isolados amazônicos de *Metarhizium anisopliae*

(Metsch.) Sorokin e *M. robertsii* J.F. Bisch., Rehner & Humber para o controle de imaturos de *B. carambolae* e registraram mortalidade média de 36% e 14% em solo estéril, respectivamente. Os autores ressaltaram o potencial de uso do isolado de *M. anisopliae* como bioinseticida em aplicação no solo para reduzir a população da praga.

Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar a patogenicidade de isolados de *M. anisopliae* e *M. robertsii* sobre imaturos e adultos de *B. carambolae* em condições de laboratório.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos insetos

Para a realização dos ensaios de patogenicidade foram utilizadas larvas de 3º instar obtidas da criação de manutenção de *B. carambolae* do Laboratório de Proteção de Plantas da Embrapa Amapá. Para multiplicação da mosca-da-carambola em laboratório foram coletados constantemente ovos dessa espécie-praga por meio da indução da oviposição em dispositivo artificial (copos de plásticos aromatizados) (para maiores detalhes ver Bariani et al. 2016). Posteriormente esses ovos foram colocados em placas de petri (10cm de diâmetro e 2cm de altura) contendo dieta artificial para larvas (composta de 67g de bagaço de cana de açúcar, 41,2g de farinha de soja, 41,2g de levedura, 41,2g de açúcar cristal, 8,5g de ácido cítrico, 1g de benzoato de sódio, 1,2g de nipagin e 298,7mL de água destilada). Em seguida, essas placas foram acondicionadas em bandejas (30 x 20 x 2cm) com vermiculita (textura super fina, granulometria: 0,3 mm – 1 mm) e armazenadas em sala climatizada para o desenvolvimento pupal. Após a obtenção dos pupários esses imaturos foram transferidos para potes de plástico contendo vermiculita e acondicionados em câmara climatizada (temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas) até a emergência dos adultos. Após a emergência, os adultos foram transferidos para gaiolas (50 x 33 x 35cm) devidamente identificadas por geração, acondicionadas em sala climatizada.

Isolados de *Metarhizium*

Dois isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium* foram utilizados no presente trabalho, um de *M. anisopliae* (sensu strictu) (CPAFAP 3.8) e outro de *M. robertsii* (CPAFAP 14.8), os mesmos utilizados por Silva et al. (2016). A identificação dos isolados foi realizada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, Distrito Federal, Brasil,

utilizando-se a técnica de espectrometria de massa (MALDI-TOF) (Lopes et al. 2014). As referidas espécies, além de estarem armazenadas na Embrapa Amapá, também estão preservadas nas formas liofilizada e criopreservada na Coleção de Fungos de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob os códigos CG1313 (*M. anisopliae*) e CG1314 (*M. robertsii*).

Multiplicação dos isolados e obtenção da suspensão de conídios

Para multiplicação do isolado de *M. anisopliae* foi utilizado o meio de cultura Sabouroud Dextrose Ágar (SDA), enquanto que para *M. robertsii* foi utilizado o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), tendo em vista que esses meios específicos são os mais favoráveis para o crescimento das colônias das diferentes espécies. Para o crescimento, ambos isolados foram mantidos em câmara climatizada (temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas), por 28 dias.

As suspensões de *M. anisopliae* e *M. robertsii* utilizadas para o teste de patogenicidade foram realizadas de acordo com metodologia adaptada de Ekesi et al. (2002). Para isso, após o período de crescimento dos entomopatógenos, 15 mL de Água Destilada Esterilizada (ADE) contendo 0,1% de TWEEN[®] 80 foram adicionados a cada placa e, em seguida, todas as placas foram raspadas superficialmente para recuperação dos conídios e seus conteúdos foram combinados para formar uma única suspensão.

Após a obtenção da suspensão inicial, os conídios foram contados em Câmara de Neubauer e sua concentração ajustada para 1×10^8 conídios.mL⁻¹, obtendo-se assim a suspensão de trabalho. À suspensão de trabalho acrescentou-se 0,1% de TWEEN[®] 80 e 2% de espalhante adesivo (AGRAL[®]). A solução utilizada para os controles (testemunha) continha somente ADE adicionada de 0,1% de TWEEN[®] 80 e 2% de espalhante adesivo (AGRAL[®]).

Patogenicidade dos isolados de *Metarhizium* contra imaturos e adultos de *B. carambolae*

O solo utilizado como substrato para os ensaios de patogenicidade foi retirado do pomar urbano da cidade de Macapá, estado do Amapá, Brasil. Previamente à utilização, o solo foi peneirado (malha 3 x 3mm) e parte foi autoclavada a 120°C , por 20 minutos, para compor os tratamentos de solo estéril. Foram utilizadas 30 caixas gerbox (12 x 12 x 4,5cm) para o experimento. Destas, 5 correspondiam ao tratamento com *M. anisopliae* em solo estéril e 5 em não estéril; 5 ao tratamento de *M. robertsii* em solo estéril e 5 em não estéril; enquanto as outras 10 caixas representavam os controles correspondentes aos solos estéril e não estéril. Cada caixa

gerbox continha 100 g de solo estéril ou não estéril, que formaram uma camada de 2cm de espessura no gerbox.

Sobre o solo das caixas gerbox correspondentes aos tratamentos com os entomopatógenos foram pulverizadas 10 mL das suspensões conidiais (1×10^8 conídios.mL⁻¹) dos isolados de *Metarhizium*. Após a pulverização das suspensões conidiais, 10 larvas de 3º ínstar de *B. carambolae* foram distribuídas sobre o solo de cada uma das caixas. No controle foi pulverizada somente a solução de ADE contendo TWEEN® 80 e o espalhante adesivo AGRAL® nas proporções de 0,1% e 2%, respectivamente. Em seguida, cada caixa gerbox foi transferida para câmara climatizada (temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, sem fotoperíodo). Diariamente as caixas gerbox eram vistoriadas e umedecidas com ADE.

A partir do quinto dia após o início do ensaio de patogenicidade, o número de adultos emergidos dos solos tratados com os isolados de *Metarhizium* e dos solos não tratados (controle) foram registrados. Os adultos que emergiram foram individualizados em gaiolas (pote de plástico de 500 mL, com tampa vazada coberta com tecido do tipo organza), onde havia disponibilidade de água (em esponja tipo tecido vegetal) e dieta alimentar (extrato de levedura Bionis® YE MF e açúcar refinado, na proporção 1:3, fornecida sobre algodão em tampa de plástico de 2cm de diâmetro x 1cm de altura). Os insetos foram avaliados diariamente, até a morte de todos eles.

Para confirmar a infecção por *Metarhizium*, pupários inviáveis e adultos mortos nas gaiolas foram desinfestados superficialmente em solução de hipoclorito de sódio a 1,5% e incubados em câmara úmida para exteriorização dos sinais característicos dos entomopatógenos.

Análise estatística

Para análise de variância da mortalidade de imaturos de *B. carambolae* foi utilizada a transformação arco-seno da raiz quadrada, sendo posteriormente as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. A análise de sobrevivência dos adultos de *B. carambolae* foi realizada pelo método paramétrico baseado em dados quantitativos utilizando-se o modelo Kaplan-Meier. Para as análises estatísticas foi utilizado o software BioStat 5.3 (Ayres et al. 2007).

RESULTADOS

Os resultados demonstram a capacidade de isolados amazônicos de *M. anisopliae* e *M. robertsii* causarem a mortalidade de imaturos de *B. carambolae* no solo. Isso foi mais acentuado em solo estéril, onde *M. anisopliae* proporcionou mortalidade de 70%, superior ao tratamento com *M. robertsii* (36%) e ao controle 12% (Tabela 1).

Em solo não estéril o tratamento contendo o isolado de *M. robertsii* promoveu maior mortalidade que o controle. Curiosamente, a mortalidade causada pelo isolado de *M. anisopliae* em solo não estéril foi 28%, apesar disso, não foi possível detectar diferença significativa em relação ao tratamento controle. Essa diferença também não foi observada quando comparada a mortalidade causada pelos dois isolados de *Metarhizium* em solo não estéril (Tabela 1).

Além de causarem a mortalidade de imaturos, os isolados *M. anisopliae* e *M. robertsii* proporcionaram efeito adicional relacionado à sobrevivência de adultos de *B. carambolae* (Figura 1). A redução na sobrevivência de adultos que emergiram a partir de solo tratado com *M. anisopliae* foi relevante tanto em solo estéril quanto não estéril. Após cinco dias da emergência, todas as moscas que emergiram de solo estéril tratado com esse isolado morreram (Figura 1A). Em solo não estéril, *M. anisopliae* também reduziu consideravelmente a sobrevivência de adultos de *B. carambolae*. Esse percentual de redução atingiu aproximadamente 70% em apenas 10 dias após a emergência dos adultos (Figura 1C). Também vale ressaltar que 50 dias após a emergência foi registrada uma redução de 90% na sobrevivência dos adultos em solo não estéril tratado com *M. anisopliae* (Figura 1C).

Metarhizium robertsii também ocasionou redução na sobrevivência de adultos de *B. carambolae* tanto em solo estéril quanto não estéril. A redução foi inferior à ocasionada por *M. anisopliae*, porém pode ser considerada relevante, já que aos 50 dias após a emergência já se observava uma redução na sobrevivência de aproximadamente 70% em solo estéril (Figura 1B) e 60% em solo não estéril (Figura 1D).

Nos tratamentos controle de solo estéril e não estéril, a redução na sobrevivência de *B. carambolae* foi gradativa, com 50% dos adultos ainda vivos aos 150 dias após a emergência (Figura 1E e 1F).

DISCUSSÃO

O efeito dos isolados amazônicos dos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *M. robertsii* na redução das populações de *B. carambolae* é evidente. Em nosso trabalho, os resultados obtidos em percentual de mortalidade de imaturos de *B. carambolae* foram superiores àqueles alcançados por Silva et al. (2016), com os mesmos isolados de *Metarhizium*, para o controle de imaturos da praga em solo estéril. Aqueles autores registraram mortalidade de 36% e 14% de imaturos para os isolados de *M. anisopliae* e *M. robertsii*, respectivamente. Já em nosso estudo, os valores obtidos foram de 70% e 36% (Tabela 1). Essas diferenças nos resultados podem estar associadas a adaptações na metodologia empregada. Na busca de aproximar o máximo possível as condições de laboratório às condições em campo, neste trabalho foi utilizado menor volume de solo e maior volume de suspensão conidial que os utilizados por Silva et al. (2016).

Apesar da importância desse grupo de inimigos naturais no controle biológico de *Bactrocera* spp., ainda há poucos estudos nesse sentido. Gul et al. (2015), em Multan, no Paquistão, avaliaram o potencial do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* para o controle de imaturos de *Bactrocera zonata* (Saunders) em solo estéril. Foram utilizadas suspensões conidiais de 1×10^8 , 2×10^8 e 3×10^8 conídios.mL⁻¹, e posteriormente avaliada a emergência de adultos a partir de pupas infectadas. Na concentração de 1×10^8 conídios.mL⁻¹, a emergência de adultos foi de 95%, enquanto nas concentrações de 2×10^8 e 3×10^8 conídios.mL⁻¹, a emergência ficou em torno de 80%. Mesmo utilizando diferentes concentrações, esses resultados são consideravelmente inferiores aos obtidos no presente estudo, uma vez que em solo estéril o tratamento que recebeu *M. anisopliae* reduziu a emergência dos adultos em 70% (Tabela 1). Além disso, deve-se considerar que a concentração de *M. anisopliae* utilizada em nosso estudo foi de apenas 1×10^8 conídios.mL⁻¹.

Solo esterilizado também foi utilizado como substrato para avaliar o efeito de *Metarhizium brunneum* Petch sobre imaturos de *Bactrocera oleae*, em Córdoba, na Espanha (Yousef et al. 2013). O substrato tratado com o entomopatógeno teve efeito significativo na mortalidade de *B. oleae*, já que 82,27% desses imaturos não chegaram à fase adulta, enquanto 64,55% atingiram essa fase no tratamento testemunha. Observa-se que a mortalidade dos imaturos no tratamento controle foi elevada (35,45%), comparada ao nosso estudo (12%). Isso torna a redução da emergência de adultos de *B. carambolae* por *M. anisopliae* (70%) do presente trabalho superior em percentual absoluto à obtida pelos autores referidos acima, já que

aqueles alcançaram redução de 47% na emergência, enquanto neste estudo a redução foi de aproximadamente 58%.

Sookar et al. (2010) avaliaram o potencial de isolados *M. anisopliae* para o controle de *B. zonata* e *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett), consideradas as principais pragas de frutíferas na República da Maurícia, na África. Os autores utilizaram concentração conidial e volume de solo semelhantes aos utilizados no presente trabalho e observaram um percentual de emergência em solo tratado entre 60-93% e 52-92% para *B. zonata* e *B. cucurbitae*, respectivamente. Em nosso estudo, a máxima percentagem de emergência de *B. carambolae* em solo estéril tratado com *M. anisopliae* foi de 30%, enquanto que para *M. robertsii* a emergência da praga em solo tratado não estéril foi de 56%. Esses resultados atestam a viabilidade técnica da utilização de isolados amazônicos para controle de imaturos de *B. carambolae*, especialmente se considerarmos que em nosso estudo a aplicação dos conídios foi apenas sobre a superfície do solo. Já no trabalho dos autores citados houve a aplicação dos conídios e posterior agitação do solo para facilitar o contato dos propágulos dos entomopatógenos com os imaturos de moscas-das-frutas, o que não é factível em condições de campo.

A eficácia da aplicação de *M. anisopliae* no solo associada à utilização de isca à base de spinosad também foi avaliada para o controle de *Bactrocera dorsalis* (Hendel), em Nthagaiya, no Kenya (Ekesi et al. 2011). Os autores reportaram uma redução significativa na população da praga quando as duas estratégias foram empregadas conjuntamente. Além disso, estudos de laboratório utilizando solo que recebeu tratamento com o entomopatógeno indicaram percentuais de emergência de adultos de *B. dorsalis* da ordem de 25-36%, enquanto a emergência obtida em solo não tratado foi de 80-82%.

Além da mortalidade de imaturos, o efeito dos isolados avaliados nesse estudo sobre a sobrevivência de adultos de *B. carambolae* deve ser destacado. A longevidade das moscas que emergiram a partir de larvas infectadas por *M. anisopliae* e *M. robertsii* em solo estéril e não estéril foi consideravelmente afetada. As moscas que não tiveram contato com os fungos entomopotagênicos (Figura 1 E e F) apresentaram longevidade máxima de 240 dias. Silva et al. (2016) indicavam que adultos emergidos de solos tratados com os isolados de *M. anisopliae* e *M. robertsii* tinham vida efêmera, mas não avaliaram a sobrevivência. Assim, é importante salientar o ineditismo deste estudo no que diz respeito à avaliação da sobrevivência de adultos da mosca-da-carambola emergidos a partir de solo tratado com entomopatógenos, uma vez que a maioria dos trabalhos considera somente a redução da emergência de adultos, sem avaliar a mortalidade posterior causada por infecção dos imaturos ainda no solo.

Em nosso estudo, a longevidade de adultos de *B. carambolae* em solo estéril foi muito baixa, em torno de cinco dias para 100% dos adultos emergidos de solo tratado com *M. anisopliae* (Figura 1A) e 50 dias para 70% dos adultos provenientes de solo tratado com *M. robertsii* (Figura 1B). Esses resultados evidenciam a elevada capacidade de nossos isolados infectarem imaturos da mosca-da-carambola ainda no solo, em condições de laboratório. Apesar disso, na natureza as condições de solo estéril não podem ser replicadas.

Para condições de solo não estéril, a longevidade dos adultos de *B. carambolae* foi de 10 dias para aproximadamente 70% dos indivíduos que emergiram de solo tratado com *M. anisopliae* (Figura 1C). *Metarhizium robertsii* também ocasionou mortalidade significativa de adultos, da ordem de 60% aos 50 dias após a emergência (Figura 1D). Esses resultados são extremamente animadores e nos trazem novas perspectivas para o controle de *B. carambolae* em condições de campo. No Brasil, Jesus-Barros et al. (em preparação) avaliaram a fecundidade de *B. carambolae* em laboratório e registraram que o período pré-reprodutivo é de, em média, 25 dias. Assim, os isolados estudados causam elevada mortalidade de adultos antes do início do período de oviposição das fêmeas, apresentando um efeito direto na redução populacional das próximas gerações de *B. carambolae*.

Outra implicação prática é a possibilidade dos adultos emergidos de solo tratado com os isolados de *Metarhizium* transportarem ativamente os prapágulos infectivos (conídios) dos entomopatógenos até os nichos de concentração da praga, fazendo com que indivíduos sadios possam ser infectados (transferência horizontal), especialmente durante a cópula. Entretanto, estudos sobre o comportamento diário de indivíduos de *B. carambolae* tratados e não tratados com os isolados precisam ser realizados.

Por outro lado, nossos resultados também sugerem a possibilidade de utilização conjunta dos isolados, uma vez que em condições de solo não estéril *M. robertsii* proporcionou mortalidade superior à causada *M. anisopliae* (Tabela 1), enquanto este isolado suplantou *M. robertsii* no que diz respeito à redução da sobrevivência dos adultos após a emergência (Figura 1C). Dessa forma, a associação dos dois isolados poderá proporcionar controle populacional de *B. carambolae* superior ao uso de cada um isoladamente.

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho foi possível constatar o efeito dos isolados amazônicos de *Metarhizium* na mortalidade de, no mínimo, 28% de imaturos e na redução da sobrevivência de adultos de *B. carambolae*, em no mínimo, 60% antes do período reprodutivo da praga.

Diante disso, é possível considerar a possibilidade da utilização do controle biológico com fungos entomopatogênicos como uma estratégia alternativa adicional para o controle de *B. carambolae* no Brasil. Logicamente que trabalhos que potencializem ainda mais a ação dos isolados testados nesse estudo, especialmente *M. anisopliae*, devem ser realizados. Uma dessas ações é o desenvolvimento de formulações adequadas que possibilitem maior viabilidade dos propágulos do bioinseticida, bem como garantam sua atividade em condições de alta umidade do solo, já que sua utilização para o controle da mosca-da-carambola se dará em regiões da Amazônia brasileira, sujeitas a alta precipitação pluviométrica nos primeiros seis meses do ano.

Tabela 2. Mortalidade (%) de imaturos de *B. carambolae* em solos estéril e não estéril tratados com *M. anisopliae* e *M. robertsii*.

Tratamentos	Substratos*	
	Solo estéril (mean % \pm SD)	Solo não estéril (mean % \pm SD)
Controle	12,0 \pm 16,43 aB	16,0 \pm 8,94 a B
<i>M. anisopliae</i>	70,0 \pm 15,81 aA	28,0 \pm 21,68 bAB
<i>M. robertsii</i>	36,0 \pm 13,42 aB	44,0 \pm 21,91 aA

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tratamentos: $F = 11,46$; $df = 2, 24$; $P = 0,120$

Substratos: $F = 2,60$; $df = 1, 24$; $P < 0,001$

Tratamentos*Substratos: $F = 6,69$; $df = 2, 24$; $P = 0,005$

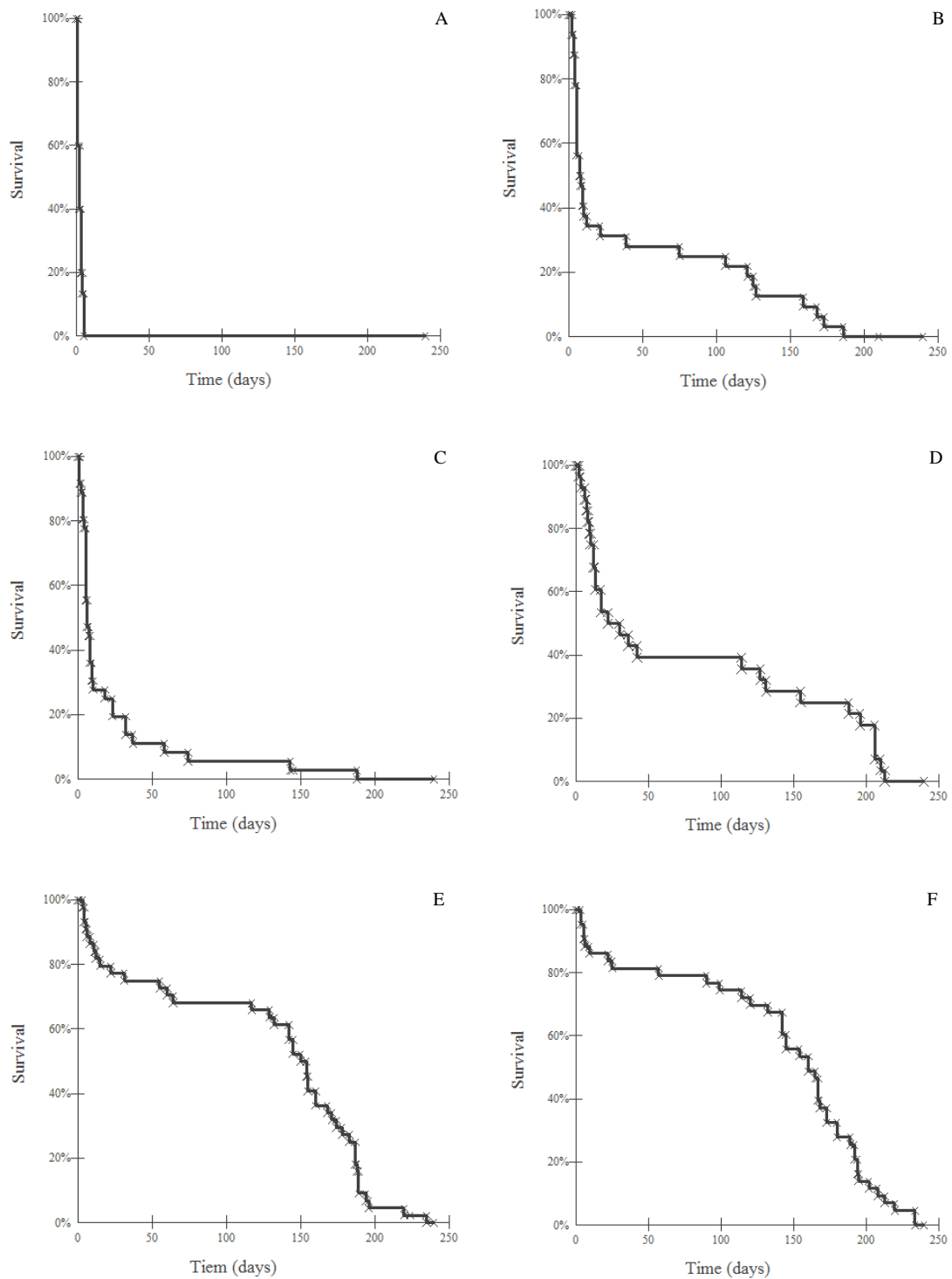


Figura 1. Percentual de sobrevivência de *B. carambolae*. (A) Solo estéril tratado com *M. anisopliae*; (B) Solo estéril tratado com *M. robertsii*; (C) Solo não estéril tratado com *M. anisopliae*; (D) Solo não estéril tratado com *M. robertsii*; (E) Solo estéril não tratado com entomopatógenos; e (F) Solo não estéril não tratado com entomopatógenos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida a R. Adaime. Ao Ministério da Agricultura e Abastecimento do Brasil por autorizar a publicação de dados sobre a mosca-da-carambola, conforme previsto na Normativa nº 52/2007. Ao Dr. A. Leyva (EUA) pela ajuda prestada na tradução e versão em inglês do manuscrito.

REFERÊNCIAS

- Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AA [eds.]. 2007. BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém; Sociedade Civil Mamirauá: MCT-CNPq, 2007.
- Bariani A, Jesus-Barros CR, Carvalho JP, Mota-Júnior LO, Nascimento PR, Cruz KR, Facundes VS. 2016. Técnicas para criação da mosca-da-carambola (*Bactrocera carambolae* Drew & Hancock) em laboratório para pesquisa científica. (Embrapa Amapá. Documentos, 97). Embrapa Amapá, Macapá, Amapá, Brasil. 31 p.
- Brasil. 2013. Instrução Normativa N.º 59, de 18 de dezembro de 2013. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 19 dez. 2013, Seção 1: 91–92.
- Ekesi S, Maniania NK, Mohamed SA. 2011. Efficacy of soil application of *Metarhizium anisopliae* and the use of GF-120 spinosad bait spray for suppression of *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) in mango orchards. *Biocontrol Science and Technology* 21: 299–316.
- Ekesi S, Maniania NK, Lux SA. 2003. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritidae fruit fly puparia. *Journal of Invertebrate Pathology* 83: 157–167.
- Ekesi S, Maniania NK, Lux SA. 2002. Mortality in three African tephritidae fruit fly puparia and adults caused by the entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology* 12: 7–17.
- Ferreira ME, Rangel PHN. 2015. Melhoramento genético preventivo: obtenção de estoques genéticos resistentes a pragas quarentenárias de alto risco para a agricultura brasileira, pp. 275–292 *In* Sugayama RL, Silva ML, Silva SXB, Rangel LEP. [eds.], *Defesa vegetal: fundamentos, ferramentas, políticas e perspectivas*. Sociedade Brasileira de Defesa Agropecuária, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
- Godoy MJS, Pacheco WSP, Portal RR, Pires Filho JM, Moraes LMM. 2011. Programa Nacional de Erradicação da Mosca-da-Carambola, pp. 134–158 *In* Silva RA, Lemos WP, Zucchi RA [eds.], *Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais*. Embrapa Amapá, Macapá, Amapá, Brazil.
- Gul HT, Freed S, Akmal M, Malik MN. 2015. Vulnerability of different life stages of *Bactrocera zonata* (Tephritidae: Diptera) against entomogenous fungi. *Pakistan Journal of Zoology* 47: 307–317.
- Lopes RB, Faria M, Souza DA, Bloch C Jr, Silva LP, Humber RA. 2014. MALDI-TOF mass spectrometry applied to identifying species of insect-pathogenic fungi from the *Metarhizium anisopliae* complex. *Mycologia* 106: 865–878.
- Maniania JNK, Ekesi S. 2016. Development and Application of Mycoinsecticides for the Management of Fruit Flies in Africa, pp. 307–324 *In* Ekesi S, Mohamed SA, Meyer M [eds.], *Fruit Fly Research and Development in Africa - Towards a Sustainable Management Strategy to Improve Horticulture*. Springer, Switzerland.

Midgarden D, van Sauers-Muller A, Godoy MJS, Vayssières JF. 2016. Overview of the Programme to Eradicate *Bactrocera carambolae* in South America, pp. 705–736 In Ekesi S, Mohamed SA, Meyer M [eds.], Fruit Fly Research and Development in Africa - Towards a Sustainable Management Strategy to Improve Horticulture. Springer, Switzerland.

Miranda SHG, Nascimento AM, Ximenes VP. 2015. Potenciais impactos socioeconômicos da expansão da mosca-da-carambola, pp. 132–149 In Vilela EF, Zucchi RA. Pragas introduzidas no Brasil: insetos e ácaros. FEALQ Piracicaba, São Paulo, Brazil.

Morais EGF, Jesus-Barros CR, Adaime R, Lima AL, Navia D. 2016. Pragas de expressão quarentenária na Amazônia, pp. 521–559 In Silva NM, Adaime R, Zucchi RA [eds.], Pragas Agrícolas e Florestais na Amazônia. Embrapa, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

Pessoa MCPY, Prado JSM, Mingoti R, Lovisi-Filho E, Silva AS, Moura MSB, Silva-Filho PP, Sá LAN, Prado SS, Spadotto CA, Farias AR. 2016. Estimativas de potencial adaptação de *Bactrocera carambolae* Drew & Hancock (praga quarentenária A2): estudo de caso para dois perímetros irrigados do Vale do Rio São Francisco. Embrapa Gestão Territorial, Campinas, São Paulo, Brazil. 2 p.

Silva TL, Lima AL, Sousa MSM, Jesus-Barros CR, Bariani A, Pereira JF, Adaime R. 2016. Potential of Amazonian isolates of *Metarhizium* to control immatures of *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae). Florida Entomologist 99: 788–789.

Sookar P, Bhagwant S, Allymamod MN. 2010. Mortality in Tephritid Fruit Fly Puparia and Adults Caused by *Metarhizium Anisopliae*, *Paecilomyces Fumoso roseus* and *Beauveria Bassiana*. Univ. Res. J. Univ. Mauritius 16. <http://ucampus.uom.ac.mu/rci/resjournal/pastissue.php?ujid=25>. Access on March 3, 2017.

Vidal CJ, Fargues J, Lacey LA. 1997. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: effect of temperature on vegetative growth. Journal of Invertebrate Pathology 70: 18–26.

Yousef M, Lozano-Tovar MD, Garrido-Jurado I, Quesada-Moraga E. 2013. Biocontrol of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) with *Metarhizium brunneum* and its extracts. Journal of Economic Entomology 106: 1118-1125.

5. CONCLUSÕES

- Os isolados de *Metarhizium* testados causaram mortalidade de imaturos de *B. carambolae*;
- Adultos de *B. carambolae* emergidos tiveram sua longevidade influenciada pelo tratamento de solo com isolados de *Metarhizium* avaliados;
- Elevado percentual de adultos de *B. carambolae* emergidos de solo tratado com os isolados de *Metarhizium* morreram antes de atingir a maturidade sexual.

APÊNDICE

Protocolo de submissão do artigo ao periódico Florida Entomologist

15/04/2017

#93196 Summary

Florida Entomologist


HOME ABOUT USER HOME SEARCH CURRENT
 ARCHIVES FLORIDA ONLINE JOURNALS HOME

Home > User > Author > Submissions > #93196 > Summary

#93196 Summary

SUMMARY REVIEW EDITING

Submission

Authors	Bruna David Brito, Adilson Lopes Lima, Kennedy Rodrigues Cruz, Adriana Bariani, Cristiane Ramos Jesus-Barros, José Francisco Pereira, Ricardo Adaime
Title	Amazonian isolates of <i>Metarhizium</i> are effective for controlling immatures and adults of <i>Bactrocera carambolae</i> Drew & Hancock (Diptera: Tephritidae)
Original file	93196-121185-1-SM.DOCX 2017-04-15
Supp. files	None ADD A SUPPLEMENTARY FILE
Submitter	Ricardo Adaime 
Date submitted	April 15, 2017 - 08:51 AM
Section	Research Papers
Editor	None assigned
Author comments	Dear Dr. John Capinera,

I am sending for possible publication in The Florida Entomologist a new manuscript elaborated by my research group.

Title: Amazonian isolates of *Metarhizium* are effective for controlling immatures and adults of *Bactrocera carambolae* Drew & Hancock (Diptera: Tephritidae)

Abstract: *Bactrocera carambolae* Drew & Hancock is a quarantine pest present in Brazil and constitutes the main phytosanitary barrier for the export of fresh fruits from that country. In this work, we evaluated the effect of Amazonian isolates of *Metarhizium* on the control of immatures and adults of *B. carambolae* in soil applications. The mortality of immatures in sterile soil treated with *Metarhizium anisopliae* was 70%. In addition, 100% of the adults that emerged from this substrate died up to 5 days later. This isolate caused the mortality of immatures in non-sterile soil, but its effect was more evident after adult emergence (70% mortality up to 10 days after emergence). *Metarhizium robertsii* was effective in reducing the immature population of the pest, especially in non-sterile soil, and caused a 60% reduction in adult survival 50 days after emergence. These results indicated the possible use of these isolates for the control of immatures and adults of *B. carambolae*, suggesting the possibility of using this biocontrol mode as another alternative in controlling this quarantine pest.

Also, I suggest three potential reviewers for this manuscript:

Dr. Caroline Mary Nankinga Kukiriza – native English speaker

JOURNAL CONTENT

Search

Search Scope

All

Search

Browse

- [By Issue](#)
- [By Author](#)
- [By Title](#)
- [Other Journals](#)

USER

You are logged in as...

- ricardoadaime**
- [My Journals](#)
 - [My Profile](#)
 - [Log Out](#)

AUTHOR

Submissions

- [Active \(1\)](#)
- [Archive \(5\)](#)
- [New Submission](#)

FONT SIZE

[Journal Help](#)

15/04/2017

#93196 Summary

NARO-National Agricultural Research Laboratories (NARL)
Kampala, Uganda

E-mail: cmnankinga@gmail.com
cnankinga@kari.go.ug

Dr. Antonio Batista Filho

Instituto Biológico
São Paulo, SP, Brazil
E-mail: batistaf@biologico.sp.gov.br

Dr. Neliton Marques da Silva

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, AM, Brazil
E-mail: nmerinato@gmail.com

Finally, I hope our manuscript can be published in this important journal.

Best regards.

Dr. Ricardo Adaime
FES Member





Status

Status	Awaiting assignment
Initiated	2017-04-15
Last modified	2017-04-15

Submission Metadata

[EDIT METADATA](#)


Authors

Name	Bruna David Brito 
Affiliation	Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical
Country	Brazil
Bio Statement	—
Name	Adilson Lopes Lima 
Affiliation	Embrapa Amapá
Country	Brazil
Bio Statement	—
Name	Kennedy Rodrigues Cruz 
Affiliation	Faculdade de Macapá
Country	Brazil
Bio Statement	—
Name	Adriana Bariani 
Affiliation	Embrapa Amapá
Country	Brazil

15/04/2017

#93196 Summary


Bio Statement —

Name Cristiane Ramos Jesus-Barros 

Affiliation Embrapa Amapá

Country Brazil


Bio Statement —

Name José Francisco Pereira 

Affiliation Embrapa Amapá

Country Brazil

Bio Statement —

Name Ricardo Adaime 

Affiliation Embrapa Amapá

Country Brazil

Bio Statement —

Principal contact for editorial correspondence.

Title and Abstract

Title Amazonian isolates of *Metarhizium* are effective for controlling immatures and adults of *Bactrocera carambolae* Drew & Hancock (Diptera: Tephritidae)

Abstract *Bactrocera carambolae* Drew & Hancock is a quarantine pest present in Brazil and constitutes the main phytosanitary barrier for the export of fresh fruits from that country. In this work, we evaluated the effect of Amazonian isolates of *Metarhizium* on the control of immatures and adults of *B. carambolae* in soil applications. The mortality of immatures in sterile soil treated with *Metarhizium anisopliae* was 70%. In addition, 100% of the adults that emerged from this substrate died up to 5 days later. This isolate caused the mortality of immatures in non-sterile soil, but its effect was more evident after adult emergence (70% mortality up to 10 days after emergence). *Metarhizium robertsii* was effective in reducing the immature population of the pest, especially in non-sterile soil, and caused a 60% reduction in adult survival 50 days after emergence. These results indicated the possible use of these isolates for the control of immatures and adults of *B. carambolae*, suggesting the possibility of using this biocontrol mode as another alternative in controlling this quarantine pest.

Indexing

Keywords biological control; entomopathogenic fungi; fruit flies; carambola fruit fly

Language en

Supporting Agencies

Agencies Brazilian Agricultural Research Corporation – Embrapa and Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq)

ISSN: 1938-5102

15/04/2017

Zimbra: Entrada (84)

Busca por palavras

Ricardo Adame - C/PFF-AP

Açã

Ser

De	Assunto	Tamanho	Recebido
Florida Entomological Society	[SPAM] [FLAENT] Submission Acknowledgement - Ricardo Adame: Thank you for submitting the manuscript, "Amazonian isolates of Metarhizium are effective for controlling immatures a...	4 KB	5:51
Clara Angélica Cordeiro	Dissertação Clara Brandão - Dra. Rogério, Encaminho, em anexo, a dissertação para sua análise e correções. Autora: Feliz Placoval (148598897972_inova001.gi) Clara Angélica...	168 KB	14 de Abr
Leyva	Re: manuscrito - effective is better Amazonian isolates of Metarhizium are effective for controlling immatures and adults of Bactrocera carambolae Drew & Hancock ...	13 KB	14 de Abr
E. O. Painter Printing	New invoice 100-2 R38 from E. O. Painter Printing Company, Inc. sent using FreshBooks - To view your invoice from E. O. Painter Printing Company, Inc. for your order to appear...	12 KB	14 de Abr
E. O. Painter Printing	New invoice 100-2 R52 from E. O. Painter Printing Company, Inc. sent using FreshBooks - To view your invoice from E. O. Painter Printing Company, Inc. for your order to appear...	12 KB	14 de Abr
Unattended	2017 FES 100-2 Pdf proof - RES 38 - This is an unmonitored mailbox, please do not reply to this email. emailcover@biociencetranslation.com Attached is a pdf of your article to ...	2 MB	14 de Abr
Unattended	2017 FES 100-2 Pdf proof - RES 52 - This is an unmonitored mailbox, please do not reply to this email. emailcover@biociencetranslation.com Attached is a pdf of your article to ...	1 MB	14 de Abr
Leyva	Re: manuscrito - I do not know if you need more file limits From: Ricardo Adame Da Silva ricardo.adame@embrapa.br To: Leyva sal.leyva@yahoo.com Sent: Thursday, 13 de abril de 2017 9:51	203 KB	14 de Abr

[SPAM] [FLAENT] Submission Acknowledgement

De: [Florida Entomological Society](#)

Para: [Ricardo Adame](#)

Responder para:

Ricardo Adame:

Thank you for submitting the manuscript, "Amazonian isolates of Metarhizium are effective for controlling immatures and adults of Bactrocera carambolae Drew & Hancock (Diptera: Tephritidae)" to Florida Entomologist. With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Manuscript URL: <https://insv91-ftp.trendmicro.com:443/wis/clicktime/v1/query?url=http%3A%2F%2Fjournals.fcla.edu%2Fflaent%2Fauthor%2Fsubmission%2F931968%2F44CEE7726-4D34-8385-8753-F7DE388D08A8auth%2F1be4651a15dc98d8fa3d8e359903180186d-63f37042e3249cf66537f2e8e3c0be7fc78f881d>

Username: ricardoadame

If you have any questions, please contact me. Thank you for considering this journal as a venue for your work.

Florida Entomological Society
Florida Entomologist
Florida Entomologist

abril de 2017

S	T	O	Q	S	S	D
27	28	29	30	31	1	2
3	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23
24	25	26	27	28	29	30
1	2	3	4	5	6	7

[Lista de amigos](#) [Beta]

ANEXO

Artigo científico

Running head:

Brito et al.: Amazonian isolates of *Metarhizium* controlling carambola fruit fly

Membership status:

Member (Ricardo Adaime da Silva, ID 1199)

Billing contact:

Ricardo Adaime

Embrapa Amapá

Rodovia Juscelino Kubitschek, km 5, No. 2600

Macapá, 68903-419, Brazil

Phone: +55 96 4009 9501

E-mail: ricardo.adaime@embrapa.br

Project Carambola Fruit Fly in Brazil: biology, ecology and control (SEG 02.14.01.002.00)

Amazonian isolates of *Metarhizium* are effective for controlling immatures and adults of *Bactrocera carambolae* Drew & Hancock (Diptera: Tephritidae)

Bruna David **Brito**¹, Adilson Lopes **Lima**², Kennedy Rodrigues **Cruz**³, Adriana **Bariani**²,
Cristiane Ramos de **Jesus-Barros**², José Francisco **Pereira**², and Ricardo **Adaime**^{1,2*}

¹Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical,
Macapá, Amapá, 68902-280, Brazil, E-mail: bruna-bio@hotmail.com (B. D. B.)

²Embrapa Amapá, Macapá, Amapá, 68903-419, Brazil, E-mail: adilson.lopes@embrapa.br
(A. L. L.), adriana.bariani@embrapa.br (A. B.), cristiane.jesus@embrapa.br (C. R. J.-B.),
jose-francisco.pereira@embrapa.br (J. F. P.), ricardo.adaime@embrapa.br (R. A.)

³Faculdade de Macapá, Macapá, Amapá, 68906-801, Brazil; E-mail:
kennedy.cruz@colaborador.embrapa.br (K. R. C.)

*Corresponding author; E-mail: ricardo.adaime@embrapa.br

Abstract

Bactrocera carambolae Drew & Hancock is a quarantine pest present in Brazil and constitutes the main phytosanitary barrier for the export of fresh fruits from that country. In this work, we evaluated the effect of Amazonian isolates of *Metarhizium* on the control of immatures and adults of *B. carambolae* in soil applications. The mortality of immatures in sterile soil treated with *Metarhizium anisopliae* was 70%. In addition, 100% of the adults that emerged from this substrate died up to 5 days later. This isolate caused the mortality of immatures in non-sterile soil, but its effect was more evident after adult emergence (70% mortality up to 10 days after emergence). *Metarhizium robertsii* was effective in reducing the immature population of the pest, especially in non-sterile soil, and caused a 60% reduction in adult survival 50 days after emergence. These results indicated the possible use of these isolates for the control of immatures and adults of *B. carambolae*, suggesting the possibility of using this biocontrol mode as another alternative in controlling this quarantine pest.

Key words: biological control, entomopathogenic fungi, fruit flies, carambola fruit fly

Resumo

Bactrocera carambolae Drew & Hancock é uma praga quarentenária presente no Brasil e se constitui na principal barreira fitossanitária para a exportação de frutos *in natura* desse país. Neste trabalho avaliamos o efeito de isolados amazônicos de *Metarhizium* no controle de imaturos e adultos de *B. carambolae* em aplicações no solo. A mortalidade de imaturos em solo estéril tratado com *M. anisopliae* foi de 70%. Adicionalmente, 100% dos adultos emergidos desse substrato morreram até 5 dias após a emergência. Esse isolado causou mortalidade de imaturos em solo não estéril, porém seu efeito ficou mais evidente após a emergência dos adultos (70% de mortalidade até 10 dias após a emergência). *Metarhizium robertsii* se mostrou eficiente na redução da população de imaturos da praga, especialmente em solo não estéril, além de proporcionar uma redução de 60% na sobrevivência dos adultos 50 dias após a emergência. Esses resultados viabilizam a utilização desses isolados para o controle de imaturos e adultos de *B. carambolae*, sugerindo a possibilidade da utilização dessa modalidade de biocontrole como mais uma alternativa de controle dessa praga quarentenária.

Palavras-chave: controle biológico, fungos entomopatogênicos, moscas-das-frutas, mosca-da-carambola

The occurrence of the carambola fruit fly (*Bactrocera carambolae* Drew & Hancock) (Diptera: Tephritidae) is considered to be the main phytosanitary barrier for fruit exports, since there are quarantine restrictions imposed by importing countries on the purchase of products from regions where the pest occurs (Godoy et al. 2011; Ferreira & Rangel 2015). In Brazil, it is classified as a current quarantine pest, with a distribution limited to the states of Amapá and Roraima, in the northern region of the country, and it is under official control coordinated by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (Brasil 2013; Morais et al. 2016).

The spread of the carambola fruit fly to fruit exporting regions of Northeast Brazil would result in losses of upwards of USD 60 billion, only for the mango crop, already in the fourth year after probable international embargo (Miranda et al. 2015). The potential for adaptation of the pest in areas of irrigated fruit production in the São Francisco Valley, in Northeast Brazil, was evaluated by Pessoa et al. (2016). These authors recorded conditions of temperature and average humidity favorable to the development of the pest. In addition, the supply of host fruits such as mango (*Mangifera indica*), acerola (*Malpighia emarginata*) and guava (*Psidium guajava*), produced in the region, provide potential for adaptation of the species. The control of *B. carambolae* is based especially on the use of toxic baits containing insecticides and the attractive methyl eugenol. According to Silva et al. (2016), these methods are efficient, but it has become necessary to phase out the use of malathion, given the known environmental and toxicological impacts of organophosphates. Thus, there is a need to search for alternative control techniques that may be added to the management of *B. carambolae* (Midgarden et al. 2016). Among these alternatives is biological control by the action of entomopathogenic fungi, such as those of the genus *Metarhizium*. These fungi live naturally in the soil, which allows the application/release of these biological control agents for the elimination of 3rd instar larvae and pupae of fruit flies (Ekesi et al. 2003; Maniania & Ekesi 2016). The use of *Metarhizium* isolates adapted to the prevailing ecological conditions in which they will be used is crucial, since the

control agent's tolerance to climatic stress seems to be related to its geographic origin (Vidal et al. 1997). Silva et al. (2016) evaluated the potential of Amazonian isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *M. robertsii* JF Bisch., Rehner & Humber for the control of immatures of *B. carambolae* and recorded a mean mortality of 36 and 14% in sterile soil, respectively. The authors emphasized the potential of using the isolate of *M. anisopliae* as a mycoinsecticide in soil application to reduce the pest population.

Thus, the aim of this work was to evaluate the pathogenicity of the isolates used by Silva et al. (2016), *M. anisopliae* and *M. robertsii*, on immatures and adults of *B. carambolae* under laboratory conditions.

Materials and methods

OBTAINING INSECTS

For the pathogenicity assays, 3rd instar larvae obtained from the breeding of *B. carambolae* were used in the Laboratory of Protection of Plants of Embrapa Amapá. For the breeding of the carambola fly in the laboratory, eggs of this pest species were constantly collected by induction of oviposition in an artificial device (aromatized plastic cups) (for further details, see Bariani et al. 2016). Subsequently, these eggs were placed in petri dishes containing larval feed. These plates were then packed in trays with vermiculite and stored in an air-conditioned room to obtain the puparia. After the puparia, the immature pupae are transferred to plastic pots containing vermiculite and conditioned in an air-conditioned room ($26 \pm 2^\circ\text{C}$ and 12-hour photoperiod) until the emergence of adults. After emergence, the adults were transferred to cages properly identified by generation, placed in a climatized room.

ISOLATES OF *Metarhizium*

Two isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium* were used in the present study, one of *M. anisopliae* (sensu strictu) (CPAFAP 3.8) and another of *M. robertsii* (CPAFAP 14.8). The identification of the isolates was carried out at Embrapa Genetic Resources & Biotechnology, in Brasília, Federal District, Brazil, using the mass spectrometry technique (MALDI-TOF) (Lopes et al. 2014). These species, besides being stored in Embrapa Amapá, are also preserved in the lyophilized and cryopreserved forms in the Fungus Collection of Invertebrates of Embrapa Genetic Resources & Biotechnology under the codes CG1313 (*M. anisopliae*) and CG1314 (*M. robertsii*).

GROWTH OF ISOLATES AND PREPARATION OF SUSPENSION OF CONIDIA

The *M. anisopliae* isolate was grown in Sabouroud dextrose agar (SDA) medium, whereas agar potato dextrose (BDA) culture medium was used for *M. robertsii*. For growth, both isolates were kept in an air-conditioned room ($26 \pm 2^\circ\text{C}$ and 12-hour photoperiod) for 28 days.

The suspensions of *M. anisopliae* and *M. robertsii* used for the pathogenicity test were prepared according to a method adapted from Ekesi et al. (2002). Accordingly, after the growth period of the entomopathogens, 15 mL of sterilized distilled water (SDW) containing 0.1% Tween 80 were added to each plate, and all plates were then scraped to recover the conidia, where their contents were combined to form a single suspension.

After obtaining the initial suspension, the conidia were counted in the Neubauer chamber and adjusted to 1×10^8 conidia/mL, thereby obtaining the working suspension. The working suspension contained 0.1% Tween 80 and 2% adhesive spreader (AGRAL®). The solution used for controls (control) contained only SDW with 0.1% Tween 80 and 2% adhesive spreader (AGRAL®).

PATHOGENICITY OF METARHIZIUM ISOLATES AGAINST IMMATURES AND ADULTS OF *B. carambolae*

The soil used as substrate for the pathogenicity assays was obtained from an urban orchard in the city of Macapá, Amapá State, Brazil. Prior to use, the soil was sieved, and part was autoclaved at 120°C for 20 minutes to serve as the sterile soil treatments. Thirty Gerboxes (11x11x3 cm) were used for the experiment: 5 for treatment with *M. anisopliae* in sterile soil and 5 in non-sterile soil; 5 for treatment with *M. robertsii* in sterile soil and 5 in non-sterile soil; and the other 10 boxes were for the controls in sterile and non-sterile soils. Each Gerbox contained 100 g of sterile or non-sterile soil.

A volume of 10 mL of the conidial suspensions (1×10^8 conidia/mL) of the *Metarhizium* isolates was sprayed on the soil of the Gerboxes corresponding to the treatments with the entomopathogens. After spraying the conidial suspensions, 10 3rd instar larvae of *B. carambolae* were distributed on the soil of each of the boxes. In the controls, we sprayed only SDW solution containing 0.1% Tween 80 and 2% AGRAL® adhesive spreader. Each Gerbox was then transferred to a climatized room ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, without photoperiod). Every day, the Gerboxes were inspected and moistened with SDW.

Starting on the fifth day after the start of the pathogenicity assay, we recorded the numbers of emerged adults from the soils treated with *Metarhizium* isolates and the untreated (control) soils. All adults that emerged from the treated and untreated soils were individualized in cages (500 mL plastic pots, with an open lid covered with organza fabric), where water (in a plant tissue-type sponge) and feed were made available (yeast extract Bionis® YE MF and refined sugar, 1: 3 ratio, supplied on cotton in Petri dishes). The insects were evaluated daily until the death of all of them. To confirm infection by *Metarhizium*, non-emerged pupae and

dead adults in the cages were disinfested superficially with 1.5% sodium hypochlorite solution and incubated in a humid chamber to expose the characteristic signs of entomopathogens.

STATISTICAL ANALYSIS

Arcsine square-root transformation was used for analysis of variance of the mortality of *B. carambolae* immatures, and the means were compared using the Tukey test at 5% probability. The survival analysis of *B. carambolae* adults was performed using the parametric method based on quantitative data using the Kaplan-Meier model. BioStat 5.3 software was used for the statistical analyses (Ayres et al. 2007).

Results

Our results demonstrated the ability of Amazonian isolates of *M. anisopliae* and *M. robertsii* to cause the mortality of *B. carambolae* immatures in soil. This was more pronounced in sterile soil, where *M. anisopliae* caused the mortality of 70%, which was superior to the treatment with *M. robertsii* (36%) and control 12% (Table 1).

In non-sterile soil the treatment with the *M. robertsii* isolate caused higher mortality than in control. Curiously, the mortality caused by the *M. anisopliae* isolate in non-sterile soil was only 28%, which was not significantly different in relation to the control treatment. This difference was also not observed when comparing the mortality caused by the two *Metarhizium* isolates in non-sterile soil (Table 1).

In addition to showing a substantial effect on the mortality of immatures, the isolates *M. anisopliae* and *M. robertsii* had notable effect on the survival of *B. carambolae* adults (Figure 1). The reduction in survival of adults that emerged from *M. anisopliae*-infected larvae was substantial in both sterile and non-sterile soil. After five days of emergence, all flies that

emerged from sterile soil treated with this isolate died (Figure 1A). In non-sterile soil, *M. anisopliae* also reduced considerably the survival of *B. carambolae* adults. Survival decreased by approximately 70% in only 10 days after the emergence of adults (Figure 1C). It is also worth mentioning that there was a 90% reduction in adult survival in non-sterile soil treated with *M. anisopliae* (Figure 1C) 50 days after emergence.

M. robertsii also caused a reduction in the survival of *B. carambolae* adults in both sterile and non-sterile soil. The reduction was lower than that caused by *M. anisopliae*, but it can be considered relevant, since at 50 days after emergence, there was a decrease in survival of approximately 70% in sterile soil (Figure 1B) and 60% in non-sterile soil (Figure 1D).

In the control treatments with sterile and non-sterile soil, the reduction in *B. carambolae* survival was gradual, with 50% of adults still alive at 150 days after emergence (Figure 1E and 1F).

Discussion

The effect of the Amazonian isolates of the entomopathogenic fungi *M. anisopliae* and *M. robertsii* on the reduction of *B. carambolae* populations was evident. In our study, the percentages of mortality of *B. carambolae* immatures were greater than those obtained by Silva *et al.* (2016), with the same isolates of *Metarhizium*, for the control of pest immatures in sterile soil. Those authors reported mortality rates of 36 and 14% for *M. anisopliae* and *M. robertsii*, respectively. In our study, the values obtained were 70 and 36% (Table 1). These differences in results may be associated with adaptations in the methods employed. To approximate as much as possible the laboratory conditions to the field conditions, we used a smaller volume of soil and a larger volume of conidial suspension than those used by Silva *et al.* (2016). Despite the importance of this group of natural enemies in the biological control of *Bactrocera* spp.,

there are still few related studies. Gul et al. (2015), in Multan, Pakistan, evaluated the potential of the entomopathogenic fungus *M. anisopliae* for the control of immatures of *B. zonata* (Saunders) in sterile soil. Conidial suspensions of 1x, 2x and 3x10⁸ conidia/mL were used, and later the emergence of adults from infected pupae was evaluated. At a concentration of 1x10⁸ conidia/mL, the emergence of adults was 95%, whereas at concentrations of 2x and 3x10⁸ conidia/mL, emergence was around 80%. Even using different concentrations, these results showed considerably lower effects than those obtained in the present study, since *M. anisopliae* treatment in sterile soil reduced the emergence of adults by 70% (Table 1). In addition, it should be considered that the concentration of *M. anisopliae* used in our study was only 1x10⁸ conidia/mL.

Sterilized soil was also used as a substrate to evaluate the effect of *M. brunneum* Petch on immatures of *B. oleae*, in Córdoba, Spain (Yousef et al. 2013). The substrate treated with the entomopathogen had a significant effect on *B. oleae* mortality, since 82.27% of these immatures did not reach adulthood, while 64.55% reached this stage in the control treatment. In the Spanish study, immature mortality in the control treatment was high (35.45%) compared to our study (12%). This makes the reduction in adult emergence of *B. carambolae* by *M. anisopliae* (70%) in the present work greater in absolute percentage compared to that obtained by these cited authors, since they reached a reduction in emergence of 47%, while we found decrease of 58%.

Sookar et al. (2010) evaluated the potential of *M. anisopliae* isolates for the control of *B. zonata* and *B. cucurbitae* (Coquillett), considered the main fruit pests in Mauritius, Africa. The authors used a conidial concentration and soil volume similar to those used in the present study and observed a percentage of emergence in treated soils of 60-93% and 52-92% for *B. zonata* and *B. cucurbitae*, respectively. In our study, the maximum percentage of emergence of *B. carambolae* in sterile soil treated with *M. anisopliae* was 30%, whereas for *M. robertsii* the

emergence rate in non-sterile treated soil was 56%. These results attest to the technical viability of the use of Amazonian isolates for the control of *B. carambolae* immatures, especially considering that in our study the application of conidia was only on the soil surface. However, the above cited authors applied the conidia to the soil with subsequent mixing to facilitate the contact of the entomopathogenic propagules with fruit fly immatures, which is not feasible under field conditions. The effectiveness of the application of *M. anisopliae* in the soil combined with the use of spinosad-based bait was also evaluated for the control of *B. dorsalis* (Hendel) in Nthagaiya, Kenya (Ekesi et al. 2011). The authors reported a significant reduction in the pest population when the two strategies were used together. In addition, laboratory studies using soil treated with the entomopathogen indicated emergence rates of *B. dorsalis* adults on the order of 25-36%, while the emergence obtained with untreated soil was 80-82%.

In addition to immature mortality, the effect of the isolates evaluated in this study on the survival of *B. carambolae* adults should be highlighted. The longevity of flies that emerged from larvae infected by *M. anisopliae* and *M. robertsii* on sterile and non-sterile soil was considerably affected. Flies that had no contact with entomopathogenic fungi (Figure 1 E and F) showed a maximum longevity of 240 days. Silva et al. (2016) indicated that adults emerging from soils treated with *M. anisopliae* and *M. robertsii* isolates had a very short life but did not evaluate survival. Thus, it is important to emphasize the novelty of this study regarding the evaluation of the survival of adults of the carambola fruit fly emerging from soil treated with entomopathogens, since most of the studies consider only the decrease in emerging adults, without evaluating the subsequent mortality caused by infection of immatures still in the soil.

In our study, the longevity of *B. carambolae* adults in sterile soil was very low, around five days for 100% of adults emerging from *M. anisopliae*-treated soil (Figure 1A) and 50 days for 70% of adults from soil treated with *M. robertsii* (Figure 1B). These results demonstrate the great ability of our isolates to infect immature carambola fruit flies in the soil under laboratory

conditions. Nevertheless, in nature the conditions of sterile soil cannot be replicated. For non-sterile soil conditions, the longevity of *B. carambolae* adults was 10 days for approximately 70% of the individuals that emerged from *M. anisopliae*-treated soil (Figure 1C). *M. robertsii* also caused significant adult mortality, on the order of 60% at 50 days after emergence (Figure 1D). These results are extremely encouraging and present new perspectives for the control of *B. carambolae* under field conditions. In Brazil, Jesus-Barros et al. (in preparation) evaluated the fecundity of *B. carambolae* in the laboratory and recorded that the pre-reproductive period was on average 25 days. Thus, the isolates studied caused high adult mortality before the beginning of the oviposition period of the females, showing a direct effect on population reduction of the next generations of *B. carambolae*.

Another practical implication is the possibility of adults emerging from soil treated with *Metarhizium* isolates to actively transport the infective (conidia) parasitic entomopathogens to the pest concentration niches, causing healthy individuals to be infected (horizontal transfer), especially during copulation. However, studies on the daily behavior of *B. carambolae* individuals treated and not treated with the isolates need to be performed.

On the other hand, our results also suggest the possibility of the combined use of the isolates, since in non-sterile soil, *M. robertsii* caused higher mortality than that caused by *M. anisopliae* (Table 1), whereas the latter superseded *M. robertsii* in reducing adult survival after emergence (Figure 1C). In this way, the combined use of the two isolates may provide population control of *B. carambolae* superior to their use alone.

Based on the results obtained in this work, it was possible to determine the effect of the Amazonian *Metarhizium* isolates on the mortality of at least 28% of immatures and on the survival of *B. carambolae* adults, at least 60% before the reproductive period of the pest.

Accordingly, we can consider the possibility of using biological control with entomopathogenic fungi as an alternative strategy to control *B. carambolae* in Brazil. Of course,

studies that further potentiate the action of isolates tested in this study, especially *M. anisopliae*, should be performed. One of these actions is the development of suitable formulations that allow greater viability of the bioinsecticide propagules, as well as guaranteeing their activity in conditions of high soil moisture, since their use for the control of the carambola fruit fly will occur in regions of the Amazon subjected to high rainfall in the first six months of the year.

Acknowledgments

We thank the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the Research Productivity Fellowship granted to R. Adaime, and the Brazilian Ministry of Agriculture and Food Supply for authorizing the publication of data on carambola fruit flies, as provided under Normative Rule No. 52/2007. Dr. A. Leyva (USA) helped with English translation and editing of the manuscript.

References

- Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AA [eds.]. 2007. BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém; Sociedade Civil Mamirauá: MCT-CNPq, 2007.
- Bariani A, Jesus-Barros CR, Carvalho JP, Mota-Júnior LO, Nascimento PR, Cruz KR, Facundes VS. 2016. Técnicas para criação da mosca-da-carambola (*Bactrocera carambolae* Drew & Hancock) em laboratório para pesquisa científica. (Embrapa Amapá. Documentos, 97). Embrapa Amapá, Macapá, Amapá, Brasil. 31 p.
- Brasil. 2013. Instrução Normativa N.º 59, de 18 de dezembro de 2013. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 19 dez. 2013, Seção 1: 91–92.

- Ekesi S, Maniania NK, Mohamed SA. 2011. Efficacy of soil application of *Metarhizium anisopliae* and the use of GF-120 spinosad bait spray for suppression of *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) in mango orchards. *Biocontrol Science and Technology* 21: 299–316.
- Ekesi S, Maniania NK, Lux SA. 2003. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritidae fruit fly puparia. *Journal of Invertebrate Pathology* 83: 157–167.
- Ekesi S, Maniania NK, Lux SA. 2002. Mortality in three African tephritidae fruit fly puparia and adults caused by the entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology* 12: 7–17.
- Ferreira ME, Rangel PHN. 2015. Melhoramento genético preventivo: obtenção de estoques genéticos resistentes a pragas quarentenárias de alto risco para a agricultura brasileira, pp. 275–292 *In* Sugayama RL, Silva ML, Silva SXB, Rangel LEP. [eds.], *Defesa vegetal: fundamentos, ferramentas, políticas e perspectivas*. Sociedade Brasileira de Defesa Agropecuária, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
- Godoy MJS, Pacheco WSP, Portal RR, Pires Filho JM, Moraes LMM. 2011. Programa Nacional de Erradicação da Mosca-da-Carambola, pp. 134–158 *In* Silva RA, Lemos WP, Zucchi RA [eds.], *Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais*. Embrapa Amapá, Macapá, Amapá, Brazil.
- Gul HT, Freed S, Akmal M, Malik MN. 2015. Vulnerability of different life stages of *Bactrocera zonata* (Tephritidae: Diptera) against entomogenous fungi. *Pakistan Journal of Zoology* 47: 307–317.
- Lopes RB, Faria M, Souza DA, Bloch C Jr, Silva LP, Humber RA. 2014. MALDI-TOF mass spectrometry applied to identifying species of insect-pathogenic fungi from the *Metarhizium anisopliae* complex. *Mycologia* 106: 865-878.

- Maniania JNK, Ekesi S. 2016. Development and Application of Mycoinsecticides for the Management of Fruit Flies in Africa, pp. 307–324 *In* Ekesi S, Mohamed SA, Meyer M [eds.], Fruit Fly Research and Development in Africa - Towards a Sustainable Management Strategy to Improve Horticulture. Springer, Switzerland.
- Midgarden D, van Sauers-Muller A, Godoy MJS, Vayssières JF. 2016. Overview of the Programme to Eradicate *Bactrocera carambolae* in South America, pp. 705–736 *In* Ekesi S, Mohamed SA, Meyer M [eds.], Fruit Fly Research and Development in Africa - Towards a Sustainable Management Strategy to Improve Horticulture. Springer, Switzerland.
- Miranda SHG, Nascimento AM, Ximenes VP. 2015. Potenciais impactos socioeconômicos da expansão da mosca-da-carambola, pp. 132–149 *In* Vilela EF, Zucchi RA. Pragas introduzidas no Brasil: insetos e ácaros. FEALQ Piracicaba, São Paulo, Brazil.
- Morais EGF, Jesus-Barros CR, Adaime R, Lima AL, Navia D. 2016. Pragas de expressão quarentenária na Amazônia, pp. 521–559 *In* Silva NM, Adaime R, Zucchi RA [eds.], Pragas Agrícolas e Florestais na Amazônia. Embrapa, Brasília, Distrito Federal, Brazil.
- Pessoa MCPY, Prado JSM, Mingoti R, Lovisi-Filho E, Silva AS, Moura MSB, Silva-Filho PP, Sá LAN, Prado SS, Spadotto CA, Farias AR. 2016. Estimativas de potencial adaptação de *Bactrocera carambolae* Drew & Hancock (praga quarentenária A2): estudo de caso para dois perímetros irrigados do Vale do Rio São Francisco. Embrapa Gestão Territorial, Campinas, São Paulo, Brazil. 2 p.
- Silva TL, Lima AL, Sousa MSM, Jesus-Barros CR, Bariani A, Pereira JF, Adaime R. 2016. Potential of Amazonian isolates of *Metarhizium* to control immatures of *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae). Florida Entomologist 99: 788–789.

- Sookar P, Bhagwant S, Allymamod MN. 2010. Mortality in Tephritid Fruit Fry Puparia and Adults Caused by *Metarhizium Anisopliae*, *Paecilomyces Fumosoroseus* and *Beauveria Bassiana*. Univ. Res. J. Univ. Mauritius 16. <http://ucampus.uom.ac.mu/rci/resjournal/pastissue.php?ujid=25>. Accessed on March 3, 2017.
- Vidal CJ, Fargues J, Lacey LA. 1997. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: effect of temperature on vegetative growth. Journal of Invertebrate Pathology 70: 18–26.
- Yousef M, Lozano-Tovar MD, Garrido-Jurado I, Quesada-Moraga E. 2013. Biocontrol of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) with *Metarhizium brunneum* and its extracts. Journal of Economic Entomology 106: 1118-1125.

Table 1. Mortality (%) of immatures of *B. carambolae* in sterile and non-sterile soils treated with *M. anisopliae* and *M. robertsii*.

Treatment	Substrates*			
	Sterile soil (mean % \pm SD)		Non-sterile soil (mean % \pm SD)	
Control	12.0 \pm 16.43	aB	16.0 \pm 8.94	a B
<i>M. anisopliae</i>	70.0 \pm 15.81	aA	28.0 \pm 21.68	bAB
<i>M. robertsii</i>	36.0 \pm 13.42	aB	44.0 \pm 21.91	aA

*Mean values followed by the same lowercase letter in the same row or the same uppercase letter in the same column do not differ significantly, based on Tukey test at 5% probability.

Treatments: $F = 11.46$; $df = 2, 24$; $P = 0.120$

Substrates: $F = 2.60$; $df = 1, 24$; $P < 0.001$

Treatments*Substrates: $F = 6.69$; $df = 2, 24$; $P = 0.005$

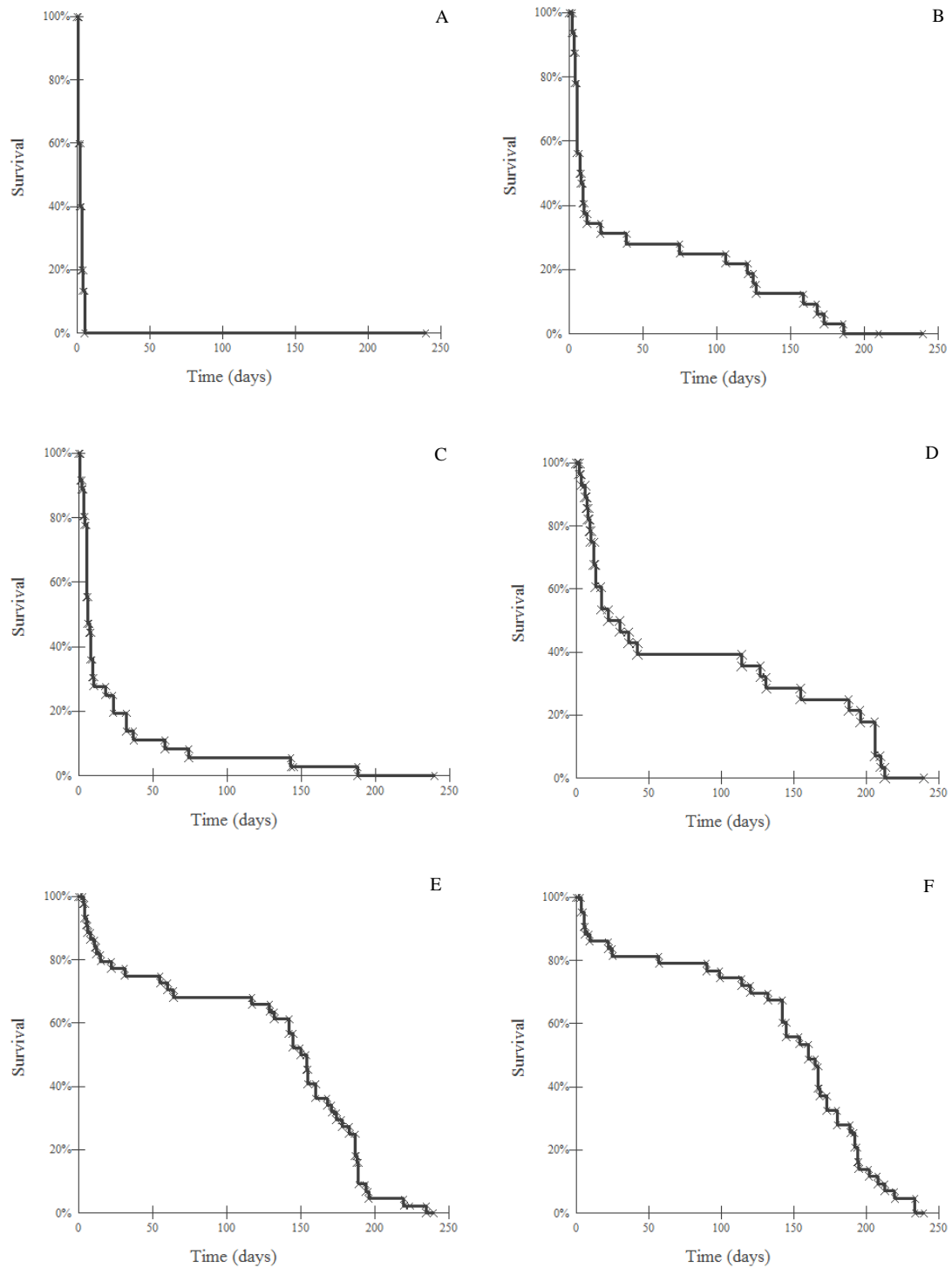


Figure 1. Percent survival of *B. carambolae*. (A) Sterile soil treated with *M. anisopliae*; (B) Sterile soil treated with *M. robertsii*; (C) Non-sterile soil treated with *M. anisopliae*; (D) Non-sterile soil treated with *M. robertsii*; (E) Sterile soil not treated with entomopathogens; and (F) Non-sterile soil not treated with entom