



**Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)
Sorokin e azadiractina sobre *Ceratitis capitata*
(Wied.)**

HUGO RIBEIRO DE SOUZA

2010

HUGO RIBEIRO DE SOUZA

**Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)
Sorokin e azadiractina sobre *Ceratitis capitata*
(Wied.)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”

Orientadora
Prof^ª. D.Sc. Teresinha Augusta Giustolin

JANAÚBA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

S725i Souza, Hugo Ribeiro de.
Interação de *metarhizium anisopliae* (Metsch) sonokin e azadiratina sobre *ceratitis capitata* (Wied.) [manuscrito] / Hugo Ribeiro de Souza. – 2010.

131 p.

Dissertação (mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, Universidade Estadual de Montes Claros-Unimontes, 2010.

Orientadora: Prof^a. D.Sc. Teresinha Augusta Giustolin.

1. *Ceratitis capitata*. 2. *Metarhizium anisopliae*. 3. Moscas-das-frutas. I. Giustolin, Teresinha Augusta. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.

CDD. 632.7

HUGO RIBEIRO DE SOUZA

**Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)
Sorokin e azadiractina sobre *Ceratitis capitata*
(Wied.)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”

Aprovada: em 26 de fevereiro de 2010.

Prof. ^a D.Sc. Teresinha Augusta Giustolin UNIMONTES (Orientadora)	Prof. ^a D.Sc. Adelica Aparecida Xavier UNIMONTES (Co-orientadora)
--	--

Prof. ^a D.Sc. Clarice Diniz A. Corsato UNIMONTES	Prof. ^a D.Sc. Regina Cássia F. Ribeiro UNIMONTES
--	--

D.Sc. Ranyse Barbosa Querino da Silva
EMBRAPA MEIO NORTE

JANAÚBA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

DEDICATÓRIA

A Deus,

Meus Pais José e Maria do Carmo,
minhas irmãs, Danyelle e Juliany
e minha namorada Poliana,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção, força e coragem nas horas de dificuldade impulsionando-me a alcançar meus objetivos;

Aos meus pais, José e Maria do Carmo, pelo exemplo de luta, honestidade e perseverança, além dos sacrifícios feitos pelos meus estudos;

À professora D.Sc. Teresinha Augusta Giustolin, pela orientação, confiança, disponibilidade e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho;

À Prof^ª. D.Sc. Clarice Diniz Alvarenga Corsato, pelos ensinamentos durante a graduação e o mestrado;

À Prof^ª. D.Sc. Adelica Aparecida Xavier, pelos ensinamentos e apoio incondicional durante os experimentos;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, em especial àqueles dos quais cursei as disciplinas, por terem compartilhado os seus conhecimentos comigo;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa concedida;

Ao D.Sc. Paulo Bogorne, por disponibilizar o produto NeemAzal-T/S;

Ao Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, Piracicaba-SP, na pessoa do Prof. Dr. Sérgio Batista Alves (*in memoriam*), por fornecer os isolados de *M. anisopliae*;

Ao Laboratório “Oldemar Cardim Abreu” de Controle Biológico do Centro Experimental do Instituto Biológico de São Paulo, Campinas-SP,

na pessoa do Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida, por fornecer os isolados de *M. anisopliae*;

À Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Banco de Microrganismos Entomopatogênicos, na pessoa do Profº D.Sc. Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves, por fornecer os isolados de *M. anisopliae*;

Às minhas irmãs, Danyelle e Juliany, pelo carinho e por acreditarem em minhas vitórias;

Aos parentes e amigos que acreditaram e apoiaram os meus estudos;

À minha namorada, Poliana, pelo carinho e compreensão;

Aos estagiários do Laboratório de Entomologia da UNIMONTES, em especial ao Paulo Roberto, Luis Henrique, Patrícia Leite e Heliselle Ramires, pela amizade e ajuda na implantação dos experimentos;

Aos amigos do mestrado, em especial a Lidiane Londe, Otávio Diniz e Francisco Ermelindo, pela amizade, conselhos e os momentos de alegria;

Aos amigos de república, pela amizade;

E a todos que, direta ou indiretamente, me deram força para conquistar mais uma vitória.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	5
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
2.1 As moscas-das-frutas.....	8
2.1.1 Aspectos gerais.....	8
2.1.2 Importância econômica.....	8
2.2 <i>Ceratitidis capitata</i>	10
2.3 Controle de moscas-das-frutas.....	11
2.3.1 Fungos entomopatógenos.....	12
2.3.2 Controle com inseticida botânico.....	16
2.4 Interação dos métodos.....	19
CAPITULO I - PATOGENICIDADE E AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.) Sorokin SOBRE <i>Ceratitidis capitata</i> Wied. (DIPTERA:TEPHRITIDAE).....	36
RESUMO.....	36
ABSTRACT.....	37
1 INTRODUÇÃO.....	38
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4 CONCLUSÕES.....	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
CAPITULO II - TOXICIDADE DE AZADIRACTINA SOBRE A BIOLOGIA DE <i>Ceratitidis capitata</i> (Wied.).....	59
RESUMO.....	59
ABSTRACT.....	60
1 INTRODUÇÃO.....	61
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
3.1 Efeito sobre o desenvolvimento.....	66
3.2. Mortalidade.....	69
3.3 Anormalidades e deformações.....	75
3.4 Fecundidade, fertilidade e longevidade de adultos.....	77
4 CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
CAPITULO III - ASSOCIAÇÃO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> (METSCH.) E DE AZADIRACTINA SOBRE <i>Ceratitidis capitata</i> (WIED.).....	86
RESUMO.....	86
ABSTRACT.....	87
1 INTRODUÇÃO.....	88

2 MATERIAL E MÉTODOS	90
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
4 CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
CAPÍTULO IV - TOXICIDADE DE AZADIRACTINA SOBRE O	
DESENVOLVIMENTO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> (METSCH.)	105
RESUMO	105
ABSTRACT	106
1. INTRODUÇÃO	107
2. MATERIAL E MÉTODOS	109
2.1 Toxicidade do NeemAzal-T/S sobre o crescimento micelial de <i>M. anisopliae</i>	109
2.2 Toxicidade do NeemAzal-T/S sobre a esporulação de <i>M. anisopliae</i>	110
2.3 Toxicidade do NeemAzal-T/S sobre a viabilidade dos conídios de <i>M.</i> <i>anisopliae</i>	111
2.3.1 Viabilidade dos conídios após imersão em diferentes concentrações de NeemAzal-T/S	111
2.3.2 Viabilidade dos conídios após crescimento em meio contendo diferentes concentrações de NeemAzal-T/S	112
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	113
4 CONCLUSÕES	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

RESUMO GERAL

¹SOUZA, Hugo Ribeiro de. **Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e azadiractina sobre *Ceratitis capitata* (Wied.)**. 2010. 121p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a interação do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* com a azadiractina para o controle da mosca-das-frutas, *Ceratitis capitata*. Inicialmente foram avaliados 10 isolados desse fungo, visando a selecionar o mais virulento a *C. capitata*. A seleção foi feita a partir da imersão das larvas de 3º ínstar em suspensões de conídios de cada um dos isolados. Após o tratamento, as larvas foram transferidas para copos descartáveis contendo vermiculita, visando a pupação e emergência de adultos. Casais foram formados com os adultos emergidos e a viabilidade dos ovos foi avaliada. O isolado ESALQ 1037 foi selecionado como sendo o mais virulento à mosca. Este isolado causou baixa mortalidade das larvas, mas alta das pupas, assim como os demais isolados. Causou anormalidades nos pupários e deformações nos adultos. As fêmeas provenientes de larvas tratadas com este isolado apresentaram menor longevidade. A toxicidade da azadiractina à *C. capitata* foi avaliada a partir da utilização do produto NeemAzal-T/S (contém 10.000 ppm de azadiractina). Diferentes concentrações de NeemAzal foram adicionadas à dieta artificial e oferecidas a larvas recém-eclodidas de *C. capitata*. As pupas obtidas foram transferidas para recipientes plásticos, visando à emergência de adultos. Casais foram formados com estes adultos, e a fecundidade, fertilidade e longevidade dos adultos foram avaliadas. A concentração de 339 causou 90% de mortalidade das larvas de *C. capitata*. As concentrações menores causaram menores porcentagens de mortalidades de larvas e pupas; entretanto, alongou a fase larval e reduziu a pupal e provocou anormalidades nos pupários e deformações nos adultos. Ocorreu, ainda, redução na fertilidade, fecundidade e longevidade de fêmeas da mosca. A interação do fungo com a azadiractina foi avaliada *in vivo*. Larvas recém-eclodidas foram criadas em dieta artificial contendo 12 ppm de NeemAzal e quando atingiram o 3º ínstar foram imersas na suspensão de conídios do isolado ESALQ 1037. Efeito sinérgico dos dois agentes de controle sobre *C. capitata* somente foi observado na variável duração da fase pupal. O isolado ESALQ 1037 causou significativa mortalidade das larvas e pupas e provocou anormalidades nos pupários. A azadiractina provocou significativa deformação nos adultos. O crescimento micelial do isolado ESALQ

¹ Comitê Orientador: Prof^ª. Teresinha Augusta Giustolin – DCA/UNIMONTES (orientador); Prof^ª. Adélica Aparecida Xavier – DCA/UNIMONTES (Co-orientador).

1037 foi avaliado *in vitro* em meio de cultura contendo diferentes concentrações de azadiractina. Todas as concentrações avaliadas estimularam o crescimento micelial do fungo. Nenhuma delas afetou a esporulação ou a viabilidade dos conídios de *M. anisopliae*. Conclui-se que *M. anisopliae* é patogênico à *C. capitata*, o produto NeemAzal-T/S é tóxico às diferentes fases de desenvolvimento da mosca, e a associação destes dois agentes de controle é viável para ser utilizada no controle de *C. capitata*.

GENERAL ABSTRACT

SOUZA, Hugo Ribeiro de. **Interaction of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin and azadirachtin on *Ceratitis capitata* (Wied).** 2010. 121p. Dissertation (Master's degree in Plant Production in the Semi-arid) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG¹.

This study aimed to evaluate the interaction of the fungus *Metarhizium anisopliae* with azadirachtin for control of *Ceratitis capitata*. Initially 10 isolates of that fungus were evaluated in order to select the most virulent to *C. capitata*. The selection was made from the immersion of the larvae of 3rd instar in conidia suspension of each isolate. After the treatment, the larvae were transferred to plastic drinking-glasses containing vermiculite seeking pupation and adult emergence. Couples were formed with the emerged adults and the viability of eggs was assessed. The ESALQ 1037 isolate was selected as the most virulent to fly. This isolate caused low mortality of larvae, but high one of pupae, as well as all other isolates. It caused abnormalities in puparia and deformities in adults. The females from larvae treated with this isolate showed lower longevity. The toxicity of azadirachtin to *C. capitata* was evaluated through the use of the NeemAzal-T/S product (it contains 10.000 ppm azadirachtin). Different concentrations of NeemAzal were added to artificial diet and offered to new-hatched larvae of *C. capitata*. The obtained pupae were transferred to plastic containers, aiming at adult emergence. Couples were formed with these adults, and fecundity, fertility and longevity of adults were evaluated. The concentration of 339 caused 90% mortality of larvae of *C. capitata*. The lower concentrations caused smaller percentages of larvae and pupae mortality; however, lengthened the larval stage and reduced the pupal one and caused abnormalities in puparia and deformities in the adults. There was also a reduction in fertility, fecundity and longevity of the females fly. The interaction of the fungus with azadirachtin was evaluated *in vivo*. New-hatched larvae were reared on artificial diet containing 12 ppm of NeemAzal and when they reached the 3rd instar were immersed in ESALQ 1037 isolate suspension. Synergistic effect of two control agents on *C. capitata* was just observed on the pupal stage duration variable. The ESALQ 1037 isolate caused significant larvae and pupae mortality and abnormalities in the puparia. Azadirachtin caused significant deformation in adults. The mycelial growth of the ESALQ 1037 isolate was evaluated *in vitro* in culture medium containing different concentrations of azadirachtin. All the tested concentrations stimulated the mycelial growth. None of them affected the

¹ Guidance Committee: Prof^a. Teresinha Augusta Giustolin – DCA/UNIMONTES (Advisor); Prof^a. Adélica Aparecida Xavier – DCA/UNIMONTES (Co-advisor).

sporulation or the viability of *M. anisopliae* conidia. It can be concluded that *M. anisopliae* is pathogenic to *C. capitata* and NeemAzal-T/S is toxic to different phases of the fly development, and the association of these two control agents is feasible for use in *C. capitata* control.

1 INTRODUÇÃO GERAL

As moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) são pragas de grande importância para a fruticultura não só pelos danos diretos que causam às frutas, como também pela limitação às exportações devido às restrições quarentenárias (BITTENCOURT *et al.*, 2006). Sua incidência é um fator de preocupação por causa dos aumentos nos custos de produção em razão das freqüentes aplicações de inseticidas e perdas na produção (NORA *et al.*, 2000). Foi estimado que nas Américas do Sul e Central as perdas foram da ordem de 25%, tendo sido menores no início da frutificação e cerca de 80% no final do período de frutificação (ENKERLIN *et al.*, 1989). Dependendo das condições climáticas e da presença de plantas hospedeiras, em algumas regiões brasileiras essa praga já comprometeu até 100% da produção (CARVALHO, 2005).

As principais espécies de moscas-das-frutas de importância econômica estão distribuídas entre os gêneros *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitidis* e *Ragoletis* (ZUCCHI, 2000). *Ceratitidis capitata* (Wied.) apresenta a maior distribuição territorial e mundial, tendo sido descrita em 20 países, em 211 plantas cultivadas e em 102 hospedeiros silvestres. Para a maioria das fruteiras comerciais, as perdas na produção ocasionadas por esses insetos variam entre 10 e 50% (SAMPERIO e VALENZUELA, 1992).

O controle de *C. capitata* vem sendo realizado basicamente por meio de iscas, utilizando inseticida químico associado a um atraente alimentar (CARVALHO, 2006). Embora sejam eficazes, os atraentes alimentares podem atingir insetos não alvo, provocando desequilíbrio ambiental e problemas a saúde humana. Por esse motivo, tem se observado uma crescente procura por alimentos sem resíduos de agroquímicos (CARVALHO e NASCIMENTO, 2002).

A busca por práticas que visem à melhoria na qualidade de produtos alimentares, além de garantir saúde ao homem, vem acompanhada de reflexos positivos do ponto de vista social, ambiental e econômico, uma vez que tais práticas minimizam e/ou eliminam a presença de resíduos nos alimentos, poluição das águas, do solo e do ar (ARAUJO JUNIOR *et al.*, 2008).

Os programas de manejo integrado de pragas têm incentivado o uso de medidas alternativas de controle de moscas-das-frutas (ALVARENGA, 2006), sendo o controle biológico o mais indicado. Dentre os agentes de controle biológico utilizados, os fungos entomopatogênicos são considerados uma alternativa viável devido à facilidade de produção, aplicação e eficácia (MARQUES *et al.*, 2004).

Os fungos entomopatogênicos são promissores ao controle das moscas-das-frutas. Destes, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin teve sua eficiência comprovada sobre *C. capitata* (ALMEIDA *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2004; GARCIA *et al.*, 1985 e 1989; QUESADA-MORAGA, 2008).

Uma outra medida alternativa ao método tradicional poderia ser a utilização da planta nim (*Azadirachta indica* A. Juss), da família Meliaceae que possui elevado potencial inseticida (CIOCIOLA JUNIOR e MARTINEZ, 2002). Vários compostos presentes nesta planta apresentam bioatividade aos insetos praga, provocando efeitos de deterrência alimentar, redução no crescimento, interferência nas ecdises, mortalidade e até redução na fecundidade e fertilidade (MORDUE (LUNZT) e NISBET, 2000). Tanto o óleo como o extrato de nim apresentam efeito sobre *C. capitata* (DI ÍLIO *et al.*, 1999; HABIBE *et al.*, 2003; SALLES e RECH, 1999; VINUELA *et al.*, 2000).

Considerando-se a crescente demanda por alimentos livres de resíduos de agroquímicos e baseados nos inúmeros resultados promissores sobre a utilização de fungos entomopatogênicos e de produtos a base de nim no controle

de insetos-praga, este trabalho teve por objetivo estudar a possibilidade de associação do fungo *M. anisopliae* e da azadiractina na biologia de *C. capitata*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 As moscas-das-frutas

2.1.1 Aspectos gerais

As moscas-das-frutas (Diptera, Tephritidae) são consideradas uma das principais pragas da fruticultura mundial (CARVALHO, 2005). Os representantes da família Tephritidae apresentam ampla distribuição geográfica, sendo constituída por 4.352 espécies agrupadas em 481 gêneros, dos quais somente cinco são de importância econômica: *Anastrepha*, *Ceratitis*, *Bactrocera*, *Rhagoletis* e *Toxotrypana* (MALAVASI *et al.*, 2000).

O gênero *Toxotrypana* é constituído por uma única espécie de importância econômica, a *T. cucurbitae* Gerstaecker (mosca-da-papaia), que não ocorre no Brasil. O gênero *Bactrocera* é representado por uma única espécie, a *B. carambolae* Drew e Hancock (mosca-da-carambola), que está restrita ao Oiapoque, AP. O gênero *Rhagoletis* é representado por quatro espécies registradas no Brasil, mas possui pouca importância econômica, já que suas espécies são referidas esporadicamente como pragas na região Sul. O gênero *Ceratitis* possui uma única espécie representante no Brasil, a mosca-do-mediterrâneo, *C. capitata* Wied., que juntamente com espécies do gênero *Anastrepha* representam as moscas-das-frutas mais importantes do ponto de vista econômico (ZUCCHI, 2000).

2.1.2 Importância econômica

A importância econômica das moscas-das-frutas se deve aos danos diretos e indiretos causados à produção. As fêmeas provocam dano direto através da oviposição, e as larvas por meio do seu desenvolvimento no interior

do fruto (NAVA, *et al.*, 2006). As larvas, ao se alimentarem da polpa dos frutos, os tornam inadequados para o consumo e para a industrialização (NASCIMENTO e CARVALHO, 2000; ARAÚJO e ZUCCHI, 2003). Além dos danos causados por estas moscas, às exigências quarentenárias impostas pelos países importadores de frutas *in natura*, onde a tolerância ao dano provocado por estes insetos é zero. Em muitos casos, por serem consideradas pragas quarentenárias, a exportação é embargada pela simples presença delas na região de produção de frutas ou até mesmo no país exportador (WALDER, 2002).

Para a maioria das fruteiras comerciais, as perdas na produção ocasionadas pelas moscas-das-frutas variam de 10 a 50% (SAMPERIO e VALENZUELA, 1992). Estima-se que nas Américas do Sul e Central elas sejam da ordem de 25%, sendo menores no início da frutificação e cerca de 80% no final do período (ENKERLIN *et al.*, 1989). Dependendo das condições climáticas e da presença de plantas hospedeiras, em algumas regiões brasileiras, essa praga pode comprometer até 100% da produção (CARVALHO, 2005). Essas perdas também estão relacionadas às restrições às exportações, às práticas quarentenárias exigidas e aos altos custos de controle ou erradicação das moscas (WHITE e ELSON-HARRIS, 1992).

No Oriente médio, as perdas provocadas pelo ataque de *C. capitata* já foram de 125,2 milhões de dólares anuais, por danos diretos e de 165,7 milhões de dólares, por danos indiretos (ENKERLIN e MUMFORD, 1997).

De acordo com Canal (1997), a introdução de moscas-das-frutas na Califórnia pode ter custado 910 milhões de dólares devido aos danos, e 290 milhões de dólares gastos no controle das moscas.

No sul do Brasil, o gasto anual com inseticidas em pomares de maçã, para o controle de moscas-das-frutas, foi estimado em 2 milhões de dólares, ou o equivalente a 100 mil litros de fentiom, o inseticida mais empregado. Este

volume foi utilizado em uma área de aproximadamente 20.000 ha, sendo aplicado de quatro a cinco vezes por ano (HICKEL, 2002).

2.2 *Ceratitis capitata*

A mosca-do-mediterrâneo, *C. capitata*, apresenta a maior distribuição territorial e mundial em relação às outras espécies de moscas-das-frutas, tendo sido descrita em 20 países, em 211 plantas cultivadas e em 102 hospedeiros silvestres (SAMPERIO e VALENZUELA, 1992). Esta espécie de mosca-das-frutas é considerada a mais prejudicial, cosmopolita e invasora dentre todos os tefritídeos, causando mais danos à agricultura do que qualquer outra espécie (MALAVASI *et al.*, 2000). Este gênero de origem subsaariana tem outras espécies, cuja distribuição está limitada ao continente africano. Ela só não é encontrada em regiões muito frias, ou onde programas ativos de detecção e erradicação impedem seu estabelecimento, como no caso do México, Chile e EUA (Califórnia e Flórida) (MALAVASI *et al.*, 2000).

A ocorrência de *C. capitata* está relacionada, preferencialmente, à sua grande capacidade de infestar plantas exóticas e introduzidas, com destaque ao café (*Coffea arabica* Linnaeus), um dos principais hospedeiros primários deste inseto (MALAVASI e MORGANTE, 1980). No Brasil, esta espécie de mosca ocorre, principalmente, em hospedeiros exóticos, infestando também frutos tropicais. Segundo Zucchi (2001), *C. capitata* ataca mais de 58 espécies de hospedeiros, dos quais 20 são nativos (frutas e hortaliças), demonstrando sua grande capacidade de adaptação. Para Azevedo Junior *et al.* (1998), esta mosca assume grande importância porque pode ocorrer durante todo o ano, devido à grande diversidade de frutíferas que ataca, apresentando o que normalmente é chamado de “sucessão de hospedeiros”, ou seja, ela passa de uma frutífera para outra, à medida que estas forem frutificando em diferentes épocas do ano.

Ceratitis capitata apresenta o ovipositor mais curto em relação a outras espécies de moscas-das-frutas, por esse motivo ataca apenas os frutos em estágio de maturação mais avançado (frutos maduros) (GALLO *et al.*, 2002). A fêmea, ao realizar a punctura e introdução do ovipositor no interior do fruto, percebe se as condições são propícias para o desenvolvimento da sua prole, sendo este fator determinante para a realização da postura (SALLES, 1995). A punctura por si só, sem a postura do ovo, já configura o dano, pois perfura a epiderme deformando o fruto.

O desenvolvimento de *C. capitata* passa por quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto. O desempenho do seu ciclo de vida está condicionado, basicamente, a dois componentes do meio em que vive, o clima e o hospedeiro (SALLES, 2000). As larvas consomem a polpa dos frutos, não exibindo um padrão de deslocamento no interior dos mesmos, embora sejam mais frequentemente encontradas na parte central da polpa (SALLES, 1995).

2.3 Controle de moscas-das-frutas

O controle das moscas-das-frutas tem sido feito, tradicionalmente, por meio de iscas tóxicas compostas de proteína hidrolisada associada a um inseticida (MALAVASI *et al.*, 1994). Embora o controle químico seja efetivo, geralmente, acarreta problemas de desequilíbrio ambiental e à saúde humana. Por esta razão, a preocupação com a qualidade ambiental e preservação da biodiversidade é crescente. Além dessa forma de controle por meio de iscas, existe ainda o uso de produtos químicos aplicados em cobertura (CARVALHO e NASCIMENTO, 2002; CARVALHO, 2006).

Medidas visando à redução das pulverizações convencionais vêm sendo adotadas pelos produtores, diante das exigências do mercado consumidor. Estas medidas são: os tratos culturais, o monitoramento dos pomares, o ensacamento

dos frutos e a preservação de inimigos naturais através da utilização de produtos químicos seletivos e/ou alternativos, tais como os botânicos (LEMOS *et al.*, 2002). Os programas de manejo integrado de pragas têm incentivado o uso destas medidas alternativas de controle de moscas-das-frutas (ALVARENGA, 2006). Dentre os agentes que se destacam no controle de insetos estão os fungos entomopatogênicos e o inseticida botânico nim (*Azadirachta indica* A. Juss.). O primeiro, por se apresentar como uma alternativa viável devido à facilidade de produção, aplicação e eficácia (MARQUES *et al.*, 2004), e o segundo, por possuir elevado poder inseticida.

2.3.1 Fungos entomopatógenos

O controle biológico utilizando entomopatógenos, principalmente fungos, tem se destacado devido à sua ocorrência em condições naturais, tanto enzoótica como epizooticamente, e têm sido aqui no Brasil e em outros países, um fator importante na redução das populações de pragas (ALVES, 1998). O uso de fungos entomopatogênicos para o controle de moscas-das-frutas vem sendo estudado, com resultados promissores, como os fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown e Smith, por apresentarem patogenicidade a moscas-das-frutas (CARNEIRO e SALLES, 1994; DIMBI *et al.*, 2004; QUESADA-MORAGA, 2008).

Com relação ao modo de ação do fungo, Alves (1998) relata que a penetração pode ocorrer pelo aparelho bucal, espiráculos, ânus, sifão respiratório e tarsos, porém as membranas intersegmentais do abdômem são a porta de entrada mais comum para os fungos em geral. Os sintomas iniciais da doença podem aparecer como manchas escuras nas pernas, regiões intersegmentais ou distribuídas por todo o tegumento. Posteriormente, o tegumento torna-se róseo (no caso de *M. anisopliae* e *B. bassiana* infectando lagartas), para depois o inseto assumir

coloração esbranquiçada devido ao crescimento do micélio. Após a morte do inseto, as hifas começam a emergir pelos espiráculos e usando pressão mecânica saem através das áreas mais fracas (região intersegmentar) e depois pela cutícula mais grossa; cobrindo toda a superfície do corpo do inseto. Associado ao crescimento micelial, ocorre, sob condições de temperatura e umidade favoráveis, a esporulação do fungo, que pode ser reconhecida por uma formação pulverulenta que recobre todo o corpo do inseto.

Fargues (1972) comenta que a ecdise, que termina com a liberação da exúvia, é um obstáculo natural à infecção por fungo. Entretanto, esta infecção está estreitamente ligada à duração do intervalo entre as ecdises, já que a liberação da exúvia contaminada não evita a doença se o fungo já estiver penetrado no hospedeiro.

Beauveria bassiana infecta naturalmente larvas, pupas e adultos de *Leptinotarsa decemlineata* (Say) e a infecção ocorre após a germinação dos esporos na cutícula ou no intestino do hospedeiro. As larvas de ínstares mais avançados são menos suscetíveis ao fungo, e as dos primeiros ínstares suprimem ou superam a infecção por meio da liberação do tegumento infectado (ecdise), antes que as hifas alcancem o hemocele (FARGUES, 1972; FARGUES e VEY 1974; VEY e FARGUES 1977). Fargues (1972) observou maior mortalidade larval de *L. decemlineata* tratadas com conídios de *B. bassiana* três dias antes de sua próxima ecdise.

Garcia *et al.* (1985) demonstraram a patogenicidade do isolado E9 do fungo *M. anisopliae*, concentração de $12,8 \times 10^5$ conídios/mL, a adultos de *C. capitata*. Eles verificaram que aos 3, 6 e 12 dias após a aplicação as mortalidades dos adultos foram de 30, 60 e 85%, respectivamente. Garcia *et al.* (1989) avaliaram este mesmo isolado para larvas ($7,8 \times 10^6$ e $8,3 \times 10^6$ conídios/mL) e pupas de *C. capitata* (28×10^6 conídios/mL). Os autores verificaram que o isolado foi mais efetivo na fase adulta, quando os conídios

foram pulverizados sobre as larvas, reduzindo a emergência destes em 29%. A aplicação na fase de pupa reduziu em 20% a emergência de adultos.

Carneiro e Salles (1994) verificaram que o isolado CG 260 de *P. fumosoroseus* causou 100% de mortalidade de pupas de *A. fraterculus*. Este efeito foi observado quando os conídios foram aplicados nas larvas de 3º ínstar, sendo o valor da CL50 deste isolado a pupas de $1,2 \times 10^6$ conídios/mL.

Luz (1995) avaliou a patogenicidade de *M. anisopliae* a *A. ludens*. Ele observou mortalidades de larvas que variaram de 37,0 a 98,8%, na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL e CL50 de $3,7 \times 10^5$ a $4,8 \times 10^5$ conídios/mL.

Castilho *et al.* (2000) avaliaram a patogenicidade de várias espécies de fungos sobre *C. capitata*. Verificaram que *M. anisopliae* foi um dos fungos mais patogênicos a esta mosca (DL50 de $5,1 \times 10^3$ e $6,1 \times 10^3$ conídios/mosca). *Metarhizium anisopliae* também reduziu a fecundidade das fêmeas de 40 a 50%, na maioria das concentrações avaliadas, tendo sido a fertilidade moderadamente afetada, mas reduzida em 50%.

Lezama-Gutierrez *et al.* (2000) observaram que a aplicação da suspensão de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL, de diferentes isolados de *M. anisopliae*, aplicados sobre larvas de 3º ínstar de *A. ludens* ocasionou até 98,7% mortalidade.

Alves *et al.* (2004) avaliaram a eficácia dos fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *P. fumosoroseus* e *Verticillium* sp. aplicados na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL sobre pré-pupas, pupas e adultos de *C. capitata*. Os autores verificaram que os isolados E9 e ESALQ 1037 de *M. anisopliae* foram os mais eficientes no controle de pupas, chegando até 90%. Para adultos, todos os isolados apresentaram eficiência máxima de 60%. Em casa de vegetação, a mortalidade das pré-pupas foi de até 27%, quando os conídios dos isolados foram aplicados ao solo.

Destéfano *et al.* (2005) pesquisaram a eficiência de controle do isolado E9 de *M. anisopliae* sobre larvas, pré-pupas, pupas e adultos de *A. fraterculus*,

nas concentrações de $2,5 \times 10^8$, $2,5 \times 10^9$ e $2,5 \times 10^{10}$ conídios/mL, aplicado em solos autoclavados e não autoclavados. Constataram uma redução de 86% na população final quando testaram as concentrações mais elevadas de conídios, tanto para solo autoclavado ($2,5 \times 10^9$ conídios/mL e CL_{50} de $8,4 \times 10^9$ conídios/g de solo) quanto para não autoclavado ($2,5 \times 10^{10}$ conídios/mL e $12,2 \times 10^9$ conídios/g de solo).

Mochi *et al.* (2006) avaliaram a patogenicidade de *M. anisopliae* a *C. capitata*, aplicando diferentes fungicidas ao solo associado a diferentes formas de aplicação de conídios do fungo. Verificaram que o fungo afetou a sobrevivência deste inseto, restando apenas 6,5% da população avaliada. Observaram ainda que, nas fases de pupa e adulto, as sobrevivências foram de 22,3 e 17,8%, respectivamente, e que o fungo não afetou a fase larval. Constataram que os fungicidas afetaram pouco o fungo *M. anisopliae*, mas que os produtos clorotalonil e tebuconazole reduziram a sobrevivência de *C. capitata* em 86,2 e 82,5%, respectivamente. Os conídios sem a presença dos fungicidas reduziram a sobrevivência em 95%. Os autores concluíram que a forma de aplicação dos conídios não influenciou a sobrevivência total do inseto, mas a aplicação da suspensão de conídios na superfície do solo reduziu a sobrevivência nas fases de pupa e adulto.

Almeida *et al.* (2007) estudaram a virulência de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre pré-pupas de *C. capitata*, concentração de $5,0 \times 10^8$ conídios/mL, em casa-de-vegetação. Verificaram que os isolados IBCB 425 de *M. anisopliae* e IBCB 66 de *B. bassiana* foram os mais virulentos, apresentando eficiência de controle de 66,6%.

Quesada-Moraga (2008) observou 95% a 100% de mortalidade de adultos de *C. capitata*, em condições de laboratório, quando pulverizaram suspensão de conídios do isolado EA Ma 01/58-Su de *M. anisopliae* (concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL).

Outras moscas também são afetadas pela aplicação de fungo entomopatogênicos. Zimmer *et al.* (2007) avaliaram a patogenicidade do isolado CG 34 de *M. anisopliae*, concentrações de $1,0 \times 10^5$, $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^8$ conídios/mL, sobre *Musca domestica* Linnaeus. Relataram que houve aumento de um dia na duração pupal, na maior concentração avaliada, em relação à testemunha. Os autores também relataram aumento nas deformações de adultos, à medida que as concentrações de conídios do fungo aumentaram, ocorrendo na maior concentração 16% de adultos deformados.

2.3.2 Controle com inseticida botânico

Azadirachta indica, planta da família Meliaceae, é considerada, atualmente, no mundo todo, como a planta inseticida mais importante. A atividade de seus ingredientes ativos já foi referida para mais de 400 espécies de insetos, das quais mais de 100 ocorrem no Brasil (BREUER e DEVKOTA, 1990; CIOCIOLA JUNIOR e MARTINEZ, 2002; DA CRUZ, 2000; MA *et al.*, 2000; MAREDIA *et al.*, 1992; MARTINEZ, 2002; PENTEADO, 1999). Esta poderia ser uma medida alternativa para equacionar os problemas de resíduos de inseticida e ao mesmo tempo reduzir a população de moscas-das-frutas a um nível aceitável. O nim poderia ser adicionado à isca tóxica ao invés do agroquímico.

Azadirachta indica apresenta bioatividade aos insetos-praga, principalmente pela presença do composto azadiractina, que é um limonoide tetranortriterpenoide encontrado em maior quantidade nas sementes de nim, e é o principal componente responsável pelos efeitos de deterrência alimentar e toxicidade a insetos (MORDUE (LUNTZ) e NISBET, 2000; SCHMUTTERER, 1990; SIMMONDS *et al.*, 1990). Existem, entretanto, outros compostos presentes no extrato ou no óleo de nim que também tem mostrado efeito

antialimentar, de alongamento no desenvolvimento dos insetos, redução na fecundidade e fertilidade, e mudanças no comportamento dos insetos (AERTS e MORDUE (LUNTZ), 1997; ALOUANI *et al.*, 2009; BANCHIO *et al.*, 2003; GAJMER *et al.*, 2002; MARTINEZ, 2008; MARTINEZ E EMDEN, 2001; SCHMIDT *et al.*, 1998; WANDSCHEER *et al.*, 2004). Assim, os efeitos observados após a aplicação de extratos ou óleo de nim podem ser resultado da soma ou sinergismo da azadiractina com estes outros terpenoides presentes na mistura.

Garcia (2000) afirma que a azadiractina atua como reguladora do crescimento do inseto, através da sua inibição, interferindo na ecdise, por meio da supressão do hormônio da muda, o ecdisônio. Desta forma, a larva não consegue efetuar a mudança de fase, ficando jovem até que eventualmente morra. Alguns autores constataram uma ação traslaminar do óleo de nim em folhas, causando efeitos adversos sobre *Myzus persicae* Sulzer, *Brevicoryne brassicae* L. e *Tuta absoluta* Meyrick (GONÇALVES-GERVÁSIO e VENDRAMIM, 2004; VERKERK *et al.*, 1998; VIANA e PRATES, 2003 e 2005).

A planta de nim tem demonstrado ser bioativa à mosca-das-frutas, *C. capitata*. Stark *et al.* (1990) avaliaram os efeitos da azadiractina na metamorfose, longevidade e reprodução de *C. capitata*, *Dacus dorsalis* Hendel e *D. curcubita* Coquillet. Os autores observaram que ao se exporem as larvas de 3º ínstar e as pupas das moscas à azadiractina na dose de 14 ppm esta inibiu as emergências dos adultos de *C. capitata* e *D. dorsalis*. Para *D. curcubita* a dose de 10 ppm resultou no mesmo efeito. Quanto aos adultos, os autores verificaram que 10 dias após a emergência, 75% de *D. dorsalis* e 64% de *C. capitata* morreram, quando as moscas foram expostas a 4,7 ppm de azadiractina, nas fases larval e pupal. Já para *D. curcubita*, a exposição a 2,8 ppm causou 24% de mortalidade das moscas adultas, 10 dias após a emergência.

Di Ilio *et al.* (1999) observaram redução significativa no número de ovos depositados pelas fêmeas de *C. capitata*. O produto Azatin – composto por 3% de azadiractina-A, quando utilizado em maiores concentrações, provocou esterilidade das fêmeas e redução na longevidade.

Vinuela *et al.* (2000) verificaram que a ingestão de um produto à base de nim (3,2% de azadiractina), mais especificamente da azadiractina, por larvas recém-eclodidas de *C. capitata* foi altamente tóxica, impedindo a emergência de adultos (concentração de 1,0 mg/i.a/L). Adultos alimentados com esse produto sobreviveram, mas sua postura foi totalmente inibida.

Nakano (2001), estudando a ação esterilizante do nim, concluiu que a azadiractina, na forma comercial Nim 4000 EC, na dosagem de 30 ppm pode ser empregada no controle de *C. capitata*, causando efeito de esterilidade com até 100% de eficiência.

Habibe *et al.* (2003) constataram que o óleo de nim aplicado em mamão causou mortalidade de adultos de *C. capitata*, caracterizando um efeito tóxico. Nakano e Romano (2002) relataram eficiência de 100% na esterilização dos adultos de *C. capitata* quando utilizaram 30 mg/L de azadiractina.

Silva *et al.* (2003) estudaram o efeito do óleo de nim como componente de isca tóxica para *C. capitata*, em condições de laboratório, nas concentrações de 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,30; 0,50 e 0,70%. Registraram mortalidades significativas nas diferentes concentrações e constataram efeito repelente quando estas foram superiores a 0,10%.

A planta de nim tem demonstrado ser bioativo a outras espécies de moscas-das-frutas. Salles e Rech (1999) verificaram que os extratos dos frutos de nim e cinamomo (*Melia azedarach* L.) apresentaram ação inseticida sobre *A. fraterculus*, reduzindo a postura e o desenvolvimento larval e pupal deste inseto.

2.4 Interação dos métodos

A relação tritrófica deve ser levada em consideração no controle microbiano aplicado. Existe comprovada influência da planta hospedeira sobre o inseto-praga infectado por fungo em campos. Em alguns casos esta pode não ser a estratégia mais indicada para o controle da praga, pois as plantas podem produzir um inibidor do desenvolvimento do fungo e acidentalmente proteger o inseto criado sobre ela (RAMOSKA e TODD, 1985).

A ação dos produtos fitossanitários sobre os entomopatógenos pode variar em função da espécie e linhagem do patógeno, da natureza química dos produtos e das concentrações utilizadas. Alguns produtos podem atuar inibindo o crescimento vegetativo, a esporulação dos microrganismos, e até causar mutações genéticas, podendo levar a uma diminuição na virulência à determinada praga (ALVES, 1998).

Ramoska e Todd (1985) observaram que os componentes bióticos e abióticos do meio influenciaram a epizootia de fungos, sendo necessário um minucioso estudo ecológico da dinâmica populacional dos insetos para viabilizar o controle de pragas. Alves (1998) postula que os fatores abióticos como temperatura, radiação, umidade e chuva podem afetar a patogenicidade do fungo. Alves *et al.* (1990) complementaram afirmando que os fatores bióticos como idade do inseto, via de infecção, estágio de desenvolvimento (metamorfose, muda e diapausa), associação com outros microrganismos e tipo de alimento também podem afetar a virulência do patógeno.

Com relação ao tipo de alimento ingerido pelos insetos, as variações nas espécies de plantas podem modificar a suscetibilidade dos insetos ao fungo, pois estes apresentam complexa relação com seus hospedeiros, sendo que, variações na planta hospedeira podem alterar a relação inseto-inimigo natural (ALVES *et al.*, 1990; HARE e ANDREADIS, 1983).

Vey e Fargues (1977) observaram que, para *L. decemlineata*, o tipo de alimento pode interferir na capacidade deste inseto reagir defensivamente e superar a infecção provocada por *B. bassiana*. Costa e Gaugler (1989a), trabalhando com larvas deste mesmo inseto tratadas topicamente com conídios de *B. bassiana* e criadas com folhas de *Solanum* spp., observaram que, mesmo ocorrendo grande variação na concentração dos glicoalcaloides (solanina e chaconina) nas folhas desta planta, estes não afetaram a suscetibilidade das larvas à infecção pelo fungo. Os autores concluíram que, devido ao modo de aplicação dos conídios, topicamente, ou seja, sem contato com os glicoalcaloides da planta, o inseto protege o fungo dos efeitos dos alcaloides.

Ramoska e Todd (1985) pesquisaram adultos de *Blissus leucopterus leucopterus* (Say) inoculados com conídios de *B. bassiana* e alimentados com várias plantas hospedeiras, dieta artificial líquida ou água. Constataram que os percevejos alimentados com sorgo e milho foram resistentes a *B. bassiana*. A base para essa conclusão foi a não formação de conídios, em insetos mortos coletados em milho e sorgo.

Alves *et al.* (1990) estudaram o efeito da alimentação de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) submetidas à pulverização com conídios de *B. bassiana*. Observaram que os insetos provenientes de dieta de milho apresentaram maior tolerância ao patógeno. Os autores relataram ainda que a menor suscetibilidade de *D. saccharalis* provenientes do campo aos patógenos pode ser explicada pela sua maior variabilidade genética, em relação aos insetos criados em laboratório e também pela presença de maior quantidade de microrganismos competidores sobre o tegumento.

Os aleloquímicos e as substâncias produzidas pelas espécies vegetais, que podem ser utilizados como inseticida botânico, também apresentam efeito sobre a patogenicidade dos patógenos aos insetos. Costa e Gaugler (1989b), estudando os efeitos dos alcaloides solanina e tomatina e do antibiótico nistatina sobre *B.*

bassiana, observaram que a nistatina reduziu a formação, o crescimento e o desenvolvimento das colônias em concentrações menores do que aquelas utilizadas para os alcaloides. A tomatina inibiu a formação e o desenvolvimento das colônias mais que a solanina, que teve pouco efeito sobre o fungo. A toxicidade da tomatina sugere que a germinação dos conídios e o subsequente desenvolvimento das hifas podem ser inibidos quando um inseto consome conídios juntamente com folhas contendo 0,10 mg/g de peso fresco deste composto.

Aguda *et al.* (1986) verificaram, em laboratório, efeitos negativos do óleo de nim sobre a esporulação de conídios de *M. anisopliae*, em concentrações de 5% ou maiores. Entretanto, eles enfatizaram que as concentrações que afetaram a esporulação do fungo, em laboratório, é superior às concentrações utilizadas em casa de vegetação e no campo, as quais variam de 0,5 a 2%.

Hirose *et al.* (2001) avaliaram o efeito do óleo de nim (2,0%) sobre *B. bassiana* e *M. anisopliae* a partir da medição do diâmetro das colônias, da inibição da esporulação e da porcentagem de germinação dos conídios, para ambos os isolados avaliados. Verificaram que o isolado CG 252 de *B. bassiana* foi comparativamente mais afetado que o isolado CB 38 de *M. anisopliae*.

Marques *et al.* (2004) observaram que o óleo de nim contendo 1.200 ppm de azadiractina utilizado nas concentrações de 0,0097% a 5% reduziu o crescimento e a esporulação de colônias de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Paecilomyces farinosus* (Wise) Brown e Smith. Constataram ainda que *M. anisopliae* foi o menos sensível à ação do óleo de nim.

Depieri *et al.* (2005) avaliaram diferentes concentrações de uma formulação comercial de óleo emulsionável de nim, de extrato aquoso de sementes de nim e de extrato aquoso de folhas de nim sobre *B. bassiana*. Verificaram que os extratos de sementes e de folhas se mostraram menos prejudiciais a *B. bassiana* do que o óleo emulsionável. Concluíram que esse produto, nas concentrações testadas, não foi compatível com *B. bassiana*,

inibindo, significativamente, o crescimento vegetativo e reduzindo a produção e a viabilidade dos conídios com efeitos mais acentuados nas concentrações mais altas.

Morais *et al.* (2009) estudaram o efeito do óleo de nim, incorporado ao meio BDA (Batata-dextrose-ágar), nas concentrações de 1, 10, 100, 1.000, 10.000 e 100.000 µL/L, antes e após a autoclavagem, sobre o crescimento micelial de *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *Trichoderma harzianum* Rifai e *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann) Zare e Gams. Observaram que o crescimento micelial das colônias dos fungos não foi afetado pelo óleo de nim independente do meio utilizado. Observaram inclusive que as 10.000 µL/L e 100.000 µL/L provocaram um estímulo no crescimento micelial destes agentes de controle.

Rosales (2001) verificou que a associação de *B. bassiana*, isolado 634 e de *M. anisopliae* isolado ESALQ 1037 (concentrações de $1,0 \times 10^7$ e $5,0 \times 10^8$ conídios/mL) com o produto Nimkol-L (concentrações de 0,2 a 0,4% i.a), derivado vegetal de uma meliácea, aplicado no mínimo 24 horas antes da suspensão de conídios, causaram até 100% de mortalidade do cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* (Hagen). Constatou que a associação destes agentes de controle foi mais eficiente do que a ação isolada de ambos.

Shah *et al.* (2008) observaram aumento na eficácia do isolado V 275 de *M. anisopliae* (concentração de $1,0 \times 10^8$ e $1,0 \times 10^{10}$ conídios/L de substrato) em 100 vezes a dose mais baixa ($1,0 \times 10^8$ conídios/L de substrato), quando combinado à torta de sementes de nim (concentrações de 0,5, 2,5 e 5,0 g/L de substrato), sobre o gorgulho da videira, *Otiorhynchus sulcatus* Fabricius.

Islam *et al.* (2009) verificaram que a associação da concentração de 0,5% de óleo de nim com a concentração de 10^7 conídios/mL do fungo *B. bassiana* provocou um acréscimo na mortalidade de ovos e ninfas de *Bemisia*

tabaci (Gennadius) de 27 e 20%, respectivamente, que foi maior do que o constatado para os dois métodos utilizados separadamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, R. J.; MORDUE (LUNTZ), A. J. Feeding deterrence and toxicity of neem triterpenoids. **Journal Chemical Ecology**, New York, v. 23, p. 2117-2133, 1997.

AGUDA, R. M.; ROMBACH, M. C.; SHEPARD, B. M. Effect of nim oil on germination and sporulation of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. **International Rice Research Newsletter**, Manila, v. 11, p. 34-35, 1986.

ALMEIDA, J. E. M. *et al.* Patogenicidade de fungos e nematóide entomopatogênicos em mosca-do-mediterrâneo *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). **BioAssay**, Piracicaba, v. 2, n. 7, p.1-7, 2007.

ALOUANI, A.; REHIMI, N.; SOLTANI, N. Larvicidal activity of a neem tree extract (Azadirachtin) against mosquito larvae in the Republic of Algeria. **Jordan Journal of Biological Sciences**, Zarqa, v. 2, n. 1, p. 15-22, 2009.

ALVARENGA, C. D.; GIUSTOLIN, T. A.; QUERINO, R. B. Alternativas no controle de moscas-das-frutas. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; PALLINI, A. (Coord.). **Tecnologias alternativas para o controle de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG, 2006. p. 227-252.

ALVES, S. B.; BOTELHO, P. S. M.; SALOMÃO, R. Influência de diferentes tipos de alimento na suscetibilidade de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) aos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 383-391, 1990.

_____. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-381.

_____.; *et al.* Avaliação de fungos entomopatogênicos para *Ceratitis capitata*. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia**, Turrialba, v. 72, n. 72, p. 31-38, 2004.

ARAÚJO, E. L de; ZUCCHI, R. A. Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em goiaba (*Psidium guajava* L.), em Mossoró-RN. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 73-77, 2003.

ARAÚJO JUNIOR, J. M. **Seleção de fungos entomopatogênicos associados ao óleo de nim para o controle do pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) em couve**. 2008. 67 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2008.

AZEVEDO JUNIOR, G. H. *et al.* Levantamento de moscas-das-frutas (Diptera, *Tephritidae*) na cultura da manga, no município de Mossoró-RN. **Caatinga**, Mossoró, v. 11, p. 85-90, 1998.

BANCHIO, E. *et al.* Effects of *Melia azedarach* (Meliaceae) fruit extracts on the leafminer *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae): assessment in laboratory and field experiments. **Annual Applied Biology**, v. 143, p. 187-193, 2003.

BITTENCOURT, M. A. L *et al.* Espécies de moscas-das-frutas (Tephritidae) obtidas em armadilhas McPhail no Estado da Bahia, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 561-564, 2006.

BREUER, M.; DEVKOTA, B. Control of *Thaumetopea pityocampa* (Den. & Schiff.) by extracts of *Melia azedarach* L. (Meliaceae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 65, p. 385-386, 1990.

CANAL, N. A. **Levantamento, flutuação populacional e análise faunística das espécies de moscas-das-frutas (Diptera, Tephritidae) em quatro municípios do norte do Estado de Minas Gerais**. 1997. 113 f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

CARNEIRO, R. M. D. G.; SALLES, L. A. B. Patogenicidade de *Paecilomyces fumosoroseus*, isolado CG 260 sobre larvas e pupa de *Anastrepha fraterculus* Wied. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 341-343, 1994.

CARVALHO, R. S.; NASCIMENTO, A. S. Criação e utilização de *Diachasmimorpha longicaudata* para controle biológico de moscas-das-frutas. In: PARRA, J. R. P. *et al.* (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 165-177.

_____. **Metodologia para monitoramento populacional de moscas-das-frutas em pomares comerciais**. Cruz das Almas: EMBRAPA/CNPMPF, 2005. 17 p. Circular Técnica, 75.

_____. **Biocontrole de moscas-das-frutas: histórico, conceitos e estratégias**. Cruz das Almas: EMBRAPA/CNPMPF, 2006. 5 p. Circular Técnica, 83.

CASTILHO, M. A. *et al.* Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extract. **Biological Control**, Orlando, v. 19, p. 274-282, 2000.

CIOCIOLA JÚNIOR, A. I.; MARTINEZ, S. S. **Nim: alternativa no controle de pragas e doenças**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 24 p. Boletim técnico, 67.

COSTA, S. D.; GAUGLER, R. Influence of *Solanum* host plants on colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) susceptibility to the entomopathogen *Beauveria bassiana*. **Environmental Entomology**, College Park, v. 18, n. 3, p. 531-536, 1989 a.

_____. Sensitivity of *Beauveria bassiana* to solanine and tomatine: plant defensive chemicals inhibit an insect pathogen. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 15, p. 697-707, 1989 b.

DA CRUZ, I. B. M. *et al.* Morfologia do aparelho reprodutor e biologia do desenvolvimento. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 55-66.

DEPIERI, R. A.; MARTINEZ, S. S.; MENEZES JÚNIOR, A. O. Compatibility of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) with extracts of neem seeds and leaves and the emulsible oil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 601-606, 2005.

DESTÉFANO, R. H. R. *et al.* Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* against immature stages of *Anastrepha fraterculus* fruitfly (Diptera: Tephritidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 94-99, 2005.

DI ILIO, V. *et al.* Effects of a neem compound on the fecundity and longevity of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, n. 1, p. 76-82, 1999.

DIMBI, S. *et al.* Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 49, p. 83-94, 2004.

ENKERLIN, D.; GARCIA, L. R.; LOPEZ, F. M. Fruit flies from Mexico, Central and South America. In: ROBINSON, A. S.; HOOPER, G. (Eds.). **World crop pests: fruit flies, their biology, natural enemies and control**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 83-90.

ENKERLIN, W.; MUMFORD, J. Economic evaluation at three alternative methods for control of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Israel, Palestinian Territories, Jordan. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 90, p. 1066-1072, 1997.

FARGUES, J. Étude des conditions d'infection des larves de doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* Say, par *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. [Fungi Imperfecti]. **Entomophaga**, Paris, v. 17, n. 3, p. 319- 337, 1972.

_____.; VEY A. Modalités d'infection des larves de *Leptinotarsa decemlineata* par *Beauveria bassiana* au cours de la mue. **Entomophaga**, Paris, v. 19, n. 3, p. 311-323, 1974.

GAJMER, T. *et al.* Effect of methanolic extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and bakain (*Melia azedarach* L.) seeds on oviposition and egg hatching of *Earias vittella* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 126, p. 238-243, 2002.

GALLO, D. *et al.* **Entomologia agrícola**. Piracicaba: Fealq, 2002. 920 p.

GARCIA, A. S. *et al.* Virulência de linhagens mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* em *Ceratitis capitata* (Díptera: Tephritidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 267-270, 1985.

_____.; *et al.* Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* nas diferentes fases de desenvolvimento de *Ceratitis capitata* (Wied) (Diptera; Tephritidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 33, p. 17-23, 1989.

GARCIA, J. L. M. **O nim indiano**: o bioprotetor natural. Série Agricultura Alternativa, 2000. 8 p. Apostila.

GONÇALVES-GERVÁSIO, R. de C. R.; VENDRAMIM, J. D. Modo de ação de extratos de meliáceas sobre *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 215-220, 2004.

HABIBE, T. C. *et al.* Efeito do óleo de nim, *Azadirachta indica* sobre *Ceratitis capitata* (Diptera:Tephritidae) em mamão (*Carica papaya* L.). **Papaya Brasil**: qualidade do mamão para o mercado interno. Vitória: Incaper, 2003. p. 1-4.

HARE, J. D.; ANDREADIS, T. G. Variation in susceptibility of *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) when reared on different host plants to the fungal pathogen, *Beauveria bassiana* in the field and laboratory. **Environmental Entomology**, College Park, v. 12, n. 6, p. 1892-1897, 1983.

HICKEL, E. R. Espessura da polpa como condicionante do parasitismo de mosca-das-frutas (Diptera: Tephritidae) por Hymenoptera: Braconidae. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 1005-1009, 2002.

HIROSE, E. *et al.* Effect of Biofertilizers and Neem Oil on the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 44, n. 4, p. 419-423, 2001.

ISLAM, M. T.; CASTLE, S. J.; REN, S. Compatibility of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* with neem against sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*, on eggplant. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 134, n. 1, p. 28-34, 2009.

LEMOS, R. N. S. *et al.* Eficiência de substâncias atrativas na captura de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em goiabeiras no município de Itapecuru-Mirim (MA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 24, n. 3, p. 687-689, 2002.

LEZAMA-GUTIERREZ, R. *et al.* Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae): Laboratory and Field Trials. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n. 4, p. 1080-108, 2000.

LUZ, A. T. **Virulência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin como agente de control biológico de *Anastrepha ludens* (Loew)**. 1995. 83 p. (Dissertação de Mestrado em Ciências)-Universidade de Colima, Tacuma, México, 1995.

MA, D. L.; GORDH, G.; ZALUCKI, M. P. Survival and development of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaves. **Australian Journal of Entomology**, v. 39, p. 208-211, 2000.

MALAVASI, A.; MORGANTE, J. S. Biologia de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae). II: índice de infestação em diferentes hospedeiros e localidades. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, p. 17-24, 1980.

_____. ; NASCIMENTO, A. S.; CARVALHO, R. S. Moscas-das-frutas no MIP-Citros. In: DONADIO, L. C.; GRAVENA, S. (Coords.). **Manejo integrado de pragas dos citros**. Campinas: Fundação Cargill, 1994. p. 211-231.

_____. ; ZUCCHI, A. R.; SUGAYAMA, R. L. Biogeografia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 93-98.

MAREDDIA, K. M.; SEGURA, O. L.; MIHM, J. A. Effects of neem, *Azadirachta indica* on six species of maize insect pests. **Tropical Pest Management**, Basingstoke, v. 38, p. 190-195, 1992.

MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações de óleo de Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1675-1680, 2004.

MARTINEZ, S. S.; EMDEN, H. F. V. Growth Disruption, Abnormalities and Mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by Azadirachtin. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 113-125, 2001.

_____. (Ed.). **O nim: *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: IAPAR, 2002. 142 p.

_____. **O nim: *Azadirachta indica*: um inseticida natural.** Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, IAPAR. 2008. Disponível em: <<http://iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=410>>. Acesso em: 10 ago. 2009.

MOCHI, D. A *et al.* Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in Soil with Different Pesticides. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 3, p. 382-389, 2006.

MORDUE (LUNTZ), A. J.; NISBET, A. J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachata indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, p. 615-632, 2000.

MORAIS, L. A. S. *et al.* Efeito de diferentes concentrações do óleo de nim (*Azadirachta indica*) no crescimento micelial de fungos entomopatogênicos e *Trichoderma harzianum*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 113-117, 2009.

NAKANO, O. Ensaio visando o controle de mosca-das-frutas (*Ceratitis capitata*) com inseticidas na forma de isca visando o efeito esterilizante. In: VENDRAMIM, J. D.; BOGORNI, P. C.; ABREU JUNIOR, H. (Orgs.). **Nim o protetor natural múltiplo**. Piracicaba, SP: ESALQ/USP, 2001. Apostila.

NASCIMENTO, A. S.; CARVALHO, A. S. Manejo integrado de moscas-das-frutas. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 169-173.

NAVA, D. E. *et al.* Controle biológico de pragas de frutíferas. In: Pinto, A. de S. *et al.* (Org.). **Controle biológico de pragas: na prática**. Piracicaba: Universo Agrícola, 2006. p. 113-129.

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

PENTEADO, S.R. **Defensivos alternativos e naturais para uma agricultura saudável**. Campinas: Cati, 1999, 79 p.

QUESADA-MORAGA, E; MARTIN-CARBALLO, I.; GARRIDO-JURADO, I.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**, Orlando, v. 47, p. 115-124, 2008.

RAMOSKA, W. A.; TODD, T. Variation in efficacy and viability of *Beauveria bassiana* in the chinch bug (Hemiptera: Lygaeidae) as a result of feeding activity on selected host plants. **Environmental Entomology**, College Park, v. 14, n. 2, p. 146-148, 1985.

ROSALES, E. A. C. **Efeito de derivados de meliáceas e fungos entomopatogênicos sobre o cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858) (Isoptera: Rhinotermitidae)**. 2001. 133 p. Tese (Doutorado em Entomologia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 2001.

SALLES, L. A. B. **Bioecologia e controle da mosca-das-frutas sul-americana**. São Paulo: CNPFT-Embrapa, 1995. 58 p.

SALLES, L. A.; RECH, N.L. Efeito de Extratos de Nim (*Azadiractha indica*) e Cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Anastrepha fraterculus* (Wied.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 5, n. 3, p. 225-227, 1999.

_____. **Biologia e ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus* (Wied.)**. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p.81-86.

SAMPERIO, J. G.; VALENZUELA, G. P. Importância de la família Tephritidae en la fruticultura. In: CURSO INTERNACIONAL SOBRE MOSCA DE LA FRUTA, 6., 1992, Chiapas, México. **Resumos...** Metapa de Dominguez: Programa MOSCAMED, Chiapas, 1992.

SCHMIDT, G. H. *et al.* Effect of *Melia azedarach* fruit extract on juvenile hormone titer and protein content in the hemolymph of two species of noctuid lepidopteran larvae (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 26, p. 283-291, 1998.

SCHMUTTERER, H. Potential of azadirachtin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 35, p. 271-297, 1990.

SHAH, F. A. *et al.* Neem seed cake enhances the efficacy of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Control**, Orlando, v. 44, p. 111-115, 2008.

SILVA, V. E. S.; NASCIMENTO, A. S.; SANTOS NETO, C. Efeito do óleo de nim *Azadirachta indica* na mortalidade e repelência de *Ceratitidis capitata* (Tephritidae). In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., 2003, São Pedro, SP. **Anais...** São Pedro: Sociedade Entomológica do Brasil, 2003. p. 171.

SIMMONDS, M. S. J. *et al.* Azadirachtin: structural requirements for reducing growth and increasing mortality in lepidopterous larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 55, p. 169-181, 1990.

STARK, J. D.; VARGAS, R. I.; THALMAN, R. K. Azadirachtin: Effects on metamorphosis, longevity, and reproduction of three tephritid fruit fly species (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 83, n. 6, p. 2168-2174, 1990.

VERKERK, R. H. J. *et al.* Aphids on cabbage: tritrophic and selective insecticide interactions. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 88, p. 343-349, 1998.

VEY, A.; FARGUES, J. Historical and ultrastructural studies of *Beauveria bassiana* infection in *Leptinotarsa decemlineata* larvae during ecdysis. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 30, p. 207-215, 1977.

VIANA, P. A.; PRATES, H. T. Desenvolvimento e mortalidade larval de *Spodoptera frugiperda* em folhas de milho tratadas com extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica*. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 1, p. 69-74, 2003.

VIANA, P. A.; PRATES, H. T. Mortalidade de lagarta de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas com extrato aquoso de folhas de nim *Azadirachta indica*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 4, n. 3, p. 316-322, 2005.

VINUELA, E. *et al.* Laboratory Effects of Ingestion of Azadirachtin by Two Pests (*Ceratitidis capitata* and *Spodoptera exigua*) and Three Natural Enemies (*Chrysoperla carnea*, *Opius concolor* and *Podisus maculiventris*). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 165-177, 2000.

WALDER, J. M. M. Produção de moscas-das-frutas e seus inimigos naturais: Associação de moscas estéreis e controle biológico. In: PARRA, J. R. P. *et al.* (Eds.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p.181-190.

WANDSCHEER, C. B. *et al.* Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. **Toxicon**, Elmsford, v. 44, p. 829-835, 2004.

WHITE, I. M.; ELSON-HARRIS, M. M. **Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics**. Wallingford: CAB International, 1992. 601 p.

ZIMMER, C. R. *et al.* Patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 16., 2007, Pelotas, RS. **Anais...** Pelotas: Faculdade de Agronomia de Eliseu Maciel, 2007.

ZUCCHI, R. A. Taxonomia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, p. 13-24, 2000.

_____. Mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). In: VILELA, E. F.; ZUCCHI, R. A.; CANTOR, F. (Eds.). **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 15-22.

CAPITULO I - PATOGENICIDADE E AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin SOBRE *Ceratitis capitata* Wied. (DIPTERA: TEPHRITIDAE).

RESUMO

¹SOUZA, Hugo Ribeiro de. **Patogenicidade e agressividade de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre *Ceratitis capitata* (Wied.)**. 2010. Cap. 1. p. 36-58. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de 10 isolados do fungo *Metarhizium anisopliae*, em condições de laboratório, sobre a biologia de *Ceratitis capitata*. Larvas de 3º ínstar foram imersas em suspensões de conídios dos isolados de *M. anisopliae*. Após o tratamento, as larvas foram transferidas para copos descartáveis contendo vermiculita umedecida, visando à pupação e à emergência de adultos. Casais de adultos emergidos foram formados e os ovos avaliados quanto a viabilidade e longevidade de adultos. Os isolados foram pouco virulentos a larvas, provocando no máximo 17% de mortalidade. O patógeno causou elevada mortalidade pupal, que chegou até 87% para alguns dos isolados. A duração da fase pupal foi alongada e as pupas apresentaram anormalidades em seus pupários, que foram no máximo de 11%. Adultos da mosca também apresentaram deformação, que foi no máximo de 9%. A viabilidade e a longevidade dos adultos foram reduzidas pela aplicação dos conídios. Os isolados de *M. anisopliae* se mostraram promissores para serem utilizados no controle de *C. capitata*, principalmente o ESALQ 1037, não apenas por causar mortalidade, mas por afetar todas as fases de desenvolvimento deste inseto.

¹ Comitê Orientador: Prof^ª. Teresinha Augusta Giustolin – DCA/UNIMONTES (orientador); Prof^ª. Adelica Aparecida Xavier – DCA/UNIMONTES (Co-orientador).

ABSTRACT

SOUZA, Hugo Ribeiro de. **Pathogenicity and aggressiveness of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin on *Ceratitis capitata* Wied. (DIPTERA: TEPHRITIDAE)**. 2010. Chapter 1. p.33-55. Dissertation (Master's degree in Plant Production in the Semi-arid) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.¹

The purpose of this study was to evaluate the effect of 10 isolates of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions, on the biology of *Ceratitis capitata*. Third-instar larvae were immersed in conidial suspensions of *M. anisopliae* isolates. After treatment, the larvae were transferred to plastic drinking-glasses containing wet vermiculite, aiming at pupation and adult emergence. Couple of emerged adults were formed and the eggs assessed for adults viability and longevity. The isolates were slightly virulent to the larvae, causing no more than 17% mortality. The pathogen caused high pupal mortality, which reached 87% for some isolates. The pupal phase was lengthened and pupae showed abnormalities in their puparia, which were a maximum of 11%. Adult flies also showed deformation, which was a maximum of 9%. The viability and longevity of adults were reduced by application of conidia. The *M. anisopliae* isolates showed to be promising for use in *C. capitata* control, especially ESALQ 1037, not only to cause mortality, but also affecting all stages of development of this insect.

¹ Guidance Committee: Prof^ª. Teresinha Augusta Giustolin – DCA/UNIMONTES (advisor); Prof^ª. Adelia Aparecida Xavier – DCA/UNIMONTES (Co-advisor).

1 INTRODUÇÃO

O controle de moscas-das-frutas vem sendo realizado basicamente por meio de iscas, utilizando inseticida químico associado a um atraente alimentar (CARVALHO, 2006). Embora sejam eficazes, eles podem atingir insetos não alvo, provocando desequilíbrio ambiental e problemas a saúde humana. Por esse motivo, tem se observado uma crescente procura por alimentos sem resíduos de agroquímicos (CARVALHO e NASCIMENTO, 2002).

Os fungos entomopatogênicos poderiam ser utilizados como medidas alternativas para o controle das moscas-das-frutas. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown e Smith já demonstraram ser patogênicos a moscas-das-frutas (CARNEIRO e SALLES, 1994; DIMBI *et al.*, 2004; QUESADA-MORAGA, 2008).

O isolado E9 de *M. anisopliae* na concentração de $12,8 \times 10^5$ conídios/mL foi virulento a adultos de *C. capitata*. Os autores verificaram que 3, 6 e 12 dias após a aplicação dos conídios, as mortalidades dos adultos foram de 30, 60 e 85%, respectivamente (GARCIA *et al.*, 1985). Garcia *et al.* (1989), avaliando este mesmo isolado, nas concentrações de $2,8 \times 10^6$, $7,8 \times 10^6$ e $8,3 \times 10^6$ conídios/mL, sobre larvas e pupas de *C. capitata*, observaram que o isolado foi mais efetivo na fase adulta, quando os conídios foram pulverizados sobre as larvas, reduzindo a emergência em 29,0%. Já a aplicação realizada na fase de pupa reduziu em 20,0% a emergência. Alves *et al.* (2004) avaliaram a eficácia dos fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *P. fumosoroseus* e *Verticillium* sp., concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL, sobre pré-pupas, pupas e adultos de *C. capitata*. Constataram que os isolados E9 e ESALQ 1037 de *M. anisopliae* foram os mais eficientes para o controle de pupas, chegando até 90% de mortalidade. Para os adultos, todos os isolados apresentaram eficiência máxima

de 60%. Almeida *et al.* (2007) avaliaram, em casa-de-vegetação, a virulência de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre pré-pupas de *C. capitata* na concentração de $5,0 \times 10^8$ conídios/mL. Verificaram que os isolados IBCB 425 de *M. anisopliae* e IBCB 66 de *B. bassiana* foram os mais virulentos, apresentando eficiência de controle de 66,6%.

A hipótese deste trabalho é que um dos isolados de *M. anisopliae* apresenta patogenicidade a *C. capitata*. Embasados nesta possibilidade, o objetivo deste trabalho foi avaliar a agressividade de isolados de *M. anisopliae* sobre larvas de 3º ínstar de *C. capitata* e averiguar a sua interferência no desenvolvimento deste inseto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Patologia de Insetos e de Fitopatologia do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), Campus de Janaúba, MG. Para a realização dos experimentos, foram utilizadas larvas de 3º ínstar de *C. capitata*, obtidas de criação-estoque mantida sob condições controladas (26 ± 1 °C, $65 \pm 10\%$ de UR e fotofase de 14 horas), no Laboratório de Criação de Insetos.

Isolados de *M. anisopliae* foram avaliados quanto a sua virulência a larvas de 3º ínstar de *C. capitata* (Tabela 1).

TABELA 01. Lista de isolados de *Metarhizium anisopliae* utilizados nos testes de patogenicidade a *Ceratitidis capitata*.

Isolados	Hospedeiro	Origem dos isolados
ESALQ 1037	<i>Solenopsis</i> sp.	Porto Alegre, RS
Ma E9	<i>Mahanarva posticata</i>	Recife, PE
IBCB 348	<i>Mahanarva frimbriolata</i>	Campinas, SP
Ma 1405	<i>Mahanarva frimbriolata</i>	Campinas, SP
Ma 319	<i>Mahanarva frimbriolata</i>	Campinas, SP
PL 26	<i>Mahanarva frimbriolata</i>	Campinas, SP
PL 43	<i>Mahanarva posticata</i>	Fleixeira D'Estado, AL
816	Solo	Piracicaba, SP
866	<i>Atta</i>	Goiânia, GO
867	<i>Atta</i>	Goiânia, GO

Os isolados de *M. anisopliae* foram repicados em placas de Petri, com auxílio de uma alça de platina, contento meio de cultura sólido completo (MC) (constituído por 0,36 g KH_2PO_4 , 1,05 g $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,60 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

1,0 g KCl, 10,0 g de glucose, 1,58 g de NaNO₃, 5,0 g extrato de levedura, 20,0 g ágar e 1000 mL de água destilada). Este meio foi previamente esterilizado em autoclave a 120 °C, durante 20 minutos. Após a repicagem dos fungos, as placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo BOD (26 ± 0,5°C, UR de 70 ± 10% e fotofase de 12 horas), durante 10 dias. Transcorridos esse período, as colônias dos fungos foram raspadas com o auxílio de um pincel, para a obtenção dos conídios. Os conídios foram adicionados a 20 mL de solução de água mais Tween 80[®] (0,1%). Esta suspensão foi passada por Aparelho de Vortex e agitador magnético para a desagregação dos conídios. Os conídios desagregados foram contados em câmara de Neubauer, visando à concentração desejada.

Os isolados Ma 319, ESALQ 1037, Ma E9, Ma 1405 e IBCB 348 foram avaliados na concentração de 2,0 x 10⁸ conídios/mL de suspensão. O PL 26, IBCB 348, ESALQ 1037 e Ma E9 foram avaliados na concentração de 1,0 x 10⁸ conídios/mL de suspensão; os isolados PL 43, 816, 866 e 867, na concentração de 2,0 x 10⁸ conídios/mL de suspensão.

Para a avaliação da patogenicidade e agressividade dos isolados, as larvas de 3^o ínstar foram imersas por 10 segundos em suspensões de conídios dos diferentes isolados. Esta suspensão consistia de conídios mais água mais Tween 80[®] (0,1%). Após a imersão na suspensão, as larvas foram coadas com o auxílio de um tecido *voil* e transferidas para copos plásticos descartáveis contendo vermiculita umedecida, que foram fechados com tecido tipo *voil*, presos por elástico. Todos os isolados tiveram como testemunha larvas de 3^o ínstar imersas em água destilada esterilizada mais solução de Tween 80[®] (0,1%). Os copos contendo as larvas foram mantidos em câmara climatizada do tipo BOD (26 ± 0,5 °C, UR de 70 ± 10% e fotofase de 12 horas).

Três dias após a montagem do experimento, foi realizada a triagem da vermiculita, visando à contagem do número de larvas mortas e a ocorrência de

pupas. Os pupários obtidos foram individualizados em recipientes plásticos (25 x 15 cm), visando à obtenção de adultos.

Casais dos adultos emergidos foram individualizados em gaiolas fabricadas com garrafas plásticas do tipo Pet (18 x 10 x 9 cm). Estas gaiolas apresentavam duas aberturas, uma delas com inclinação de 45°, sobre a qual foi colado um tecido do tipo *voil*, por onde as fêmeas poderiam fazer suas posturas. Os ovos foram recolhidos em placas de Petri (14 x 15 cm) contendo água destilada, que foram colocadas externamente à gaiola, sob a abertura com ângulo de 45°. A outra abertura da gaiola, que não apresentava inclinação angular, foi fechada com tecido tipo *voil*, através da qual foram introduzidos os casais e o alimento. Os casais receberam alimento à base de mel e açúcar mais água. Diariamente foi observada a ocorrência de ovos nas placas contendo água destilada, sendo estes coados através de tecido tipo *voil*, contados e acondicionados em nova placa de Petri (7,5 x 8,0 cm), forrada com papel-filtro umedecido, visando à avaliação da viabilidade. Diariamente, os ovos separados para a avaliação da viabilidade foram acompanhados quanto à eclosão das larvas por meio de microscópio estereoscópico.

Os isolados foram avaliados em três etapas, sendo estas realizadas em delineamentos inteiramente casualizados, com cinco, quatro e quatro tratamentos (isolados de fungos), mais testemunha. Cada tratamento foi constituído por um total de 100 larvas de 3º ínstar distribuídas em 10 repetições, sendo cada repetição composta por 10 larvas.

A montagem das gaiolas com casais também seguiu o delineamento inteiramente casualizado. Na primeira etapa da experimentação, foram avaliados cinco isolados do fungo (tratamentos) mais testemunha. Cada tratamento foi constituído de 30 casais distribuídos em três repetições (gaiolas), sendo cada uma composta por 10 casais. Na segunda etapa, foram avaliados quatro isolados

(tratamentos) mais testemunha. Cada tratamento foi constituído de cinco casais distribuídos em cinco gaiolas, sendo cada gaiola constituída por um casal.

Para a avaliação da viabilidade dos ovos, foram utilizados 100 ovos obtidos de cada gaiola.

As larvas, pupas e adultos mortos foram submetidos ao tratamento de desinfecção externa, para a confirmação da mortalidade pelo fungo. Para tanto, os mesmos foram imersos em hipoclorito a 1% por 1 minuto, álcool 70% por 3 minutos e tríplice lavagem com água destilada esterilizada. As larvas, pupas e adultos mortos foram transferidos para placas de Petri forrada com papel-filtro umedecido, visando à observação de esporulação do fungo.

Foram avaliadas a mortalidade larval e pupal, duração da fase pupal, anormalidade nos pupários e deformação de adultos, fertilidade e longevidade de machos e fêmeas acasalados.

Os resultados de mortalidade larval e pupal, duração de pupas foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados de *M. anisopliae* afetaram o desenvolvimento de *C. capitata*, provocando significativo alongamento na duração da fase pupal, em relação às testemunhas (Tabela 2).

Zimmer *et al.* (2007) também relataram aumento na duração pupal de *Musca domestica* Linnaeus, que chegou a um dia, quando estas foram expostas à concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL. O isolado responsável por esse aumento foi o CG 34 de *M. anisopliae*.

O tratamento de larvas de 3º instar de *C. capitata* somente causou significativa mortalidade larval quando estas foram expostas ao isolado ESALQ 1037, aliado à primeira etapa deste experimento na concentração de $2,0 \times 10^8$ conídios/mL (Tabela 2). Neste tratamento, a mortalidade foi de 17,2%. Nas demais etapas desta experimentação, os isolados causaram baixos valores de mortalidade, equiparável à testemunha. Na segunda etapa, as mortalidades variaram de 1% a 4%, e na segunda, de 1% a 2%. Esses resultados demonstraram que os isolados de *M. anisopliae* apresentam baixa virulência sobre larvas de 3º instar de *C. capitata*.

TABELA 02 - Mortalidade larval e pupal e duração de pupas de *Ceratitis capitata* tratadas, quando no 3º instar larval, com suspensão de conídios de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*.

Isolado	Mortalidade* (%)		Duração pupa (dias)* x ± s(x)
	Larval x ± s(x)	Pupal x ± s(x)	
Primeiro etapa (2,0 x 10⁸ conídios/mL)			
ESALQ 1037	17,2 ± 6,5 a	84,6 ± 3,1 a	10,1 ± 0,1 a
Ma E9	13,2 ± 5,0 ab	80,1 ± 2,2 a	10,2 ± 0,2 a
IBCB 348	3,6 ± 1,6 ab	59,0 ± 4,0 b	10,0 ± 0,03 a
Ma 1405	8,9 ± 1,8 ab	87,0 ± 1,6 a	10,0 ± 0,0 a
Ma 319	4,2 ± 2,4 ab	81,8 ± 3,2 a	10,1 ± 0,1 a
Testemunha	1,0 ± 0,1 b	3,0 ± 1,9 c	9,4 ± 0,02 b
CV	64,5	11,2	2,4
Segunda etapa (1,0 x 10⁸ conídios/mL)			
ESALQ 1037	3,0 ± 1,5 a	54,9 ± 7,0 a	9,6 ± 0,07 b
Ma E9	4,0 ± 1,6 a	40,7 ± 7,0 a	9,6 ± 0,07 b
IBCB 348	3,0 ± 1,5 a	54,2 ± 7,1 a	9,8 ± 0,08 ab
PL 26	1,0 ± 1,0 a	50,6 ± 7,1 a	10,0 ± 0,09 a
Testemunha	0,0 ± 0,0 a	3,0 ± 2,2 b	9,0 ± 0,0 c
CV	62,7	86,6	4,86
Terceira etapa (2,0 x 10⁸ conídios/mL)			
PL 43	2,0 ± 1,3 a	48,0 ± 7,1 a	9,7 ± 0,07 ab
816	1,0 ± 1,0 a	47,6 ± 7,0 a	9,5 ± 0,11 bc
866	0,0 ± 0,0 a	61,0 ± 6,9 a	9,8 ± 0,06 a
867	1,0 ± 1,0 a	46,2 ± 7,1 a	9,3 ± 0,08 c
Testemunha	1,0 ± 1,0 a	4,1 ± 2,8 b	9,0 ± 0,03 d
CV	58,0	85,9	4,77

* Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Garcia *et al.* (1989) também observaram baixa mortalidade larval de *C. capitata*, quando avaliaram o isolado Ma E9 de *M. anisopliae*. Os autores pulverizaram a concentração de $8,3 \times 10^6$ conídios/mL no solo, antes de colocar as larvas em contato. A justificativa desses autores para a inexistência de mortalidade foi quanto ao curto período pelo qual *C. capitata* passa a fase de pré-pupa. Fargues (1972) explica que a ecdise, que termina com a liberação da

exúvia, é um obstáculo natural à infecção por fungo e à contaminação do inseto. A contaminação do inseto está estreitamente ligada à duração dos intervalos entre as ecdises. Afirma que a liberação da exúvia contaminada pode evitar a doença, a não ser que o fungo já tenha penetrado no hospedeiro.

Alves *et al.* (2004) também não constataram significativa mortalidade larval, quando conídios de isolados de diferentes espécies de fungos foram aplicados sobre o 3º instar larval de *C. capitata*. Esses autores avaliaram os isolados 1200 de *P. fumosoroseus*, 972 de *Lecanicillium* sp., Ma E9 e ESALQ 1037 de *M. anisopliae* e Bb 447 e PL 63 de *B. bassiana* na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL.

O tratamento de larvas de 3º instar de *C. capitata* com conídios de *M. anisopliae* causou significativa mortalidade pupal, para as três etapas avaliadas (Tabela 2). As mortalidades pupais causadas pelos conídios dos isolados foram maiores que a constatada nas suas testemunhas, nas quais não ultrapassaram 4,1%.

Na primeira etapa, os isolados ESALQ 1037, Ma E9, Ma 1405 e o Ma 319 provocaram mortalidades pupais que variaram de 80,1% a 87,0%, sendo que nestas condições, as larvas foram expostas a uma concentração de $2,0 \times 10^8$ conídios/mL. Neste experimento, somente o isolado IBCB 348 apresentou virulência às pupas significativamente menor que os demais, mas superior à testemunha. Na segunda etapa, os isolados ESALQ 1037, Ma E9, IBCB 348 e PL 26 causaram mortalidade pupais que variaram de 40,7% a 54,9%, sendo nestas condições utilizada uma concentração inferior à testada na primeira etapa. Esta concentração foi duas vezes menor que a utilizada na primeira etapa, ou seja, $1,0 \times 10^8$ conídios/mL. Na terceira etapa, os isolados PL 43, 816, 866 e 867 causaram mortalidades pupais que variaram de 46,2% a 48,0%, sendo nestas condições utilizada a concentração de $2,0 \times 10^8$ conídios/mL, semelhante à avaliada na primeira etapa.

Garcia *et al.* (1989) constataram mortalidade pupal de *C. capitata*, que foi de 25%, quando larvas de 3º instar foram expostas ao isolado Ma E9 de *M. anisopliae*. Esse valor de mortalidade ocorreu quando os conídios foram pulverizados sobre o solo, concentração de $8,3 \times 10^6$ conídios/mL, antes da colocação das larvas. Todavia, quando as pupas foram imersas na suspensão deste isolado, concentração de 28×10^6 conídios/mL, a mortalidade pupal foi por volta de 15%.

Alves *et al.* (2004) verificaram que todos os isolados avaliados causaram mortalidade pupal quando foram aplicados sobre as pupas de *C. capitata*. Os isolados dos fungos estudados foram 1200 de *P. fumosoroseus*, 972 de *Lecanicillium* sp., Ma E9 e ESALQ 1037 de *M. anisopliae* e Bb 447 e PL 63 de *B. bassiana* na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL. Os autores verificaram que Ma E9 e ESALQ 1037 foram os mais virulentos, causando mortalidades médias superiores a 90%.

Almeida *et al.* (2007) observaram redução na emergência de adultos de até 80% quando expuseram larvas de 3º instar de *C. capitata* a diversos isolados de *M. anisopliae* e de *B. bassiana*, concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL.

Os isolados de *M. anisopliae* afetaram a pupação, induzindo a um aumento na porcentagem de pupários anormais (que foram à presença de algumas pupas com tamanho reduzido e outras com o tegumento amassado) e adultos deformados (Figura 1). Na primeira etapa não foi observada nenhuma anormalidade nos pupários, somente na segunda e terceira etapas (Figura 1). Na segunda etapa, as anormalidades foram mais expressivas, variando de 0,0% na testemunha a 11% no tratamento com isolado PL 26, sendo observados para os demais isolados valores menores. Na terceira etapa, de forma semelhante à segunda, todos os isolados causaram anormalidades nos pupários. Nesta etapa as porcentagens de anormalidades foram menores que as constatadas na segunda, variando de 0,0% (testemunha) a 9% (isolado 816). As pupas dos pupários com

anormalidades não resultaram em adultos, tendo o inseto morrido nesta fase. Este resultado indica que, apesar das larvas terem sobrevivido à exposição aos conídios do fungo, as pupas provenientes foram afetadas. O crescimento do micélio no interior da pupa, provavelmente tenha afetado o processo da metamorfose, impedindo que estes insetos atingissem a fase adulta, efeito adverso que afetou a sobrevivência da mosca.

Os adultos provenientes dos tratamentos apresentaram deformações que foram numericamente superiores às constatadas nas testemunhas, variando de 2,1% a 6,1% (Figura 1). Na primeira etapa, somente o isolado Ma 319 (6,7%) causou deformação; na segunda, os isolados ESALQ 1037 (8,9%) e IBCB 348 (3,9%), e na terceira, somente o isolado 816 (5,8%).

Zimmer *et al.* (2007) também relataram deformação nos adultos de *M. domestica* quando estas foram expostas aos conídios do isolado CG 34 de *M. anisopliae*. Verificaram que na maior concentração ($1,0 \times 10^8$ conídios/mL) ocorreu 16% de deformação dos adultos.

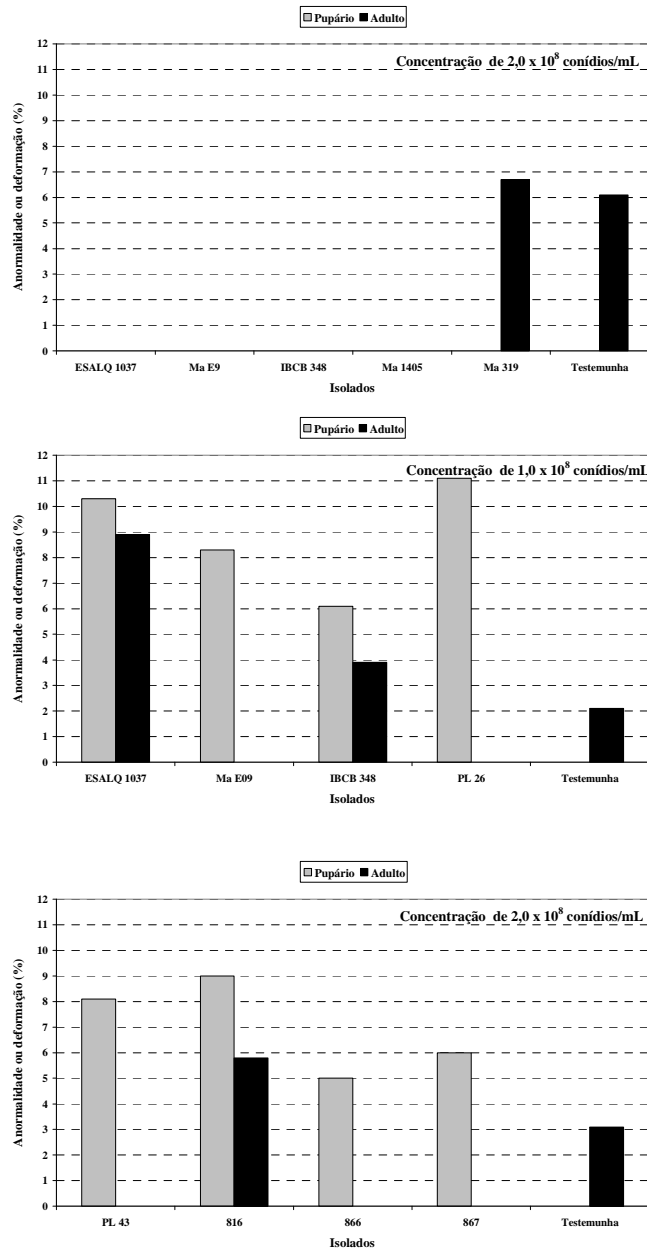


FIGURA 01 – Porcentagem de pupários anormais e adultos deformados de *Ceratitis capitata*, provenientes de larvas tratadas no 3º ínstar com suspensão de conídios de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*.

A viabilidade dos ovos da mosca-das-frutas foi afetada pela aplicação dos isolados do fungo sobre a fase de pré-pupa de *C. capitata*, nos dois primeiros experimentos avaliados (Tabela 3).

No primeiro experimento, somente os adultos provenientes de larvas de 3º ínstar, tratamentos com os isolados IBCB 348 e Ma 1405, apresentaram redução na fertilidade dos ovos, em relação à testemunha, que foi superior a 75% (Tabela 3). No segundo experimento, todos os isolados afetaram a fertilidade dos ovos, reduzindo a sua viabilidade, quando comparados à testemunha, que apresentou viabilidade superior a 90%.

A longevidade dos adultos avaliada no segundo experimento foi afetada pela exposição dos isolados dos fungos a larvas de 3º ínstar de *C. capitata* (Tabela 3). Os adultos machos não sofreram redução na sua longevidade, quando comparados à testemunha, pois sobreviveram, em média, mais do que 63,4 dias, idade apresentada pela testemunha. A longevidade das fêmeas, entretanto, foi reduzida, quando comparada à testemunha, principalmente quando expostas aos isolados Ma E9 e ESALQ 1037. Nestes dois tratamentos a fêmeas sobreviveram 39,8 e 47,8 dias, respectivamente, contra 76,8 dias apresentados pela testemunha.

Castilho *et al.* (2000) também observaram que a fertilidade foi moderadamente afetada, sendo reduzida em 50%. Os autores também relataram uma redução de 40% a 50% da fecundidade das fêmeas de *C. capitata*, causada pelo fungo *M. anisopliae* (DL50 de $5,1 \times 10^3$ e $6,1 \times 10^3$ conídios/mosca).

TABELA 03 – Viabilidade de ovos e longevidade de adultos acasalados de *Ceratitis capitata*, provenientes de larvas de 3º ínstar tratadas com suspensão de conídios de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*.

Isolado	Viabilidade dos ovos	Longevidade (dias)	
		Macho	Fêmea
Primeiro experimento (2,0 x 10⁸ conídios/mL)			
ESALQ 1037	86,2	-	-
Ma E9	82,8	-	-
IBCB 348	68,1	-	-
Ma 1405	55,2	-	-
Ma 319	75,6	-	-
Testemunha	76,7	-	-
Segundo experimento (1,0 x 10⁸ conídios/mL)			
ESALQ 1037	51,8	77,0	47,8
Ma E09	30,8	74,0	39,8
PL 26	58,6	70,5	66,0
Testemunha	91,7	63,4	76,8

A sobrevivência total de *C. capitata* foi afetada de forma variável pelos isolados avaliados após as larvas de 3º ínstar terem sido imersas nas suspensões de conídios dos isolados de *M. anisopliae* (Figura 2). Os isolados de *M. anisopliae* também agiram de forma variável nas diferentes fases do ciclo deste inseto.

A fase larval, ou seja, a fase de 3º ínstar foi menos afetada pelos conídios do fungo, pois todos os isolados avaliados foram pouco efetivos (Tabela 2). Esta baixa virulência foi constatada através da pequena porcentagem de mortalidade causada na população de mosca, nesta fase. Esta ocorrência pode ser explicada através da biologia do inseto e da conidiogênese do fungo. Nesta fase o inseto está terminando o período larval, prestes a pupar, portanto em pré-pupa. Para se tornar pupa, necessita-se passar pela última ecdise, trocando seu tegumento de larva pelo de pupa. Esse processo leva cerca de 24 horas para ocorrer. De acordo com Da Cruz *et al.* (2000), do primeiro salto dado pela larva,

comportamento que o inseto apresenta nesta fase, à completa imobilização, transcorrem cerca de 5 a 8 horas, quando o inseto foi colocado a uma temperatura de 23 °C. Segundo ele, dependendo da temperatura e umidade a qual ele está exposto, pode levar até 24 horas. Quanto ao fungo, segundo Alves (1998), o processo de germinação dos conídios dos fungos deuteromicetos pode levar no mínimo 12 horas, dependendo das condições ambientais. Na natureza, na fase de pré-pupa, a larva deixa o fruto. Na maioria das vezes, ela migra do interior para a periferia do fruto, perfura a casca e salta para fora dele indo pupar no solo. Este é o único momento em que o inseto poderá ser contaminado com os conídios do fungo, se ele tiver sido aplicado sobre a planta. Alves (1998) afirma que para haver a infecção pelo fungo entomopatogênico, os conídios do patógeno deverão aderir à cutícula do inseto, somente depois de algum tempo germinam indo, então, suas hifas penetrar no corpo do inseto, iniciando esse mecanismo. Assim, o isolado que possuir conídios que germinam mais rapidamente será o mais indicado para ser usado no controle desta praga. Adicionalmente, este isolado deverá ser altamente patogênico ao inseto. Neste trabalho, o isolado que se mostrou mais agressivo às pré-pupas foi o ESALQ 1037, quando avaliado na concentração de $2,0 \times 10^8$ conídios/mL (Tabela 2). Este isolado, nesta concentração, parece ter germinado e infectado as larvas mais rapidamente que os demais, superando o tempo gasto pela pré-pupa para a troca de tegumento e ocorrência da pupa.

A fase de pupa do inseto foi a mais prejudicada pelo fungo *M. anisopliae*, fato verificado para todos os isolados avaliados (Tabela 2). Nesta fase, a mortalidade foi muito alta, reduzindo em muito a população da mosca. Isso indica que os conídios expostos às larvas de 3º ínstar, apesar de terem penetrado nas larvas, só colonizaram o inseto na fase seguinte, ou seja, na pupa, tornando-se, assim, aptos para causar mortalidade à mosca. Isso pode ser explicado pelo tempo que é necessário para que o conídio germine e cresça no

interior de um inseto, e com isso cause a morte deste. Finalmente, quando o fungo não foi suficientemente patogênico para matar o inseto, causou deformações nos adultos que, embora tenha reduzido pouco a sobrevivência deles, tornou-os inviáveis para a reprodução. Nesta fase, também o isolado ESALQ 1037, nas duas concentrações avaliadas, mostrou-se o mais agressivo às pupas (Tabela 2).

A sobrevivência total de *C. capitata* provenientes de larvas tratadas com os isolados de *M. anisopliae* foi menor do que aquela apresentada pela testemunha, em consequência das mortalidades ocorridas nas fases larval e pupal, somada à deformação causada nos adultos (Figura 2). No primeiro experimento, os isolados ESALQ 1037 e Ma 1405 foram os mais agressivos à mosca, reduzindo cerca de 89% a sobrevivência deste inseto. No segundo, novamente o isolado ESALQ 1037 foi o que promoveu menor sobrevivência dos adultos, causando 60% de mortalidade da mosca-das-frutas. No terceiro, o isolado 866 causou 61% de mortalidade de *C. capitata*.

Redução na emergência de adultos de *C. capitata* também foi constatada por Almeida *et al.* (2007), quando expuseram as pré-pupas às concentrações $5,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^8$ e $5,0 \times 10^8$ conídios/mL de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Constataram que o isolado IBCB 425 de *M. anisopliae* e o IBCB 66 *B. bassiana*, reduziram em até 80% a emergência da mosca-das-frutas. Garcia *et al.* (1989) registraram redução na emergência de adultos de até 70%, quando pulverizaram o isolado Ma E9 de *M. anisopliae* sobre o solo antes de colocarem as pré-pupas. Mochi *et al.* (2006) também verificaram redução na sobrevivência dos adultos emergidos do solo em até 95%, quando expuseram larvas, pré-pupas e pupas de *C. capitata* ao isolado Ma E9 de *M. anisopliae*. Os autores consideram que esses resultados demonstram o potencial de *M. anisopliae*, quando este fungo for aplicado na área de projeção da copa de árvores frutíferas para o manejo da moscas-das-frutas. Professam ainda que nada impede dos conídios do fungo

serem aplicados sobre a copa das fruteiras, visando a atingir os frutos infestados e também os insetos adultos, já que estes demonstraram ser susceptíveis a *M. anisopliae*. Quesada-Moraga (2008) observou mortalidade de adultos de 95% a 100%, em condições de laboratório, quando pulverizou suspensão de conídios do isolado EA Ma 01/58-Su de *M. anisopliae* (concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL).

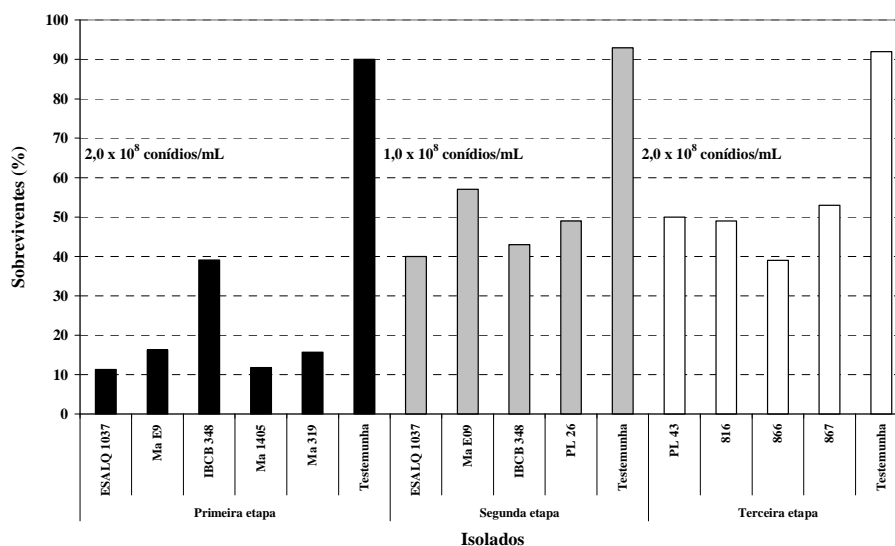


FIGURA 02 – Sobrevivência total de *Ceratitis capitata*, provenientes de larvas tratadas no 3º ínstar com suspensão de conídios de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*.

Considerando-se os diferentes isolados avaliados, juntamente com as concentrações utilizadas em cada um dos experimentos, conclui-se que o isolado ESALQ 1037, avaliado nos dois primeiros experimentos, foi patogênico e o mais agressivo à *C. capitata*; apesar do Ma 1405, avaliado no primeiro experimento, também ter se mostrado muito promissor. Estes resultados demonstram o potencial dos isolados do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* como agente no controle biológico de *C. capitata*.

4 CONCLUSÕES

- Os isolados de *M. anisopliae* são pouco virulentos a larvas de *C. capitata*;
- Os isolados de *M. anisopliae* são patogênicos a pupas de *C. capitata*.
- Os isolados de *M. anisopliae* provocaram alongamento da fase pupal, anormalidades nos pupários e deformações nos adultos;
- O isolado ESALQ 1037, na concentração de $2,0 \times 10^8$ conídios/mL, é o mais agressivo à *C. capitata*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. E. M. *et al.* Patogenicidade de fungos e nematóide entomopatogênicos em mosca-do-mediterrâneo *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). **BioAssay**, Piracicaba, v. 2, n. 7, p.1-7, 2007.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba, FEALQ, 1998. p. 289-381.
- _____. *et al.* Avaliação de fungos entomopatogênicos para *Ceratitis capitata*. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia**, Turrialba, v. 72, n. 72, p. 31-38. 2004.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; SALLES, L. A. B. Patogenicidade de *Paecilomyces fumosoroseus*, isolado CG 260 sobre larvas e pupa de *Anastrepha fraterculus* Wied. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 341-343, 1994.
- CARVALHO, R. S.; NASCIMENTO, A. S. Criação e utilização de *Diachasmimorpha longicaudata* para controle biológico de moscas-das-frutas. In: PARRA, J. R. P. *et al.* (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 165-177.
- _____. **Biocontrole de moscas-das-frutas: histórico, conceitos e estratégias**. Cruz das Almas: EMBRAPA/CNPMPF, 2006. 5 p. Circular Técnica, 83.
- CASTILHO, M. A. *et al.* Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extract. **Biological Control**, Orlando, v. 19, p. 274-282, 2000.

DA CRUZ, I. B. M. *et al.* Morfologia do aparelho reprodutor e biologia do desenvolvimento. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 55-66.

DIMBI, S. *et al.* Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 49, p. 83-94, 2004.

FARGUES, J. Étude des conditions d'infection des larves de doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* Say, par *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. [Fungi Imperfecti]. **Entomophaga**, Paris, v. 17, n. 3, p. 319- 337, 1972.

GARCIA, A. S. *et al.* Virulência de linhagens mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* em *Ceratitis capitata* (Díptera: Tephritidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 267-270, 1985.

_____.; *et al.* Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* nas diferentes fases de desenvolvimento de *Ceratitis capitata* (Wied) (Diptera; Tephritidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 33, p. 17-23, 1989.

MOCHI, D. A. *et al.* Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in Soil with Different Pesticides. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 3, p. 382-389, 2006.

QUESADA-MORAGA, E. *et al.* Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**, Orlando, v. 47, p. 115-124, 2008.

ZIMMER, C. R. *et al.* Patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 16., 2007, Pelotas, RS. **Anais...** Pelotas: Faculdade de Agronomia de Eliseu Maciel, 2007.

CAPITULO II - TOXICIDADE DE AZADIRACTINA SOBRE A BIOLOGIA DE *Ceratitis capitata* (Wied.)

RESUMO

¹SOUZA, Hugo Ribeiro de. **Toxicidade de azadiractina sobre a biologia de *Ceratitis capitata* (Wied.)**. 2010. Cap. 2. p.59-85. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de azadiractina sobre a biologia de *C. capitata*. Larvas recém-eclodidas foram criadas em dieta artificial contendo diferentes concentrações de azadiractina (produto NeemAzal-T/S[®], contendo 10.000 ppm de azadiractina). As concentrações avaliadas variaram de 5 ppm a 441 ppm de NeemAzal. As pupas obtidas foram transferidas para recipientes plásticos, visando à emergência de adultos. Casais de adultos foram formados e, fertilidade, fecundidade e longevidade de adultos foram avaliadas. A azadiractina provocou alongamento da fase larval e redução da fase pupal. Altas mortalidades larvais foram constatadas na concentração de 339 ppm de NeemAzal e nas acima desta, chegando a 100%. Nas menores concentrações, a ocorrência de mortalidade larval e pupal foram diretamente proporcional às concentrações utilizadas. O NeemAzal provocou anormalidades nos pupários e deformações nos adultos. A fecundidade, fertilidade e longevidade dos adultos da mosca foram reduzidas. Este produto se mostrou promissor para ser utilizado no controle de *C. capitata*, pois a azadiractina presente no mesmo afetou todas as fases de desenvolvimento da mosca.

¹ Comitê Orientador: Prof^ª. Teresinha Augusta Giustolin – DCA/UNIMONTES (orientador); Prof^ª. Adelica Aparecida Xavier – DCA/UNIMONTES (Co-orientador).

ABSTRACT

SOUZA, Hugo Ribeiro de. **Azadirachtin toxicity on *Ceratitis capitata* (Wied) biology**. 2010. Chapter 2. p.59-85. Dissertation (Master's degree in Plant Production in the Semi-arid) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.¹

This study aimed to evaluate the effect of azadirachtin on the *C. capitata* biology. New-hatched larvae were reared on artificial diet containing different azadirachtin concentrations (NeemAzal-T/S[®] product, containing 10.000 ppm azadirachtin). The evaluated concentrations ranged from 5 ppm to 441 ppm of NeemAzal. The obtained pupae were transferred to plastic containers, aiming at adult emergence. Adults couples were formed, and fertility, fecundity and longevity of adults were evaluated. Azadirachtin increased length of the larval stage and reduced the pupal one. High larval mortalities were observed at concentration of 339 ppm of NeemAzal and above this, getting to 100%. In lower concentrations, the occurrence of larval and pupal mortality were directly proportional to used concentrations. The NeemAzal caused abnormalities in puparia and deformities in adults. The fecundity, fertility and longevity of the adult were reduced. This product has shown to be promising for use in *C. capitata* control, as the azadirachtin presents in it affected all stages of fly development.

¹ Guidance Committee: Prof^ª. Teresinha Augusta Giustolin – DCA/UNIMONTES (Advisor); Prof^ª. Adélica Aparecida Xavier – DCA/UNIMONTES (Co-advisor).

1 INTRODUÇÃO

As fêmeas das moscas-das-frutas provocam dano através da oviposição, e as larvas por meio do seu desenvolvimento no interior do fruto (NAVA *et al.*, 2006). As larvas, ao se alimentarem da polpa dos frutos, os tornam inadequados para o consumo e para a industrialização (ARAÚJO e ZUCCHI, 2003), causando danos diretos à produção (NASCIMENTO e CARVALHO, 2000). Além disso, causam dano indireto, devido às exigências quarentenárias impostas pelos países importadores de frutas *in natura*.

O controle destes insetos tem sido realizado basicamente por meio de inseticidas utilizando-se iscas tóxicas ou pulverizações por cobertura, contribuindo de forma acentuada para o desequilíbrio do agroecossistema (CARVALHO, 2006).

Os programas de manejo integrado de pragas têm incentivado o uso de medidas alternativas de controle destas moscas (ALVARENGA, 2006). Uma medida alternativa ao método tradicional poderia ser a utilização do nim (*Azadirachta indica* A. Juss), planta da família Meliaceae que possui elevado potencial inseticida (CIOCIOLA JUNIOR e MARTINEZ, 2002; DA CRUZ, 2000). Esta planta apresenta bioatividade aos insetos-praga, principalmente pela presença do composto azadiractina, que é um limonoide tetranortriterpenoide encontrado em maior quantidade nas sementes de nim, e é o principal componente responsável pelos efeitos de deterrência alimentar e toxicidade a insetos (MORDUE (LUNTZ) e NISBET, 2000; SCHMUTTERER, 1990).

A planta de nim tem demonstrado ser bioativa à mosca-das-frutas, *C. capitata*. Di Ilio *et al.* (1999) observaram redução significativa no número de ovos depositados pelas fêmeas, e este produto (Azatin), utilizado em maiores concentrações provocou esterilidade das fêmeas e redução na longevidade. Vinuela *et al.* (2000) verificaram que a ingestão de nim, mais especificamente da

azadiractina, por larvas recém-eclodidas de *C. capitata* foi altamente tóxica, impedindo a emergência de adultos (concentração de 1,0 mg/i.a/L). Adultos alimentados com esse inseticida, na concentração máxima recomendada sobreviveram, mas sua postura foi totalmente inibida. Habibe *et al.* (2003) constataram que o óleo de nim aplicado em mamão causou mortalidade de adultos de *C. capitata*, caracterizando um efeito tóxico.

Considerando-se a crescente demanda por alimentos livres de resíduos de agroquímicos e baseados nos inúmeros resultados promissores sobre a utilização de nim no controle de insetos-praga. A hipótese deste trabalho é que a azadiractina pode afetar a biologia da mosca. Questiona-se: a qual concentração de azadiractina deve ser exposta à larva da mosca para que ocorra mortalidade total? Se a concentração não for suficiente para causar mortalidade total, qual a concentração seria necessária para afetar a biologia deste inseto? Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da azadiractina sobre a biologia de *C. capitata*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Criação de insetos do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), Campus de Janaúba, MG. A criação de *C. capitata* e os experimentos foram realizados sob condições controladas (26 ± 1 °C, $65 \pm 10\%$ de UR e fotofase de 14 horas). As larvas recém-eclodidas utilizadas nos experimentos foram obtidas de criação-estoque, mantida em laboratório.

O produto utilizado foi o NeemAzal-T/S (10.000 ppm de azadiractina), composto por um extrato concentrado de azadiractina, formulado em óleo vegetal comestível.

Larvas recém-eclodidas foram alimentadas com dieta artificial específica para *C. capitata* (CARVALHO *et al.*, 1998). O NeemAzal-T/S foi acrescentado a esta dieta, visando à obtenção de diferentes concentrações a serem testadas. Os diferentes volumes do produto foram adicionados à água destilada utilizada no preparo da dieta, antes de serem acrescentados os ingredientes secos que a compõem, no final do preparo da dieta.

Em um primeiro experimento, foram avaliadas as concentrações de 5 ppm, 108 ppm, 182 ppm, 339 ppm, 418 ppm, 441 ppm de NeemAzal-T/S adicionadas à dieta. No segundo experimento, foram avaliadas as concentrações de 7 ppm, 47 ppm, 94 ppm e 141 ppm de NeemAzal-T/S adicionadas à dieta. Para os dois experimentos, foram utilizadas como testemunhas dietas sem a adição deste produto (0,0 ppm). As concentrações testadas foram baseadas em experimentos preliminares realizados em laboratório.

Cada um dos tratamentos (dietas contendo as diferentes concentrações de NeemAzal-T/S) e a testemunha foi distribuído em placas de Petri (9,5 x 10,0 cm) e nelas foram inoculadas larvas recém-eclodidas de *C. capitata*. O

desenvolvimento larval foi acompanhado diariamente, visando à obtenção das pupas.

As pupas obtidas foram individualizadas e transferidas para recipientes plásticos (24,5 x 18,5 cm), que foram fechados com filmes plásticos e perfurados com o auxílio de um alfinete, para permitir a entrada de ar. O desenvolvimento pupal foi acompanhado diariamente, visando à emergência de adultos.

Casais dos adultos emergidos foram individualizados em gaiolas (18,0 x 10,0 x 9,0 cm), feitas de garrafas Pet, de modo que uma das laterais da gaiola apresentasse uma inclinação de 45°, no qual foi utilizado um tecido tipo “voil”, onde as fêmeas depositavam seus ovos. Os casais receberam alimento (à base de mel e açúcar) e água. Para a obtenção das posturas, placas de Petri (14,0 x 15,0 cm), contendo água destilada, foram colocadas externamente ao lado inclinado da gaiola. Diariamente foi observada a ocorrência de ovos nas placas contendo água destilada, sendo estes coados através de tecido tipo *voil*, contados e acondicionados em nova placa de Petri (7,5 x 8,0 cm), forrada com papel-filtro umedecido, objetivando a avaliação da viabilidade. Diariamente foi acompanhada a eclosão das larvas, por meio de microscópio estereoscópico.

Os recipientes plásticos contendo as pupas e as gaiolas com os adultos foram mantidos em condições controladas, sendo as larvas e pupas colocadas em câmara climatizada do tipo BOD (26 ± 1 °C, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas).

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, sendo o primeiro composto de seis tratamentos (concentrações de azadiractina) mais testemunha (0,0 ppm de azadiractina); e o segundo, por quatro tratamentos mais testemunha. Para os dois experimentos, os tratamentos foram constituídos por 10 repetições, contendo cada uma 10 larvas de *C. capitata* recém-eclodidas, totalizando 100 larvas por tratamento.

Os casais também foram montados em delineamento inteiramente casualizado, sendo cinco repetições por tratamento (concentrações de azadiractina) mais a testemunha, com um casal por repetição. Para a viabilidade dos ovos, foram utilizados 100 ovos por casal. As variáveis biológicas avaliadas foram: mortalidade larval e pupal, duração das fases larval e pupal, anormalidades de pupários e deformação de adultos, fertilidade, fecundidade e longevidade de adultos.

Os dados de mortalidade larval e pupal foram submetidos ao teste de regressão, a 5% de probabilidade. Os dados de duração das fases larval e pupal foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento, nos tratamentos contendo concentrações 418 ppm e 441 ppm de NeemAzal-T/S, as larvas não sobreviveram, apresentando 100% de mortalidade (Figura 1). Este fato impossibilitou a obtenção das médias das variáveis: duração das fases larval e pupal e mortalidade de pupas para estes tratamentos; assim, estes tratamentos não entraram na análise estatística (Tabela 1 e Figura 3). Para as larvas alimentadas com a dieta contendo concentração de 339 ppm de NeemAzal-T/S, adotou-se o mesmo procedimento citado anteriormente, já que restaram somente 10 larvas vivas, que atingiram a fase de pupa.

3.1 Efeito sobre o desenvolvimento: A ação da azadiractina sobre o desenvolvimento de *C. capitata* foi constatada nos tratamentos contendo concentração igual a 108, 141 e 182 ppm (Tabelas 1 e 2). No primeiro experimento, o efeito significativo na duração larval foi constatado nos tratamentos contendo as concentrações de 108 ppm e 182 ppm de NeemAzal-T/S, visto que apresentaram durações maiores do que os tratamentos contendo 5 ppm de óleo e a testemunha (Tabela 1). Comparando estes tratamentos com a testemunha, verifica-se que as durações foram alongadas em 6 dias (concentração de 182 ppm) e de um dia (concentração de 108 ppm).

TABELA 1. Duração das fases larval e pupal de *Ceratitis capitata* alimentadas, quando recém-eclodidas, com dieta artificial contendo diferentes concentrações de NeemAzal-T/S.

Concentração (ppm)	Duração (Dias)	
	Larval	Pupal
	x ± s(x)	x ± s(x)
0	7,1 ± 0,14 c	9,5 ± 0,08 b
5	7,0 ± 0,09 c	9,9 ± 0,06 a
108	8,5 ± 0,13 b	8,9 ± 0,14 c
182	13,3 ± 0,40 a	-
339	-	-
418	-	-
441	-	-
CV (%)	7,89	6,48

* Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No segundo experimento, o efeito significativo do óleo de nim sobre a duração larval foi constatado na concentração igual a 47 ppm e nas acima desta, onde ocorreu um alongamento da fase, em relação aos tratamentos com 7 ppm e na testemunha (Tabela 2). O alongamento foi de cerca de 2 dias na concentração de 141 ppm, e de aproximadamente um dia nas concentrações de 94 ppm e 47 ppm, em relação à testemunha. Estes resultados demonstraram que, mesmo em baixa concentração, o produto afetou o desenvolvimento larval de *C. capitata*.

TABELA 2. Duração das fases larval e pupal de *Ceratitis capitata* alimentadas, quando recém-eclodidas, com dieta artificial contendo diferentes concentrações de NeemAzal.

Concentração (ppm)	Duração (Dias)	
	Larval	Pupal
	$\bar{x} \pm s(\bar{x})$	$\bar{x} \pm s(\bar{x})$
0	7,4 ± 0,02 d	8,2 ± 0,09 ab
7	7,6 ± 0,04 d	7,8 ± 0,15 b
47	8,2 ± 0,09 c	8,6 ± 0,12 a
94	9,0 ± 0,10 b	8,0 ± 0,15 b
141	9,8 ± 0,12 a	8,1 ± 0,14 ab
CV (%)	3,12	8,45

* Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Viana e Prates (2003) também verificaram efeito sobre o desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (Smith) após lagartas recém-eclodidas serem alimentadas com folhas de milho imersas ou pulverizadas com o extrato de folhas de nim.

O alongamento da fase larval pode ter sido provocado por um efeito deterrente que a azadiractina apresenta, normalmente, sobre os insetos, reduzindo assim, o volume de alimento ingerido pelas larvas. O óleo de nim, que é extraído das sementes de *A. indica*, apresenta propriedades inseticidas que afetam o crescimento de diversas espécies de insetos (MARTINEZ e EMDEN, 2001). Neste óleo está presente a azadiractina que é um limonoide tetranortriterpenoide encontrado em maior quantidade nas sementes, e é o principal responsável pelos efeitos de deterrência alimentar e toxicidade a insetos (MORDUE (LUNTZ) e NISBET, 2000). Segundo Ciociola Junior e Martinez (2002), a azadiractina afeta a ingestão de alimento, causando redução na alimentação dos insetos e, conseqüentemente, alongamento no seu desenvolvimento.

A azadiractina vem sendo efetivamente utilizada para mais de 400 espécies de insetos, incluindo muitas pragas de plantas cultivadas, e tem provado

ser, até o momento, o mais promissor ingrediente de plantas utilizado no manejo integrado de pragas (MA *et al.*, 2000). Alongamento na duração da fase larval também foi constatado por Martinez e Emden (2001), em lagartas de 3º ínstar de *Spodoptera littoralis* Boisduval, alimentadas por dois dias com dieta artificial contendo azadiractina (de 0,01 ppm a 1,0 ppm p/v), e transferidas para dieta pura. Efeito semelhante foi observado por Gonçalves-Gervásio e Vendramim (2004) em lagartas de *Tuta absoluta* Meyrick expostas a extrato aquoso de nim (0,5, 1,0 e 5,0%); e por Alouani *et al.* (2009), em larvas de *Culex pipiens* (L.) expostas a CL₅₀ e CL₉₀ de azadiractina, concentrações de 0,35 e 1,28 mg/L, respectivamente.

Somente as larvas alimentadas com dieta artificial contendo concentrações de NeemAzal-T/S menores do que 182 ppm, considerando os dois experimentos, completaram o estágio larval, atingindo a fase de pupa (Tabelas 1 e 2). As larvas que atingiram o estágio pupal e que foram provenientes de dietas contendo concentrações menores do que 182 ppm apresentaram variação significativa na sua duração, demonstrando que também nesta fase a mosca foi afetada pelo inseticida botânico. As variações nas durações foram pequenas, já que na concentração de 108 ppm as pupas levaram 9 dias para a emergência de adultos e na testemunha e concentração de 5 ppm foram 10 dias, para o primeiro experimento. Para o segundo, foram 8 dias na testemunha e nas concentrações de 7, 94 e 141 ppm, e 9 dias na concentração de 47 ppm.

3.2. Mortalidade: A adição de azadiractina na dieta artificial causou aumento significativo na mortalidade de *C. capitata*, que foi se intensificando com o aumento da concentração do produto (Figuras 1 e 2). A comparação das médias de mortalidade larval obtidas nas concentrações avaliadas com aquela obtida no tratamento de 5 ppm, menor valor avaliado no primeiro experimento, demonstra

o efeito dose-dependente, o qual ficou evidente no tratamento com concentração igual ou acima de 418 ppm (Figura 1).

A mortalidade larval foi diretamente proporcional ao aumento na concentração de NeemAzal-T/S adicionado à dieta da mosca (Figuras 1 e 2). Esse efeito foi mais drástico no primeiro experimento, onde foram utilizadas concentrações maiores e onde a mortalidade atingiu 100% nos tratamentos com concentrações de 418 ppm e 441 ppm. Neste caso, a azadiractina impediu completamente a pupação das larvas de *C. capitata*. No tratamento com concentração de 339 ppm do produto, 90% das larvas morreram. Contudo, nas concentrações menores, como 5 ppm, 108 ppm e 182 ppm, as mortalidades das larvas foram menores, 12, 11 e 42%, respectivamente, sendo que estas não atingiram a fase de pupa. No segundo experimento, as concentrações de NeemAzal-T/S adicionadas à dieta foram menores e, por conseguinte, as mortalidades também, não atingindo em nenhum dos tratamentos 100% (Figura 2). Nestas condições, as maiores mortalidades foram constatadas nas concentrações de 94 ppm e 141 ppm, 24 e 22%, respectivamente.

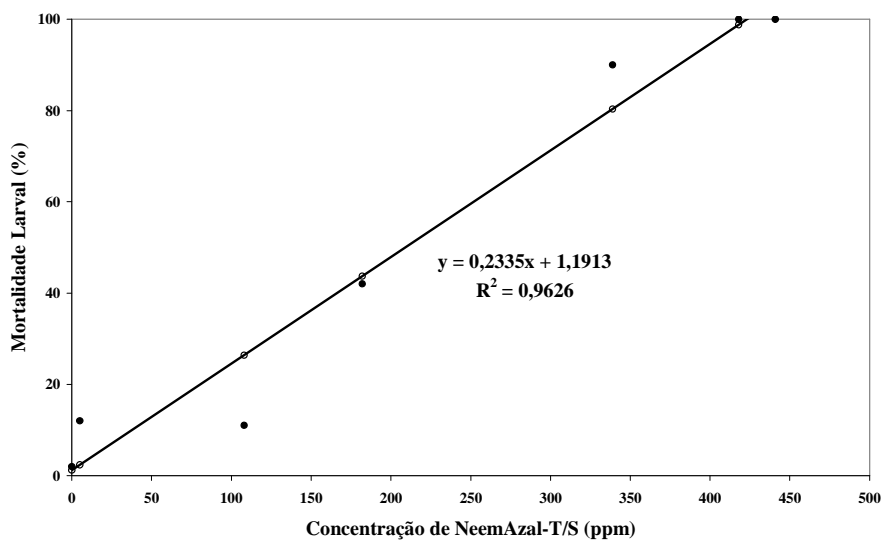


FIGURA 1: Mortalidade larval de *Ceratitis capitata* alimentadas, quando recém-eclodidas, com dieta artificial contendo as concentrações de 0,0, 5, 108, 182, 339, 418 e 441 ppm de NeemAzal-T/S.

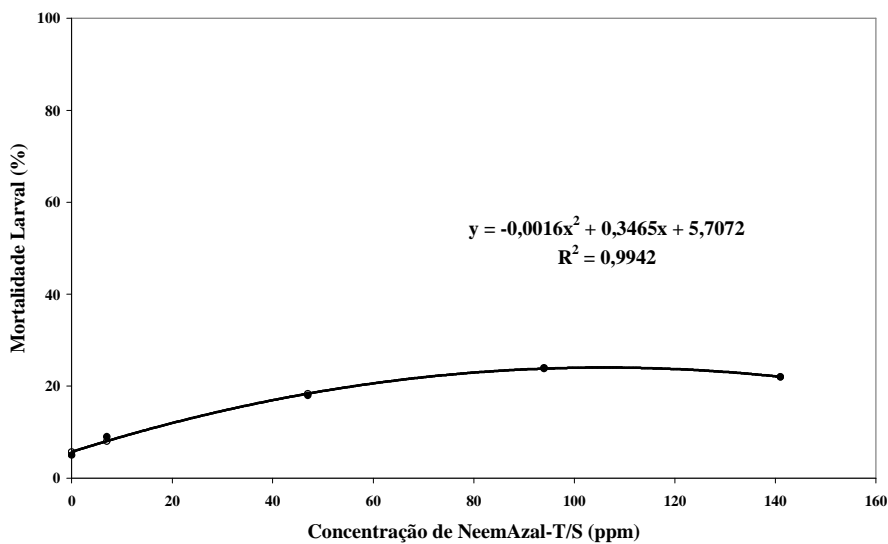


FIGURA 2: Mortalidade larval de *Ceratitis capitata* alimentadas, quando recém-eclodidas, com dieta artificial contendo as concentrações de 0,0, 7, 47, 94 e 141 ppm de NeemAzal-T/S.

Viana e Prates (2003) também constataram 100% de mortalidade larval de *S. frugiperda*, após lagartas recém-eclodidas terem sido alimentadas com folhas de milho imersas ou pulverizadas com o extrato de folhas de nim. Viana e Prates (2005) verificaram ainda que, quando lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda* foram alimentadas por somente um dia com folhas de milho tratadas com extrato de nim, ocorreu alta mortalidade (99 a 100%). Indicando que, o desenvolvimento deste inseto é afetado pelo extrato de nim, mesmo quando as lagartas foram alimentadas com folhas tratadas por um curto período de tempo. Para períodos mais longos de alimentação com folhas tratadas, lagartas com até 8 dias de idade (3º ínstar), a mortalidade ainda foi elevada (90%); no entanto, a partir dos dez dias de idade, a mortalidade decresceu acentuadamente. Isso indica que, quanto mais avançada a idade das lagartas submetidas ao tratamento, menor o efeito do extrato de nim e, conseqüentemente, o controle.

A mortalidade larval pode ter ocorrido devido ao efeito de deterrência alimentar causada pela presença do produto na dieta. A azadiractina, presente no produto, pode ter tornado o alimento impalatável impedindo sua ingestão, levando as larvas à morte por inanição. Mas a mortalidade também pode ter sido causada pela ingestão da azadiractina, já que é uma substância tóxica que afeta o inseto após a alimentação.

Martinez (2002) comenta que a azadiractina pode afetar os insetos tanto por meio da ingestão como por contato, porém, sua ação por ingestão é significativamente superior. O autor verificou que lagartas de *S. frugiperda*, pulverizadas com extrato de folhas de nim a 1% (p/v), apresentaram mortalidade de 32,2% após 10 dias, enquanto que as não pulverizadas, mas alimentadas com folhas de milho, tratadas com o mesmo extrato apresentaram 87,3% de mortalidade.

A maioria das moscas morreu após pupação, impedindo a emergência dos adultos. A mortalidade pupal também foi diretamente proporcional ao

aumento nas concentrações de NeemAzal-T/S, adicionadas à dieta da larva (Figuras 3 e 4). No primeiro experimento, das larvas que puparam emergiram somente 12,5% de adultos; na concentração de 182 ppm, 43,2%; na concentração de 108 ppm e 75%, na concentração de 5 ppm, contra 87,8%, na testemunha (Figura 3). No segundo experimento, emergiram de 71,4 a 38,8% de adultos dos tratamentos que receberam de 7 ppm a 141 ppm do produto, contra 79,2% na testemunha (Figura 4). Esses resultados demonstraram que, apesar de uma parte das larvas não ser aparentemente afetada pela ingestão de NeemAzal-T/S e atingir a fase de pupa, a viabilidade destas foi prejudicada, provavelmente pela ação da azadiractina, presente neste produto, no processo de metamorfose do inseto.

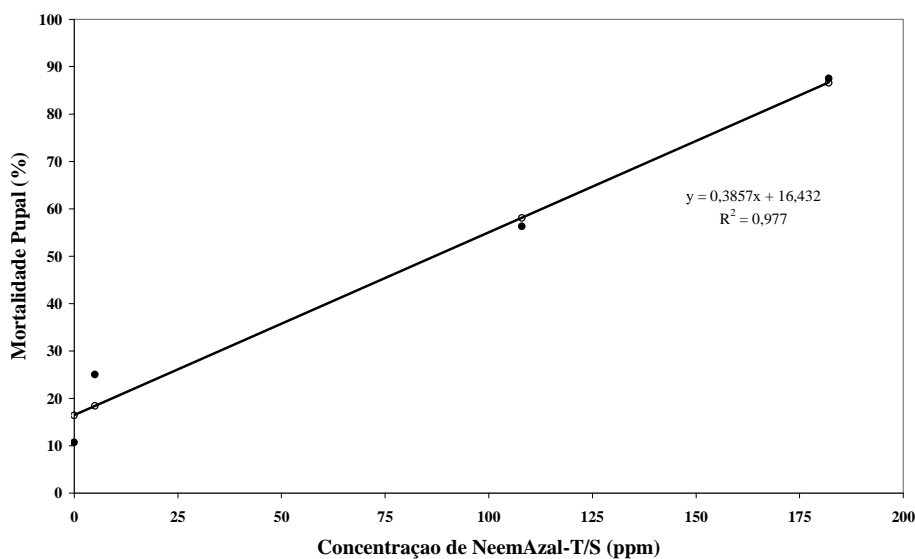


FIGURA 3: Mortalidade pupal de *Ceratitis capitata* provenientes de larvas alimentadas, quando recém-eclodidas, com dieta artificial contendo as concentrações de 0,0, 5, 108 e 182 ppm de NeemAzal-T/S.

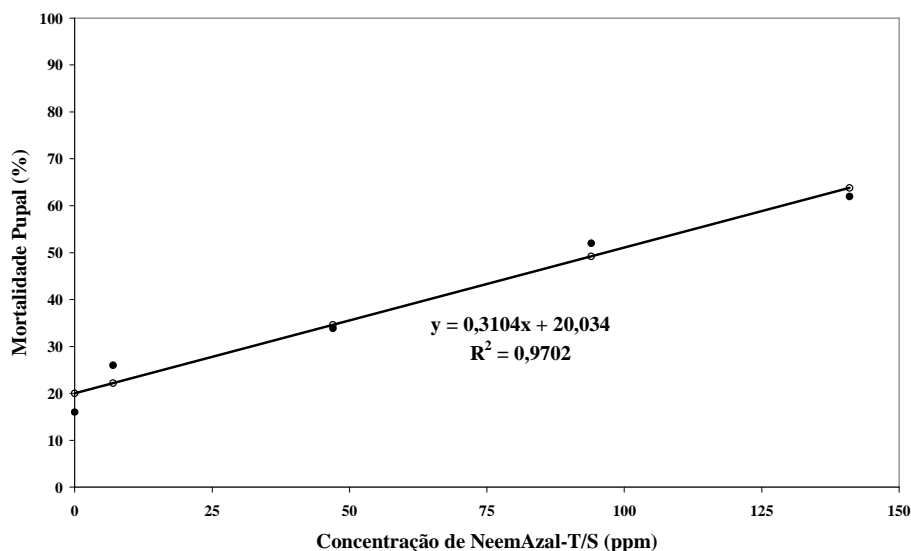


FIGURA 4: Mortalidade pupal de *Ceratitits capitata* provenientes de larvas alimentadas, quando recém-eclodidas, com dieta artificial contendo as concentrações de 0,0, 7, 47, 94 e 141 ppm de NeemAzal-T/S.

Vinuela *et al.*, (2000) verificaram que a ingestão de azadiractina (concentração 1,0 mg/i.a/L) por larvas recém-eclodidas de *C. capitata* foi altamente tóxica, impedindo a emergência de adultos. Segundo Garcia (2000), a azadiractina atua como regulador de crescimento dos insetos, inibindo-os, e interferindo na ecdise por meio da supressão do hormônio da muda, o ecdisônio. Este autor relata também que a larva não consegue efetuar a mudança de fase, ficando na fase jovem até que eventualmente morra. Ainda segundo este autor, o contato da larva com a azadiractina pode permitir a penetração deste composto através da cutícula, inibindo a síntese de quitina, provocando desidratação e morte; além disso, a ingestão deste produto com o alimento pode levar à inanição e até à morte. Conforme Ciociola Junior e Martinez (2002), o bloqueio da produção e liberação do hormônio da ecdise dos insetos pela azadiractina ocorre, pois este composto apresenta estrutura química similar ao ecdisônio. Por

essa razão, as formas jovens de insetos são mais suscetíveis. Para Da Cruz (2000), a aplicação de nim pode tornar a pupa do inseto, em condições naturais, suscetível a intempéries, pelo não endurecimento da cutícula e estabilização das estruturas proteicas desta.

3.3 Anormalidades e deformações: Parte da mortalidade da mosca esteve associada à falha na pupação. A azadiractina ingerida pelas larvas da mosca afetou a pupação, induzindo a um aumento na porcentagem de anormalidade nos pupários (pupários com tamanhos reduzidos, e outros apresentavam o tegumento amassado) e deformações nos adultos (emergência incompleta) (Figura 5). As anormalidades nos pupários foram mais expressivas no segundo experimento, quando variaram de 4% na testemunha a 18% no tratamento com concentração de 141 ppm. No primeiro experimento, esta ocorrência só se deu no tratamento com concentração de 182 ppm do produto, e foi de 7,1%. Assim, apesar das larvas terem sobrevivido à ingestão da azadiractina presente no NeemAzal-T/S, elas puparam, mas os pupários apresentaram algumas anormalidades que causaram a morte das pupas, no momento da metamorfose, antes de atingirem a fase adulta.

Para os adultos, as deformações foram numericamente maiores que as constatadas na testemunha (Figura 5). No primeiro experimento, observou-se um aumento gradativo nas deformações à medida que se aumentou a concentração de NeemAzal-T/S na dieta. Os maiores valores ocorreram nas concentrações de 108 ppm e 182 ppm, com 26,3 e 28,6%, respectivamente, em relação à testemunha que apresentou somente 6,3% de adultos deformados. No segundo experimento, a deformação de adultos também foi diretamente proporcional ao aumento na concentração do produto. Neste experimento, a porcentagem de deformação variou de 7,1% a 21,4%, ocorrendo na testemunha valor semelhante

ao constatado na concentração mais baixa do óleo adicionada no tratamento de 7 ppm.

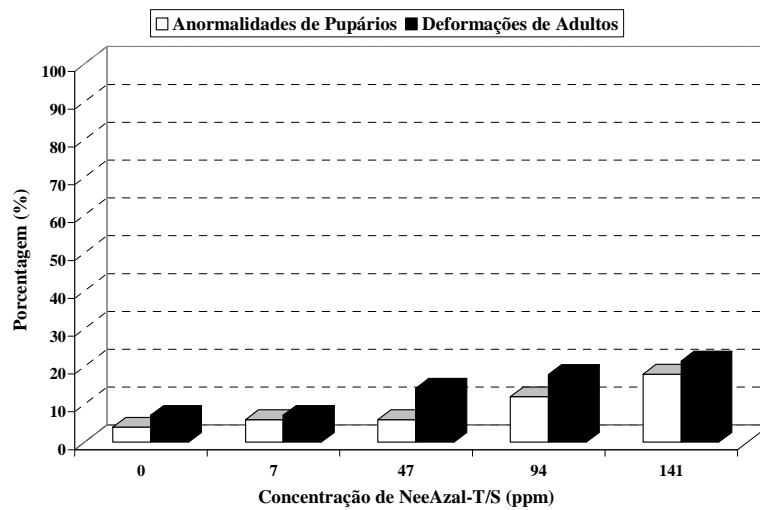
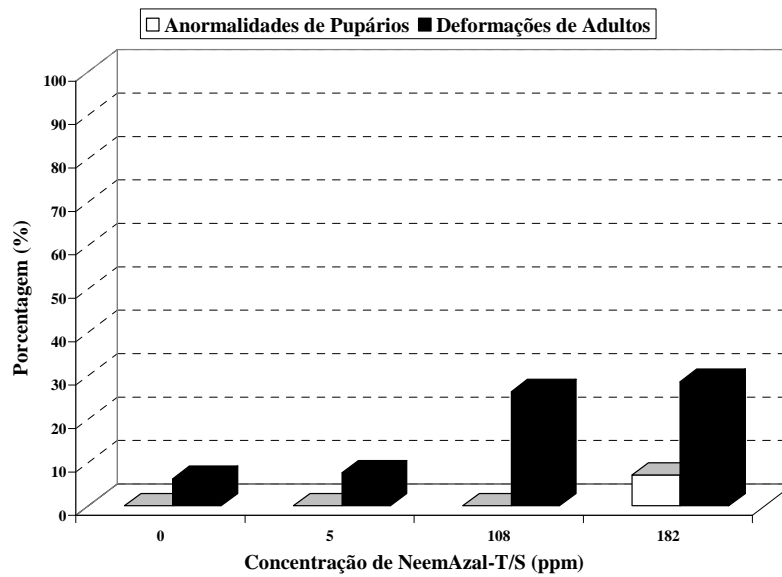


FIGURA 5: Anormalidades de pupários e deformação de adultos de *Ceratitis capitata*, provenientes de larvas alimentadas quando recém-eclodidas, com dieta artificial contendo diferentes concentrações de NeemAzal-T/S.

3.4 Fecundidade, fertilidade e longevidade de adultos: A emergência de adultos de *C. capitata* foi afetada pela alimentação das larvas nas dietas contendo diferentes concentrações do NeemAzal-T/S composto basicamente por azadiractina (Figuras 3 e 4). Essa redução foi bastante drástica na concentração de 182 ppm ou nas superiores a esta, no primeiro experimento (Figura 3). Este fato impossibilitou a obtenção de adultos, principalmente, na concentração de 339 ppm ou nas acima desta. Por esse motivo, não foram montados casais provenientes destes tratamentos. Para o tratamento 182 ppm, os casais foram montados, apesar da pequena quantidade de adultos emergidos, cerca de 10,0 %.

A azadiractina ingerida pelas larvas recém-eclodidas afetou a fecundidade, fertilidade e longevidade de adultos de *C. capitata* (Figuras 6 e 7).

A fecundidade das fêmeas foi reduzida pela ação da azadiractina (Figura 6). A redução na postura foi sendo cada vez mais drástica à medida que a concentração do inseticida botânico foi aumentada na dieta, quando comparada com a testemunha. Essas fêmeas, quando jovens, iniciaram a oviposição no sexto dia após o encontro com os machos (Figura 7). Este fato ocorreu para as fêmeas provenientes da testemunha e do tratamento com 108 ppm de NeemAzal-T/S adicionado à dieta da larva, à exceção daquelas oriundas da concentração de 5 ppm, que iniciaram a oviposição no terceiro dia após o acasalamento. As fêmeas provenientes do tratamento com 182 ppm do produto iniciaram sua oviposição somente no nono dia após o acasalamento. As fêmeas provenientes da testemunha ovipositaram continuamente até o 33º dia de vida, quando pararam de ovipositar, apesar de ainda permanecerem vivas. As fêmeas provenientes do tratamento contendo 5 ppm de NeemAzal-T/S apresentaram fecundidade aproximada à da testemunha, porém, colocaram em média menor número de ovos (Figura 6) e realizaram as posturas em intervalos maiores (Figura 7). Para os dois tratamentos com as maiores concentrações de NeemAzal-T/S, foi mantido o padrão de menor fecundidade e maior intervalo

entre as posturas, que foram maiores à medida que o volume do produto adicionado a dieta da larva foi maior.

A fertilidade dos ovos de *C. capitata* também foi afetada pela azadiractina adicionada à dieta da larva (Figura 6). Dos ovos provenientes das fêmeas oriundas do tratamento com 182 ppm de NeemAzal-T/S não emergiu nenhuma larva (viabilidade igual a 0,0%). Reduzido número de larvas também eclodiu dos ovos provenientes das fêmeas oriundas do tratamento com 108 ppm do produto, que apresentou viabilidade dos ovos de cerca de 8%, enquanto que na testemunha e na concentração de 5 ppm as viabilidades foram de 77% e 54%, respectivamente.

A longevidade dos adultos de *C. capitata* foi reduzida pela adição de azadiractina à dieta da larva (Figura 6). Os machos foram mais longevos que as fêmeas, vivendo cerca de 10 dias a mais que elas, quando se compara os tratamentos testemunha e o de 5 ppm. A adição de 5 ppm do produto à dieta da larva não afetou a sobrevivências dos adultos deste inseto, já que este tratamento foi equiparável à testemunha, tanto para machos como para as fêmeas. Entretanto, as larvas que deram origem às fêmeas parecem ter sido mais resistentes à ingestão de azadiractina, visto que se constata a ocorrência somente de fêmeas no tratamento de 182 ppm e maior longevidade destas no tratamento de 108 ppm em relação aos machos. Na concentração de 108 ppm do produto, os machos viveram em média 4,3 dias e as fêmeas 25,8 dias. Esses resultados demonstram que a azadiractina, principal componente do NeemAzal-T/S, além de reduzir o número de adultos emergidos, também reduz a reprodução dos que sobreviveram, indicando que este inseticida botânico pode reduzir a população presente no campo, influenciando as próximas gerações, comprovando o potencial da azadiractina como agente de controle de *C. capitata*.

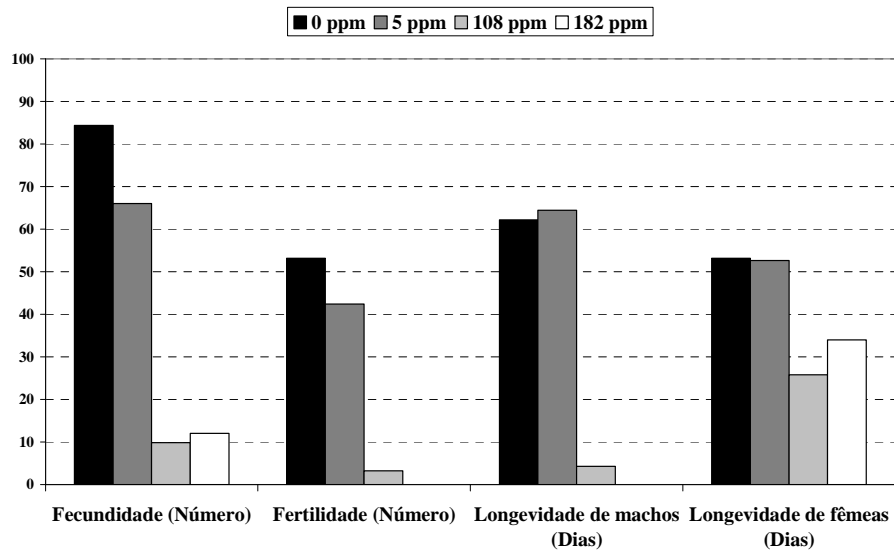


FIGURA 6: Fecundidade, fertilidade e longevidade de adultos de *Ceratitis capitata*, provenientes de larvas alimentadas, quando recém-eclodidas, com dieta artificial contendo diferentes concentrações de NeemAzal-T/S.

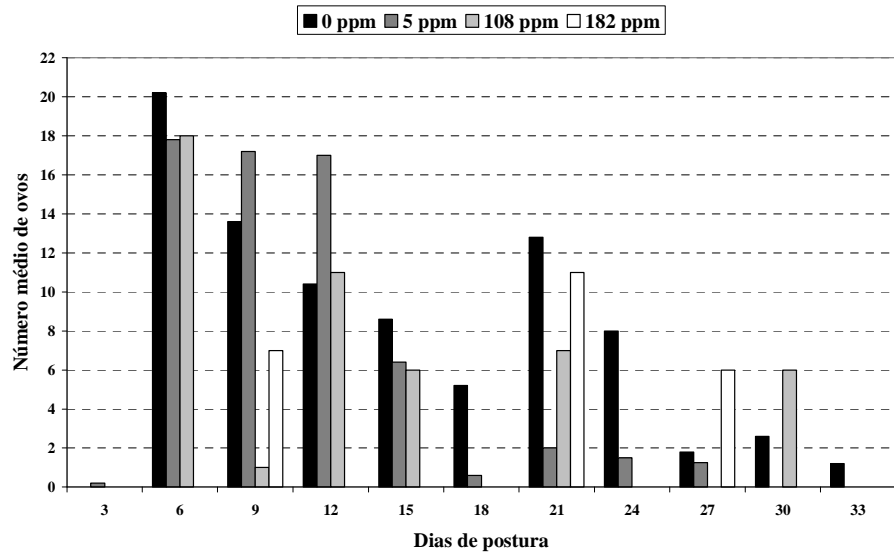


FIGURA 7: Fecundidade de adultos de *Ceratitis capitata*, provenientes de larvas alimentadas, quando recém-eclodidas, com dieta artificial contendo diferentes concentrações de NeemAzal-T/S.

Salles e Rech (1999) também registraram, para *Anastrepha fraterculus* (Wied.), redução no número de ovos e viabilidade destes, quando expuseram a ou alimentaram adultos com diferentes concentrações de torta de nim e com uma formulação de nim, respectivamente. Nakano e Romano (2002) relataram eficiência de 100% na esterilização dos adultos de *C. capitata* quando utilizaram 30 mg/L de azadiractina.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a azadiractina presente no NeemAzal-T/S, mesmo quando utilizada em baixas concentrações, afeta o ciclo biológico de *C. capitata*, podendo ser utilizado no controle deste inseto. Embasado nestes resultados e nas informações contidas nos trabalhos de Viana e Prates (2003 e 2005) e nas comprovações de Verkerk *et al.* (1998) e Gonçalves-Gervásio e Vendramim (2004), de que o óleo e os extratos de nim possuem ação translaminar, acredita-se que pulverizações realizadas com este produto em fruto no campo podem afetar as larvas da mosca-das-frutas causando mortalidade ou afetando o seu desenvolvimento.

4 CONCLUSÕES

- As maiores concentrações de NeemAzal-T/S avaliadas causam mortalidade total de larvas de *C. capitata*;
- Em menores concentrações de NeemAzal-T/S, as mortalidades larval e pupal ocorrem diretamente proporcional ao aumento da concentração de azadiractina;
- O NeemAzal alonga a fase larval e reduz a pupal;
- O NeemAzal-T/S provoca anormalidade nos pupários e deformações nos adultos;
- O NeemAzal-T/S reduz a fertilidade, fecundidade e longevidade de fêmeas da mosca.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALOUANI, A.; REHIMI, N.; SOLTANI, N. Larvicidal activity of a neem tree extract (Azadirachtin) against mosquito larvae in the Republic of Algeria. **Jordan Journal of Biological Sciences**, Zarqa, v. 2, n. 1, p. 15-22, 2009.

ALVARENGA, C. D.; GIUSTOLIN, T. A.; QUERINO, R. B. Alternativas no controle de moscas-das-frutas. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; PALLINI, A. (Coord.). **Tecnologias alternativas para o controle de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG, 2006. p. 227-252.

ARAÚJO, E. L de; ZUCCHI, R. A. Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em goiaba (*Psidium guajava* L.), em Mossoró, RN. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 73-77, 2003.

CARVALHO, R. S. **Biocontrole de moscas-das-frutas: histórico, conceitos e estratégias**. Cruz das Almas: EMBRAPA/CNPMPF, 2006. 5 p. Circular Técnica, 83.

_____.; NASCIMENTO, A. S.; MATRANGOLO, W. J. R. **Metodologia de criação do parasitóide exótico *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), visando estudos em laboratório e em campo**. Cruz das Almas: EMBRAPA/CNPMPF, 1998, 16 p.

CIOCIOLA JUNIOR, A. I.; MARTINEZ, S. S. **Nim: alternativa no controle de pragas e doenças**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002, 24 p. Boletim técnico, 67.

DA CRUZ, I. B. M. *et al.* Morfologia do aparelho reprodutor e biologia do desenvolvimento. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000, p. 55-66.

DI ILIO, V. *et al.* Effects of a neem compound on the fecundity and longevity of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, n. 1, p. 76-82, 1999.

GARCIA, J. L. M. **O nim indiano**: o bioprotetor natural. Série Agricultura Alternativa, 2000. 8 p. Apostila.

GONÇALVES-GERVÁSIO, R. de C. R.; VENDRAMIM, J. D. Modo de ação de extratos de meliáceas sobre *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 215-220, 2004.

HABIBE, T. C. *et al.* Efeito do óleo de nim, *Azadirachta indica* sobre *Ceratitis capitata* (Diptera:Tephritidae) em mamão (*Carica papaya* L.). **Papaya Brasil**: qualidade do mamão para o mercado interno. Vitória: Incaper, 2003. p.1-4.

MA, D. L.; GORDH, G.; ZALUCKI, M. P. Survival and development of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaves. **Australian Journal of Entomology**, v. 39, p. 208-211, 2000.

MARTINEZ, S. S.; EMDEN, H. F. V. Growth Disruption, Abnormalities and Mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) Caused by Azadirachtin. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 113-125, 2001.

_____. (Ed.). **O nim: *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: IAPAR, 2002. 142 p.

MORDUE (LUNTZ), A. J.; NISBET, A. J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachata indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, n. 4, p. 615-632, 2000.

NAKANO, O. ROMANO, F. C. B. Uso de reguladores de crescimento na esterilização da mosca do mediterrâneo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 1, p. 115-125, 2002.

NASCIMENTO, A. S.; CARVALHO, R. S. Manejo integrado de moscas-das-frutas. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000, p. 169-173.

NAVA, D. E. *et al.* Controle biológico de pragas de frutíferas. In: PINTO, A. de S. *et al.* (Org.). **Controle biológico de pragas**: na prática. Piracicaba: CP 2, 2006. p. 113-129.

SALLES, L. A.; RECH, N. L. Efeito de Extratos de NIM (*Azadirachta indica*) e Cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Anastrepha fraterculus* (Wied.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 5, n. 3, p. 225-227, 1999.

SCHMUTTERER, H. Potential of azadirachtin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 35, p. 271-297, 1990.

VERKERK, R. H. J. *et al.* Aphids on cabbage: tritrophic and selective insecticide interactions. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 88, p. 343-349, 1998.

VIANA, P. A.; PRATES, H. T. Desenvolvimento e mortalidade larval de *Spodoptera frugiperda* em folhas de milho tratadas com extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica*. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 1, p. 69-74, 2003.

_____.; PRATES, H. T. Mortalidade de lagarta de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas com extrato aquoso de folhas de nim *Azadirachta indica*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 4, n. 3, p. 316-322, 2005.

VINUELA, E. *et al.* Laboratory Effects of Ingestion of Azadirachtin by Two Pests (*Ceratitis capitata* and *Spodoptera exigua*) and Three Natural Enemies (*Chrysoperla carnea*, *Opius concolor* and *Podisus maculiventris*). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 165-177, 2000.

CAPITULO III - ASSOCIAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) E DE AZADIRACTINA SOBRE *Ceratitis capitata* (WIED.)

RESUMO

¹SOUZA, Hugo Ribeiro de. **Associação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) e de azadiractina sobre *Ceratitis capitata* (Wied.)**. 2010. Cap. 3. p.86-104. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a interação da azadiractina com o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* sobre *C. capitata*. Larvas recém-eclodidas foram criadas em dieta artificial contendo 12 ppm de NeemAzal-T/S (contém 10.000 ppm de azadiractina) até que atingiram o 3º ínstar larval. Com esta idade, as larvas foram imersas em 10 mL de suspensão de conídios do isolado ESALQ 1037 de *M. anisopliae*, na concentração de $1,5 \times 10^8$ conídios/mL. Efeito sinérgico dos dois agentes de controle da mosca-das-frutas somente foi observado na variável duração da fase pupal, a qual foi aumentada. O isolado ESALQ 1037 afetou significativamente a mortalidade larval (5% de mortalidade) e a pupal (64% de pupas mortas) e provocou anormalidade aos pupários de 11,7%. A azadiractina provocou significativa deformação nos adultos (16,7%). Apesar de somente ter havido interação sinérgica para a duração pupal, considera-se possível a utilização simultânea desses dois agentes de controle da mosca, já que individualmente eles causam a morte deste inseto e afeta o seu desenvolvimento.

¹ Comitê Orientador: Prof^ª. Teresinha Augusta Giustolin – DCA/UNIMONTES (orientador); Prof^ª. Adelica Aparecida Xavier – DCA/UNIMONTES (Co-orientador).

ABSTRACT

SOUZA, Hugo Ribeiro de. ***Metarhizium anisopliae* (Metsch) and azadirachtin association on *Ceratitis capitata* (Wied)**. 2010. Chapter 3. p.86-104. Dissertation (Master's degree in Plant Production in the Semi-arid) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.¹

This study was carried out in order to evaluate the interaction of azadirachtin with the entomopathogenic fungus *M. anisopliae* on *C. capitata*. New-hatched larvae were reared on artificial diet containing 12 ppm of NeemAzal-T/S (it contains 10.000 ppm azadirachtin) until they reached the larval 3rd instar. At this age, the larvae were immersed in 10 mL of conidia suspension of ESALQ 1037 isolate of *M. anisopliae*, at concentration of $1,5 \times 10^8$ conidia/mL. Synergistic effect of two control agents to fruit-fly was only observed in the pupal stage duration variable, which was increased. The ESALQ 1037 isolate significantly affected larval mortality (5% mortality) and pupal (64% of dead pupae) and caused abnormalities to puparia of 11,7%. Azadirachtin caused significant deformation in adults (16,7%). Although there have been only synergistic interaction for the duration of pupal stage, it is possible the simultaneous use of both agents to control the fly, since separately they cause the death of insect and affects their development.

¹ Guidance Committee: Prof^a. Teresinha Augusta Giustolin – DCA/UNIMONTES (Advisor); Prof^a. Adelica Aparecida Xavier – DCA/UNIMONTES (Co-advisor).

1 INTRODUÇÃO

Os programas de manejo integrado de pragas têm incentivado o uso de medidas alternativas de controle de moscas-das-frutas (ALVARENGA, 2006). Uma medida de controle a ser utilizada poderia ser o uso da azadiractina, substância encontrada em maior quantidade nas sementes da planta de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) (MORDUE (LUNTZ) e NISBET, 2000; SCHMUTTERER, 1990), planta que possui elevado potencial inseticida (CIOCIOLA JUNIOR e MARTINEZ, 2002; DA CRUZ, 2000; GONÇALVES-GERVÁSIO e VENDRAMIM, 2004). Os produtos derivados de nim têm demonstrado bioatividade à *C. capitata*. Di Ilio *et al.* (1999) constataram redução no número de ovos de *C. capitata*, esterilidade das fêmeas e redução na longevidade das mesmas, após a exposição dos adultos da mosca a concentrações de óleo de nim que variaram de 0 a 20 µL. O óleo foi diluído em água e adicionado à dieta dos adultos nas proporções de 50% e 33% do volume. Habibe *et al.* (2003) observaram mortalidade de adultos de *C. capitata* em mamão, após a aplicação de óleo de nim em frutos, caracterizando um efeito tóxico por contato.

Os fungos entomopatogênicos também podem ser uma medida alternativa no controle de moscas-das-frutas, já que são eficientes, de fácil produção e aplicação (MARQUES *et al.*, 2004).

A patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre o desenvolvimento de *C. capitata* já foi demonstrada por outros autores (ALMEIDA *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2004; GARCIA *et al.*, 1985 e 1989).

A associação do uso de fungos entomopatogênicos e de produtos derivados de nim já foi descrita na literatura para o controle de outras pragas, com resultados interessantes (ISLAM *et al.*, 2009; SHAH *et al.*, 2008).

A hipótese deste trabalho é que ocorre sinergismo entre o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* e a azadiractina, aumentando a eficiência de controle de *C. capitata*. Embasando-se nesta possibilidade, o objetivo deste trabalho foi avaliar a interação do fungo *M. anisopliae* com azadiractina sobre *C. capitata*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Criação de insetos e de Fitopatologia do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), Campus de Janaúba, MG. Para a realização deste experimento, foram utilizadas larvas de *C. capitata* obtidas de criação-estoque mantida, sob condições controladas (26 ± 1 °C, $65 \pm 10\%$ de UR e fotofase de 14 horas), no Laboratório de Criação de insetos. Um dos agentes de controle das moscas avaliado foi o NeemAzal-T/S (10.000 ppm de azadiractina), composto por um extrato concentrado de azadiractina, formulado em óleo vegetal comestível. O outro agente utilizado foi o isolado ESALQ 1037 (hospedeiro: *Solenopsis* sp., origem: Porto Alegre, RS) do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*.

Inicialmente foi preparada dieta artificial específica para larvas de *C. capitata* (CARVALHO *et al.*, 1998), composta de farelo e açúcar. Essa dieta foi dividida em lotes, sendo que, em um lote foi adicionado um volume de 11 µL de NeemAzal-T/S, para obtenção da concentração 12 ppm deste produto na dieta. Esta concentração foi estabelecida em experimento preliminar, sendo suficiente para matar 30% da população da mosca. Optou-se por utilizar neste experimento uma concentração de NeemAzal-T/S menor do que a que causou 100% de mortalidade de *C. capitata*, pois o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito associado de dois métodos de controle. Por esse motivo, as larvas foram sensibilizadas pela ingestão do produto e então expostas aos conídios do fungo, objetivando a observação *in vivo* da ação do NeemAzal-T/S associada ao fungo.

Para a adição de NeemAzal-T/S à dieta artificial, o mesmo foi misturado à água destilada utilizada no preparo da dieta. A água mais o produto foram misturados aos ingredientes secos da dieta no final do preparo da mesma. Adicionalmente, um dos lotes de dieta foi fabricado sem a adição de NeemAzal-T/S, servindo de controle. Na dieta contendo o produto e no controle foram inoculadas aproximadamente 1.000 larvas recém-eclodidas de *C. capitata*. Os recipientes plásticos (22,5 x 15,5 x 6,5 cm), contendo as dietas tratadas e não tratadas mais as larvas, foram envolvidos com filme plástico e acondicionados em BOD (26 ± 1 °C, $65 \pm 10\%$ de UR e fotofase de 14 horas). Esses recipientes foram observados diariamente, visando ao acompanhamento do desenvolvimento das larvas. Quando as larvas apresentaram o comportamento de “saltarem” (característico do 3° ínstar), foram retiradas das dietas, lavadas em água destilada e separadas para a montagem da segunda fase deste experimento. Parte das larvas alimentadas com dieta artificial contendo o NeemAzal-T/S, juntamente com parte das larvas-controle foram submetidas ao tratamento com o isolado ESALQ 1037 do fungo *M. anisopliae*, que foi o mais efetivo no controle da mosca (Capítulo I). A outra parte das larvas alimentadas com dieta contendo o produto, juntamente com parte das larvas-controle foi mantida sem tratamento com o isolado do fungo, visando ao desenvolvimento destas sem a associação dos dois agentes de controle.

Para a multiplicação dos conídios, o isolado ESALQ 1037 de *M. anisopliae* foi repicado com auxílio de uma alça de platina. Realizou-se com a alça um toque no interior do Ependof que continha os conídios e depois deu outro toque em placas de Petri (9,5 x 10,0 cm), contendo meio de cultura sólido completo MC (0,36 g KH_2PO_4 , 1,05 g $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,60 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g KCl , 10,0 g de glucose, 1,58 g de NaNO_3 , 5,0 g extrato de levedura, 20,0 g ágar e 1000 mL de água destilada), todo o procedimento de repicagem foi realizado em câmara de fluxo laminar. Este meio de cultura foi previamente

esterilizado em autoclave a 120 °C, durante 20 minutos. Após a repicagem, as placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo BOD, durante 10 dias. Transcorrido esse período, as placas foram raspadas com o auxílio de um pincel, para a obtenção dos conídios que foram adicionados em solução de água destilada mais Tween 80[®] (0,1%), visando a sua contagem em câmara de Neubauer para ajustar a concentração de $1,5 \times 10^8$ conídios/mL a ser testada.

As larvas de 3º ínstar (pré-pupa), obtidas na primeira fase deste experimento (alimentadas com dieta artificial contendo ou não NeemAzal-T/S), foram tratadas por meio da sua imersão em 10 mL da suspensão de conídios do isolado ESALQ 1037 de *M. anisopliae* na concentração de $1,5 \times 10^8$ conídios/mL, por 10 segundos. As larvas tratadas foram transferidas para copos descartáveis, contendo vermiculita umedecida, que foram fechados com tecido tipo *voil* e presos com elástico. Como testemunha, larvas de 3º ínstar foram imersas em água destilada esterilizada mais espalhante adesivo Tween 80[®] (0,1%). Os copos contendo as larvas tratadas e não tratadas com o isolado do fungo *M. anisopliae* foram mantidos em BOD (26 ± 1 °C, $65 \pm 10\%$ de UR e fotofase de 14 horas).

Três dias após a colocação das larvas de 3º ínstar nos copos contendo vermiculita, realizou-se a triagem da mesma, visando à contagem do número de larvas mortas e a ocorrência de pupas. As pupas obtidas foram individualizadas em recipientes plásticos (25 x 15 cm), objetivando obtenção de adultos.

Este experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, contendo quatro tratamentos. Cada tratamento foi constituído de um total de 100 larvas de 3º ínstar distribuídas em 10 repetições, sendo que cada repetição foi constituída por 10 larvas.

As variáveis biológicas avaliadas foram mortalidades larval e pupal, duração da fase pupal e anormalidade de pupários e deformação de adultos. As larvas, pupas e adultos mortos provenientes dos tratamentos com conídios do

isolado ESALQ 1037 foram submetidos à desinfecção externa, para a confirmação da mortalidade causada pelo fungo. Para tanto, os mesmos foram imersos em hipoclorito a 1% por 1 minuto, álcool 70% por 3 minutos e tríplice lavagem com água destilada esterilizada. As larvas, pupas e adultos mortos foram transferidos para placas de Petri forrada com papel-filtro umedecido, visando à esporulação do fungo.

Os resultados de mortalidades larval e pupal, duração de pupas e anormalidade e deformação de adultos foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A mortalidade das larvas de *C. capitata* alimentadas com dieta artificial, contendo ou não NeemAzal-T/S, antes do tratamento com conídios do isolado ESALQ 1037, foi afetada significativamente apenas pelo fator patógeno (Tabela 1). Verifica-se que, independente da adição do produto na dieta, as larvas tratadas com conídios do isolado de *M. anisopliae* apresentaram, em média, maior mortalidade (5%) que as não tratadas (0,0%).

Considerando-se a média entre os tratamentos com e sem imersão em suspensão de conídios do fungo, verifica-se que a mortalidade larval para os insetos criados com dieta com adição de NeemAzal-T/S foi semelhante aos alimentados em dieta sem adição deste óleo (Tabela 1).

Alguns autores descreveram resultados positivos dessa associação em outros insetos. Rosales (2001) observou que a associação do isolado 634 de *B. bassiana* e o ESALQ 1037 de *M. anisopliae* (concentrações de $1,0 \times 10^7$ conídios/mL e $5,0 \times 10^8$ conídios/mL) com o produto Nimkol-L, derivado vegetal de uma meliácea, (na concentração de 0,2 a 0,4% i.a.) aplicado, no mínimo, 24 horas antes da suspensão de conídios causaram até 100% de mortalidade do cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* Hagen. Constataram que, a associação destes agentes de controle foi mais eficiente do que a ação isolada de ambos. Outros produtos vegetais avaliados pelo autor, como óleo de nim (1,0 e 2,0% v/v), extrato de folhas de *M. azedarach* (1,0 e 5,0% p/v), infusão de sementes de nim (5,0% p/v), extrato de frutos verdes de *Trichilia pallida* (Swartz) (1,0 e 5,0% p/v) não foram apropriados para a associação com os fungos, principalmente o óleo de nim e o extrato de folhas de *M. azedarach* que reduziram a patogenicidade dos patógenos aos cupins.

TABELA 01 - Mortalidade da fase larval de *Ceratitis capitata* alimentadas com dieta contendo NeemAzal-T/S (concentração de 12 ppm), e tratadas no 3° ínstar com suspensão de conídios do isolado ESALQ 1037 de *Metarhizium anisopliae* (concentração de $1,5 \times 10^8$ conídios/mL).

Tratamentos	Mortalidade* (%)		Média
	Sem ESALQ 1037	Com ESALQ 1037	
Sem NeemAzal-T/S	0,0	4,0	2,0 A
Com NeemAzal-T/S	0,0	6,0	3,0 A
Média	0,0 b	5,0 a	

* Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi significativa a interação entre os agentes de controle de mosca, NeemAzal-T/S e o fungo *M. anisopliae*, para a duração da fase pupal (Tabela 2). Verifica-se que o efeito da ingestão de dieta contendo o óleo pelas larvas só foi constatado nos tratamentos sem aplicação de fungo, situação na qual as larvas que ingeriram dieta contendo NeemAzal-T/S apresentaram alongamento da fase pupal (8,8 dias), em relação às larvas alimentadas com dieta normal (8,4 dias). A patogenicidade do fungo, por outro lado, somente foi observada com as larvas alimentadas com dieta artificial sem adição do produto, situação em que a aplicação do fungo provocou alongamento da fase pupal (9,0 dias) em relação ao tratamento sem a adição de fungo (8,4 dias).

Zimmer *et al.* (2007) também relataram aumento de um dia na duração pupal de *Musca domestica* Linnaeus exposta à concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL de *M. anisopliae*. O isolado responsável por esse aumento foi o CG 34, que foi avaliado quanto a patogenicidade a este inseto. Ciociola Junior e Martinez (2002) afirmaram que a ingestão de azadiractina, composto presente na planta *A. indica*, afeta a ingestão de alimento pelo inseto causando redução na alimentação e, conseqüentemente, alongamento no seu desenvolvimento.

Alongamento na duração da fase larval também foi constatado por Martinez e Emden (2001), em lagartas de 3º ínstar de *Spodoptera littoralis* Boisduval alimentadas por dois dias com dieta artificial contendo azadiractina (de 0,01 ppm a 1,0 ppm p/v), e transferidas para dieta pura; e resultados semelhantes foram encontrados por Gonçalves-Gervásio e Vendramim (2004) em lagartas de *Tuta absoluta* (Meyrick) expostas a extrato aquoso de nim (0,5%, 1,0% e 5,0%), e por Alouani *et al.* (2009), em larvas de *Culex pipiens* (L.) expostas a CL₅₀ e CL₉₀ de azadiractina, concentrações de 0,4 mg/L e 1,3 mg/L, respectivamente.

TABELA 02 – Duração da fase pupal de *Ceratitis capitata* provenientes de larvas alimentadas com dieta contendo NeemAzal-T/S (concentração de 12 ppm), e tratadas no 3º ínstar com suspensão de conídios do isolado ESALQ 1037 de *Metarhizium anisopliae*(concentração de $1,5 \times 10^8$ conídios/mL).

Tratamentos	Duração* (dias)		Média
	Sem ESALQ 1037	Com ESALQ 1037	
Sem NeemAzal-T/S	8,4 bB	9,0 aA	8,7
Com NeemAzal-T/S	8,8 aA	9,0 aA	8,9
Média	8,6	9,0	

* Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, no desdobramento da interação, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A mortalidade das pupas de *C. capitata* provenientes de larvas alimentadas com dieta artificial, contendo ou não NeemAzal-T/S, foi afetada significativamente apenas pelo patógeno (Tabela 3). Verifica-se que, independente da adição do produto na dieta, as pupas provenientes de larvas tratadas com conídios apresentaram, em média, maior mortalidade (64%) que as não tratadas (9%).

Considerando-se a média entre os tratamentos com e sem imersão em suspensão de conídios do fungo, nota-se que a mortalidade pupal dos insetos

criados com dieta com adição de NeemAzal-T/S foi semelhante àqueles alimentados com dieta sem a adição do óleo (Tabela 3).

Islam *et al.* (2009) também constataram acréscimo na mortalidade de ovos e ninfas de *Bemisia tabaci* quando associaram óleo de nim com *B. bassiana*. Neste caso, ocorreu sinergismo entre os dois agentes, aumentando a eficiência de controle de *B. tabaci*. Para Shah *et al.* (2008), a associação *M. anisopliae* com torta de sementes de nim aumentou em 100 vezes a eficiência do fungo sobre o gorgulho da videira, *Otiorhynchus sulcatus*.

TABELA 03 - Mortalidade da fase pupal de *Ceratitis capitata* provenientes de larvas alimentadas com dieta contendo NeemAzal-T/S (concentração de 12 ppm), e tratadas no 3º ínstar com suspensão de conídios do isolado ESALQ1037 de *Metarhizium anisopliae* (concentração de $1,5 \times 10^8$ conídios/mL).

Tratamentos	Mortalidade* (%)		Média
	Sem ESALQ 1037	Com ESALQ 1037	
Sem NeemAzal-T/S	6,0	56,0	31,0 A
Com NeemAzal-T/S	12,0	72,0	42,0 A
Média	9,0 b	64,0 a	

* Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As anormalidades dos pupários de *C. capitata*, provenientes de larvas alimentadas com dieta artificial contendo ou não NeemAzal-T/S, foram afetadas significativamente apenas pelo patógeno (Tabela 4). Observa-se que, independente da adição do óleo na dieta, os pupários provenientes de larvas tratadas com conídios apresentaram, em média, maior porcentagem de anormalidades (11,7%) que os não tratados (0,0%).

Considerando-se a média entre os tratamentos com e sem imersão em suspensão de conídios do fungo, verifica-se que as anormalidades nos pupários

para os insetos criados com dieta com adição de NeemAzal-T/S foram semelhantes aos alimentados com dieta sem a adição deste óleo (Tabela 4).

TABELA 04 - Anormalidade da fase pupal de *Ceratitis capitata*, provenientes de larvas alimentadas com dieta contendo NeemAzal-T/S (concentração de 12 ppm), e tratadas no 3º ínstar com suspensão de conídios do isolado ESAQ1037 de *Metarhizium anisopliae* (concentração de $1,5 \times 10^8$ conídios/mL).

Tratamentos	Anormalidade* (%)		Média
	Sem ESALQ 1037	Com ESALQ 1037	
Sem NeemAzal-T/S	0,0	14,9	7,4 A
Com NeemAzal-T/S	0,0	8,5	4,2 A
Média	0,0 b	11,7 a	

* Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O isolado ESALQ 1037, utilizado na concentração de $2,0 \times 10^8$ conídios/mL e aplicado em larvas de 3º ínstar, também causou anormalidades aos pupários, afetando cerca de 10% destes (Capítulo I). O mesmo ocorreu com as pupas provenientes das larvas que ingeriram NeemAzal-T/S. Nesta situação, nas concentrações de 7 ppm e 47 ppm ocorreu cerca de 6% de anormalidades nos pupários (Capítulo II).

A deformação de adultos de *C. capitata* provenientes de larvas alimentadas com dieta artificial, contendo ou não NeemAzal-T/S, foi afetada significativamente pela adição deste produto (Tabela 5). Nota-se que, independente do tratamento das larvas de 3º ínstar com conídios do patógeno, os adultos provenientes de larvas alimentadas com dieta artificial contendo o óleo apresentaram, em média, maior deformação (16,7%) que as não alimentadas (2,1%).

Considerando-se a média entre os tratamentos com e sem alimentação de dieta contendo NeemAzal-T/S, verifica-se que a deformação de adultos para os

insetos provenientes de larvas tratadas com conídios do fungo foi semelhante aos insetos provenientes de larvas não tratadas (Tabela 5).

Estes resultados confirmam os obtidos em experimentos anteriores quando o NeemAzal foi ingerido por larvas de *C. capitata* e também causou deformação nos adultos (Capítulo II). Nesta situação, nas concentrações 47 ppm houve cerca de 14% de deformação. Já o isolado ESALQ 1037, concentração de $2,0 \times 10^8$ conídios/mL, causou 8,9% de deformação nos adultos, quando foi avaliado em larvas de 3º ínstar da mosca (Capítulo I).

TABELA 05 – Deformação de adultos de *Ceratitis capitata* provenientes de larvas alimentadas com dieta contendo NeemAzal-T/S (concentração de 12 ppm), e tratadas no 3º ínstar com suspensão de conídios do isolado ESAQ1037 de *Metarhizium anisopliae* (concentração de $1,5 \times 10^8$ conídios/mL).

Tratamentos	Deformação* (%)		Média
	Sem ESALQ 1037	Com ESALQ 1037	
Sem NeemAzal-T/S	0,0	4,2	2,1 B
Com NeemAzal-T/S	16,7	16,7	16,7 A
Média	8,3 a	10,4 a	

* Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, e considerando o poder de penetração translaminar dos componentes da planta nim (GONÇALVES-GERVÁSIO e VENDRAMIM, 2004), que possibilita ao produto aplicado na superfície da folha ou fruto translocar, acredita-se que a associação do NeemAzal-T-S e do patógeno pode ser uma alternativa de controle promissora. Uma vez que a aplicação do NeemAzal-T/S sobre os frutos pode afetar o desenvolvimento das larvas da mosca em seu interior, principalmente daquelas que estejam presentes logo abaixo da superfície da casca. Como esse inseto

apresenta o comportamento de abandonar os frutos na fase de pré-pupa, aquelas larvas que, porventura, sobreviveram à ação do produto, mesmo estando debilitadas, poderão ser controladas pelo fungo *M. anisopliae*. Este fungo aplicado na área de projeção da copa poderá controlar as larvas, pois mesmo sendo pouco efetivo sobre elas este patógeno se mostrou altamente patogênico às pupas deste inseto. Isso indica que este isolado, apesar de não colonizar as pré-pupas, penetrou no inseto nesta fase, mesmo sendo ela muito curta, permitindo a colonização na fase de pupa.

4 CONCLUSÕES

- A interação do fungo *M. anisopliae* com a azadiractina é significativa para a duração da fase pupal, que é alongada;
- O fungo provoca mortalidade larval e pupal e anormalidades nos pupários de *C. capitata*;
- A azadiractina provoca deformações de adultos de *C. capitata*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. E. M. *et al.* Patogenicidade de fungos e nematóide entomopatogênicos em mosca-do-mediterrâneo *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). **BioAssay**, Piracicaba, v. 2, n. 7, p. 1-7, 2007.
- ALOUANI, A.; REHIMI, N.; SOLTANI, N. Larvicidal activity of a neem tree extract (Azadirachtin) against mosquito larvae in the Republic of Algeria. **Jordan Journal of Biological Sciences**, Zarga, v. 2, n. 1, p. 15-22, 2009.
- ALVARENGA, C. D.; GIUSTOLIN, T. A.; QUERINO, R. B. Alternativas no controle de moscas-das-frutas. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; PALLINI, A. (Coord.). **Tecnologias alternativas para o controle de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG, 2006. p. 227-252.
- ALVES, S. B. *et al.* Avaliação de fungos entomopatogênicos para *Ceratitis capitata*. **Manejo Integrado de Pragas y Agroecologia**, Turrialba, v. 72, p. 31-38, 2004.
- CARVALHO, R. S.; NASCIMENTO, A.; MATRANGOLO, W. J. R. **Metodologia de criação do parasitóide exótico *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), visando estudos em laboratório e em campo**. Cruz das Almas: EMBRAPA/CNPMPF, 1998. 16 p.
- CIOCIOLA JUNIOR, A. I.; MARTINEZ, S. S. **Nim**: alternativa no controle de pragas e doenças. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 24 p. Boletim técnico, 67.
- DA CRUZ, I. B. M. *et al.* Morfologia do aparelho reprodutor e biologia do desenvolvimento. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 55-66.

DI ILIO, V. *et al.* Effects of a neem compound on the fecundity and longevity of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, n. 1, p. 76-82, 1999.

GARCIA, A. S. *et al.* Virulência de linhagens mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* em *Ceratitis capitata* (Díptera: Tephritidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 267-270, 1985.

_____. *et al.* Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* nas diferentes fases de desenvolvimento de *Ceratitis capitata* (Wied) (Diptera; Tephritidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 33, p. 17-23, 1989.

GONÇALVES-GERVÁSIO, R. de C. R.; VENDRAMIM, J. D. Modo de ação de extratos de meliáceas sobre *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 215-220, 2004.

HABIBE, T. C. *et al.* Efeito do óleo de nim, *Azadirachta indica* sobre *Ceratitis capitata* (Diptera:Tephritidae) em mamão (*Carica papaya* L.). **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória: Incaper, 2003. p. 1-4.

ISLAM, M. T.; CASTLE, S. J.; REN, S. Compatibility of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* with neem against sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*, on eggplant. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordecht, v. 134, n. 1, p. 28-34, 2009.

MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações de óleo de Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1675-1680, 2004.

MARTINEZ, S. S.; EMDEN, H. F. V. Growth Disruption, Abnormalities and Mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) Caused by Azadirachtin. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 113-125, 2001.

MORDUE (LUNTZ), A. J.; NISBET, A. J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachata indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, n. 4, p. 615-632, 2000.

ROSALES, E. A. C. **Efeito de derivados de meliáceas e fungos entomopatogênicos sobre o cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858) (Isoptera:Rhinotermitidae)**. 2001., 133p. Tese (Doutorado em Entomologia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 2001.

SCHMUTTERER, H. Potential of azadirachtin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 35, p. 271-297, 1990.

SHAH, F. A. *et al.* Neem seed cake enhances the efficacy of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of black vine weevil, *Otiiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Control**, Orlando, v. 44, p. 111-115, 2008.

ZIMMER, C. R. *et al.* Patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 16., 2007, Pelotas, RS. **Anais...** Pelotas: Faculdade de Agronomia de Eliseu Maciel, 2007.

CAPÍTULO IV - TOXICIDADE DE AZADIRACTINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.)

RESUMO

¹SOUZA, Hugo Ribeiro de. **Toxicidade de azadiractina sobre o desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)**. 2010. Cap. 4. p.105-122. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, o efeito da azadiractina sobre o desenvolvimento do fungo *M. anisopliae*, isolado ESALQ 1037. O fungo foi inoculado em meio de cultura completo contendo diferentes concentrações de NeemAzal (produto contendo 10.000 ppm de azadiractina) e incubado durante 10 dias. O NeemAzal-T/S estimulou o crescimento micelial do fungo, exceto na concentração de 182 ppm. O NeemAzal não afetou a esporulação e nem a viabilidade dos conídios de *M. anisopliae*. Portanto, a azadiractina pode ser utilizada associada ao isolado ESALQ 1037, não afetando o desenvolvimento dos fungo.

¹ Comitê Orientador: D.Sc. Prof^a. Teresinha Augusta Giustolin – DCA/UNIMONTES (orientador); Prof^a. D.Sc. Adélica Aparecida Xavier – DCA/UNIMONTES (Co-orientador).

ABSTRACT

SOUZA, Hugo Ribeiro de. **Azadirachtin toxicity on *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) development.** 2010. Chapter 4. p.105-122. Dissertation (Master's degree in Plant Production in the Semi-arid) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.¹

This study was carried out in order to evaluate *in vitro* the effect of azadirachtin on the fungus *M. anisopliae* development, ESALQ 1037 isolate. The fungus was inoculated in complete culture medium containing different concentrations of NeemAzal (products with 10.000 ppm of azadirachtin) and incubated for 10 days. The NeemAzal-T/S stimulated the mycelial growth of the fungus, except at concentration of 182 ppm. The NeemAzal did not affect the sporulation and not the viability of *M. anisopliae* conidia. Therefore, azadirachtin can be used in association with ESALQ 1037 isolate, not affecting the fungus development.

¹ Guidance Committee: Prof^ª. Teresinha Augusta Giustolin – DCA/UNIMONTES (advisor); Prof^ª. Adelica Aparecida Xavier – DCA/UNIMONTES (Co-advisor).

1. INTRODUÇÃO

Azadirachta indica A. Juss, Meliaceae conhecida como nim, possui elevado potencial inseticida (CIOCIOLA JUNIOR e MARTINEZ, 2002; DA CRUZ, 2000). A bioatividade que possui se deve, principalmente, à presença do composto azadiractina, que é um limonoide tetranortriterpenoide encontrado em grande quantidade nas sementes de nim. Azadiractina causa repelência, deterrência alimentar, redução do crescimento, interferência na metamorfose, esterilidade e anormalidades anatômicas nos insetos (MARTINEZ e EMDEN, 2001; MORDUE (LUNTZ) e NISBET, 2000).

Os fungos entomopatogênicos são considerados viáveis para o controle de insetos, devido à facilidade de produção, aplicação e eficácia (MARQUES *et al.*, 2004). Segundo Alves (1998), destacam-se como agentes biocontroladores de pragas agrícolas *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, que já demonstraram ser patogênicos a várias espécies de insetos de diversas ordens.

Estes patógenos podem ser utilizados isoladamente ou integrados a outros métodos de controle, como os inseticidas naturais de origem vegetal, feromônios, variedades de plantas resistentes a insetos, dentre outros (LOURENÇÃO *et al.*, 1993). A associação de fungos com produtos derivados do nim para o controle de pragas é um procedimento recente, podendo resultar em sinergismo, uma possibilidade considerada promissora, mas ainda pouco estudada.

Marques *et al.* (2004) estudaram o crescimento, esporulação e viabilidade de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Paecilomyces farinosus* (Wise) em meios contendo diferentes concentrações de óleo de nim. Verificaram que o óleo afetou o crescimento e a esporulação das três espécies de fungos, mas não a viabilidade dos conídios, sendo que *M. anisopliae* foi o menos sensível à ação

do óleo de nim. Pramila *et al.* (1999) identificaram efeitos inibitórios e estimulantes provocados por sete produtos comerciais à base de nim, avaliados nas concentrações de 100 ppm, 1.000 ppm e 10.000 ppm, sobre o crescimento micelial de *B. bassiana*.

Morais *et al.* (2009) estudaram o efeito do óleo de nim incorporado ao meio BDA (Batata-dextrose-ágar), concentrações de 1, 10, 100, 1.000, 10.000 e 100.000 µL/L, antes e após a autoclavagem, sobre o crescimento micelial de *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *Trichoderma harzianum* (Rifai) e *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann) Zare e W. Gams. Eles observaram que o crescimento micelial das colônias dos fungos não foi afetado pelo óleo de nim, e que as concentrações de 10.000 µL/L e 100.000 µL/L provocaram um estímulo no crescimento micelial destes agentes de controle. Shashi *et al.* (1998) não detectaram efeito significativo das altas concentrações de azadiractina sobre o fungo *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch. Landa e Bohata (1999) verificaram que dois inseticidas à base de nim não afetaram o crescimento e a germinação dos conídios do fungo *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) Brown e Smith.

Morais *et al.* (2009) relataram que a associação de produtos de origem vegetal com fungos entomopatogênicos pode aumentar a eficiência de controle de pragas e doenças de plantas, e ainda reduzir os custos e impactos ambientais. Entretanto, o efeito tóxico de tais produtos sobre o entomopatógeno precisa ser investigado, pois pode haver algum efeito tóxico do nim sobre o patógeno.

Questiona-se: A azadiractina pode afetar o desenvolvimento de *M. anisopliae*? O fungo na presença de azadiractina passa pelo processo de esporulação, normalmente, produzindo conídios viáveis? A hipótese deste trabalho é que o desenvolvimento do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* ocorre de forma normal na presença da azadiractina. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar, *in vitro*, o efeito da azadiractina no desenvolvimento do fungo *M. anisopliae*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Patologia de Insetos e de Fitopatologia do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), Campus de Janaúba, MG. Para a realização deste experimento, foi utilizado o isolado ESALQ 1037 (hospedeiro: *Solenopsis* sp., origem: Porto Alegre, RS), do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*. Utilizou-se também o produto NeemAzal-T/S (10.000 ppm de azadiractina), composto por um extrato concentrado de azadiractina, formulado em óleo vegetal comestível.

O isolado ESALQ 1037 foi multiplicado em meio de cultura completo (MC) (0,36 g KH_2PO_4 , 1,05 g $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,60 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g KCl, 10,0 g de glucose, 1,58 g de NaNO_3 , 5,0 g extrato de levedura, 20,0 g ágar e 1000 mL de água destilada), previamente esterilizado em autoclave a 120 °C por 20 minutos. Após a repicagem do fungo, as placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo BOD ($26 \pm 0,5$ °C, $65 \pm 10\%$ de UR e fotofase de 12 horas), durante 10 dias. Transcorrido esse período, adicionaram-se 20 mL da solução de água destilada mais Tween 80[®] (0,1%), com o auxílio de um pincel, os conídios foram desagregados da colônia e mantidos em suspensão para contagem em câmara de Neubauer, onde a concentração foi ajustada para $5,0 \times 10^5$ conídios/mL.

2.1 Toxicidade do NeemAzal-T/S sobre o crescimento micelial de *M. anisopliae*

Erlenmeyers contendo meio de cultura MC mais diferentes volumes de NeemAzal-T/S foram previamente preparados, visando à obtenção das concentrações de 7, 47, 94, 141 e 182 ppm deste produto. Para o preparo dos erlenmeyers, diferentes volumes de NeemAzal-T/S foram adicionados ao meio

de cultura, que foi agitado, objetivando homogeneização do produto ao meio. Como testemunha, foi preparado erlenmeyer com meio sem adição de NeemAzal-T/S. Em seguida, aproximadamente 20 mL dos meios foram vertidos em placas de Petri autoclavadas. Após o preparo destas placas, no centro delas foi inoculada uma alíquota de 4 µL da suspensão do isolado ESALQ 1037, concentração de $5,0 \times 10^5$ conídios/mL. Essas placas foram incubadas em câmara do tipo BOD ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$, $65 \pm 10\%$ de UR e fotofase de 12 horas), pelo período de dez dias. Sete e dez dias após a inoculação dos conídios procederam-se as medições dos diâmetros das colônias, sendo realizadas nos dois sentidos perpendiculares das colônias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos (concentrações de NeemAzal-T/S) mais a testemunha (sem adição do produto). Cada tratamento foi constituído por cinco repetições (placas de Petri), cada uma contendo uma alíquota da suspensão de conídios do fungo.

2.2 Toxicidade do NeemAzal-T/S sobre a esporulação de *M. anisopliae*

Para a realização deste experimento, após 10 dias da inoculação dos conídios, foi retirado um disco de 0,5 mm de diâmetro, com o auxílio de um vazador, das colônias de *M. anisopliae* crescidas em meio com diferentes concentrações de NeemAzal-T/S. O disco foi retirado da região limítrofe entre o local onde foi adicionada a alíquota da suspensão de conídios e a região de crescimento micelial. Este disco foi colocado em um tubo de ensaio, contendo 5 mL de água destilada esterilizada mais espalhante adesivo Tween 80[®] (0,1%), que foi homogeneizado em agitador magnético de tubos para liberação dos conídios. A porcentagem de esporulação dos conídios foi obtida a partir da contagem dos mesmos em câmara de Neubauer, sob microscópio de luz.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (concentrações de NeemAzal-T/S) mais a testemunha (sem adição do produto). Cada tratamento foi constituído por três repetições (discos das colônias), contendo em cada uma apenas uma colônia do fungo.

2.3 Toxicidade do NeemAzal-T/S sobre a viabilidade dos conídios de *M. anisopliae*

A viabilidade dos conídios foi avaliada observando-se a germinação dos conídios em duas situações:

2.3.1 Viabilidade dos conídios após imersão em diferentes concentrações de NeemAzal-T/S

Placas de Petri contendo o meio de cultura MC foram inoculadas com conídios do isolado ESALQ 1037 e então colocadas em câmara climatizada do tipo BOD ($26 \pm 0,5$ °C, $65 \pm 10\%$ de UR e fotofase de 12 horas), pelo período de 12 dias, visando ao crescimento e esporulação do fungo. Transcorrido esse período, as placas foram raspadas, com o auxílio de um pincel, para a obtenção dos conídios que foram adicionados em solução de água mais Tween 80[®] (0,1%). Após agitação desta suspensão, realizou-se o ajuste da concentração de $5,0 \times 10^5$ conídios/mL em câmara de Neubauer. Volumes iguais da concentração de esporos previamente ajustada foram misturados com cada uma das concentrações de 7 ppm, 47 ppm, 94 ppm, 141 ppm e 182 ppm de NeemAzal-T/S. De cada uma destas misturas foi retirada uma alíquota de 10 µL que foi adicionada em placas de Petri contendo o meio MC, sendo incubadas em BOD, pelo período de 24 horas. A viabilidade dos conídios foi obtida a partir da contagem dos 100 primeiros conídios, sob microscópio de luz.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (concentrações de NeemAzal-T/S) mais a testemunha (sem adição do produto). Cada tratamento constou de três repetições (placas de Petri).

2.3.2 Viabilidade dos conídios após crescimento em meio contendo diferentes concentrações de NeemAzal-T/S

Para a realização deste experimento, utilizaram-se as placas contendo as colônias do isolado ESALQ 1037 crescidas, por 10 dias, em meio MC tratado com diferentes concentrações de NeemAzal-T/S (Item 2.1). Neste experimento, adotou-se o mesmo procedimento de raspagem e contagem dos conídios, visando também a obtenção da concentração de $5,0 \times 10^5$ conídios/mL (Item 2.3.1.). Da mesma forma que o realizado no Item 2.3.1, foi retirada uma alíquota de 10 μ L que foi adicionada em placas de Petri contendo o meio de cultura ágar-água. As placas foram incubadas em BOD ($26 \pm 0,5$ °C, $65 \pm 10\%$ de UR e fotofase de 12 horas), pelo período de 24 horas. A viabilidade dos conídios foi obtida a partir da contagem dos 100 primeiros conídios, sob microscópio de luz.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (concentrações de NeemAzal-T/S) mais a testemunha (sem adição do produto). Cada tratamento constou de três repetições (placas de Petri).

Os resultados obtidos sobre o crescimento micelial, esporulação e viabilidade dos conídios foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento micelial do isolado ESALQ 1037 de *M. anisopliae* foi significativamente estimulado pela azadiractina presente no produto NeemAzal-T/S, nas concentrações de 47 e 94 ppm, adicionadas ao meio de cultura MC e avaliados aos sete e dez dias após a inoculação dos conídios (Tabela 1).

Sete dias após a inoculação do isolado, nas medições dos diâmetros das colônias realizadas nesta data, todos os tratamentos, à exceção daquele crescido na concentração de 182 ppm do produto, apresentaram diâmetros da colônia significativamente maiores que a testemunha (Tabela 1). O tratamento 182 ppm apresentou diâmetro da colônia semelhante ao da testemunha e dos tratamentos 7 ppm e 141 ppm.

Na avaliação realizada aos dez dias após a inoculação, verifica-se que, a colônia-testemunha cresceu equiparando-se também ao tratamento com 7 ppm de NeemAzal-T/S, uma vez que aos sete dias a testemunha também se assemelhava ao tratamento de 182 ppm (Tabela 1).

TABELA 1 – Crescimento micelial do isolado ESALQ 1037 de *Metarhizium anisopliae* em meio de cultura contendo diferentes concentrações de NeemAzal-T/S.

Concentração de NeemAzal-T/S (ppm)	Diâmetro da colônia (cm)	
	Com 7 dias	Com 10 dias
0	2,4 c	3,5 b
7	2,7 ab	3,9 ab
47	3,0 a	4,2 a
94	3,0 a	4,2 a
141	2,8 ab	4,1 a
182	2,6 bc	3,8 ab
CV (%)	6,35	6,81

* Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise do crescimento total das colônias de todos os tratamentos demonstra que os micélios cresceram mais rapidamente sobre o meio de cultura nos tratamentos contendo 47 ppm e 94 ppm de NeemAzal-T/S, proporcionando maior diâmetro a estas colônias (Tabela 1). Este fato foi constatado nas avaliações realizadas aos sete e dez dias. O tratamento que mais se aproximou destas duas concentrações foi o de 141 ppm; entretanto, seu crescimento foi relativamente mais lento, à exceção dos três últimos dias, antes da colônia atingir o décimo dia de idade. Nesta situação, esta colônia apresentou crescimento relativamente mais rápido que as demais. Os tratamentos com 7 ppm e 182 ppm de NeemAzal-T/S, apesar de terem, nas datas de avaliações, apresentado crescimento total das colônias numericamente maiores que a testemunha, foram muito semelhantes a ela.

Nos tratamentos 47 ppm e 94 ppm, os micélios do isolado ESALQ 1037 cresceram de forma semelhante entre si e em média mais rapidamente que os

demais. O crescimento micelial do isolado nestes tratamentos foi mais rápido nos sete primeiros dias. Para os demais tratamentos, inclusive para a testemunha, o crescimento das colônias foi mais rápido nos três últimos dias. Essa diferença observada no período de maior crescimento micelial do isolado ESALQ 1037 pode ter razões distintas, para cada um dos tratamentos, mas todas estão relacionadas à concentração de azadiractina utilizada. No tratamento com 7 ppm parece não ter sido suficiente para estimular o crescimento do micélio, já no tratamento com 182 ppm, pode ter inibido o crescimento micelial do fungo, pois o crescimento micelial foi semelhante à testemunha. Para os tratamentos com 47 ppm e 94 ppm do produto, onde o crescimento micelial foi mais rápido, nos sete primeiros dias de desenvolvimento, a azadiractina parece ter estado nas concentrações ideais para estimular o fungo. Depois dos sete dias, este produto pode ter perdido sua capacidade de estimular o fungo devido a uma degradação natural do produto. Nesta situação, os micélios passaram a crescer mais lentamente, voltando as colônias a terem crescimento normal, semelhante à testemunha. Esta hipótese pode ser comprovada quando se analisa o tratamento com 141 ppm, que no período correspondente aos três últimos dias de experimentação, quando provavelmente a concentração da azadiractina já estava menor, seus micélios passaram a apresentar maior crescimento. Este fato pode ser constatado pelo maior diâmetro apresentado por esta colônia no final da experimentação.

O estímulo no crescimento micelial do fungo provocado pela azadiractina presente no NeemAzal-T/S, constatado neste trabalho (Tabela 1) também foi observado por Moraes *et al.* (2009). Esses autores constataram que o óleo de nim, Quinabra-lote 06010Y, incorporado ao meio de cultura BDA não afetou o crescimento micelial das colônias dos fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *T. harzianum* e *L. lecanii* em nenhuma das concentrações avaliadas.

Observaram, inclusive, que este produto estimulou o crescimento micelial destes fungos, nas concentrações de 10.000 µL/L e 100.000 µL/L.

Estes resultados sugerem que o NeemAzal-T/S, nas concentrações testadas pode aumentar a eficiência do isolado ESALQ 1037 de *M. anisopliae*, favorecendo o crescimento das colônias quando expostas a este produto. Todavia, efeito adverso do óleo de nim sobre o crescimento micelial de fungos entomopatogênicos já foi constatado. Marques *et al.* (2004), por exemplo, averiguaram que o óleo de nim (NIM-IGO) testado sobre o isolado E9 de *M. anisopliae*, adicionado em meio de cultura BDA, reduziu o crescimento da colônia deste fungo. Esses autores avaliaram 11 concentrações que partiram de 5% até 0,0048%. As concentrações intermediárias corresponderam à metade da concentração anterior. Verificaram que as colônias expostas a concentrações maiores que 0,039% foram inibidas, mas o crescimento micelial não foi afetado nas concentrações menores.

O NeemAzal-T/S não afetou a esporulação do isolado ESALQ 1037, nas diferentes concentrações avaliadas (Tabela 2). Resultado semelhante foi constatado por Marques *et al.* (2004), quando avaliaram diferentes concentrações de NIM-IGO sobre *M. anisopliae*, que reduziu a produção de conídios proporcionalmente ao aumento das concentrações utilizadas.

TABELA 2 – Esporulação do isolado ESALQ 1037 de *Metarhizium anisopliae*, provenientes de colônias desenvolvidas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de NeemAzal-T/S.

Concentração de NeemAzal-T/S (ppm)	Número de conídios/mL
0	10 x 10 ⁷ a
7	9,5 x 10 ⁷ a
47	9,9 x 10 ⁷ a
94	10 x 10 ⁷ a
141	9,7 x 10 ⁷ a
182	9,6 x 10 ⁷ a
CV (%)	6,9

* Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A viabilidade dos conídios mantidos em contato direto com NeemAzal-T/S foi afetada significativamente pelas diferentes concentrações deste produto (Tabela 3). Em relação à testemunha, somente o tratamento contendo 141 ppm de NeemAzal-T/S reduziu significativamente a viabilidade dos conídios do isolado, com 90% dos conídios viáveis. Os demais tratamentos apresentaram valores de viabilidade semelhante à testemunha, que variaram de 90,6% a 95,6%.

A viabilidade dos conídios provenientes das colônias crescidas nos meios contendo diferentes concentrações de NeemAzal-T/S não foi afetada significativamente pelo produto (Tabela 3). As viabilidades dos conídios foram altas para todos os tratamentos e variaram de 97,7% a 99,0%.

Estes resultados indicam que, apesar da germinação ter sido menor significativamente em relação à testemunha, ainda apresentou 90% dos conídios viáveis o que pode ser considerado um alto valor de viabilidade.

Com isso podemos presumir que existe uma possibilidade de aplicar os conídios do isolado ESALQ 1037 misturados ao produto NeemAzal-T/S na calda de aplicação no campo, mas para isso novos estudos devem ser realizados.

Marques *et al.* (2004) também verificaram que o óleo de nim exposto aos conídios de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *P. farinosus* não afetou a viabilidade destes, sendo o *M. anisopliae* o menos sensível à ação do óleo.

TABELA 3 – Germinação de conídios do isolado ESALQ 1037 de *Metarhizium anisopliae* mantido em suspensão na presença do NeemAzal-T/S e de conídios obtidos de colônias desenvolvidas na presença de diferentes concentrações deste produto.

Concentração de NeemAzal-T/S (ppm)	Germinação (%)	
	Conídios em contato com azadiractina (%)	Conídios produzidos em meio de cultura contendo a azadiractina (%)
0,0	95,6 ab	99,0 a
7	93,6 abc	98,0 a
47	95,8 a	97,7 a
94	92,8 abc	98,0 a
141	90,0 c	98,0 a
182	90,6 bc	97,7 a
CV (%)	2,75	1,42

* Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Estes resultados demonstraram que o produto NeemAzal-T/S pode ser utilizado associado ao fungo no controle de *C. capitata*, já que não demonstrou efeito adverso sobre o crescimento micelial, esporulação e viabilidade dos conídios. Isto sugere que existe um grande potencial na utilização conjunta destes dois agentes de controle, visto que existe a possibilidade dos conídios do fungo serem veiculados à calda de aplicação do NeemAzal-T/S, sem que haja redução na germinação dos conídios.

4 CONCLUSÕES

- O NeemAzal-T/S, nas concentrações testadas, não afeta o crescimento micelial do isolado ESALQ 1037 de *M. anisopliae*, inclusive estimula o seu crescimento;
- A associação de NeemAzal-T/S com o isolado ESALQ 1037 não afeta a esporulação dos conídios e nem sua viabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.B. Fungos Entomopatogênicos. In ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba, FEALQ, 1998. p. 289-381.

CIOCIOLA JUNIOR, A. I.; MARTINEZ, S. S. **Nim**: alternativa no controle de pragas e doenças. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 24 p. Boletim técnico, 67.

DA CRUZ, I. B. M. *et al.* **Morfologia do aparelho reprodutor e biologia do desenvolvimento**. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 55-66.

LANDA, Z.; BOHATA, A. Compatibility of entomogenous fungus *Paecilomyces fumosoroseus* with natural insecticides based on azadirachtin and neem oil. **Collection of Scientific Papers: Series for Crop Sciences**, Ceske Budejovice, v. 16, n. 2, p. 99-106, 1999.

LOURENÇÃO, A. L. KUMATSU, S. S.; ALVES, S. B. Controle de *Sitophilus zeamais* em Milho com *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e Pirimifos Metil. **Ecosistema**, Espírito Santo do Pinal, v. 18, p. 69-74, 1993.

MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações de óleo de Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1675-1680, 2004.

MARTINEZ, S. S.; EMDEN, H. F. V. Growth Disruption, Abnormalities and Mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) Caused by Azadirachtin. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 113-125, 2001.

MORAIS, L. A. S. *et al.* Efeito de diferentes concentrações do óleo de nim (*Azadirachta indica*) no crescimento micelial de fungos entomopatogênicos e *Trichoderma harzianum*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 113-117, 2009.

MORDUE (LUNTZ), A. J.; NISBET, A. J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, n. 4, p. 615-632, 2000.

PRAMILA, G. A. M. *et al.* Studies on compatibility of white muscardine fungus *Beauveria bassiana* with some neem products. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 52, n. 3, p. 278-280, 1999.

SHASHI, S. *et al.* Compatibility of *Beauveria brongniartii* with pesticides and organic manures. **Pesticide Research Journal**, v. 10, n. 2, p. 251-253, 1998.