

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

ALINE CRISTINA PEREIRA DA ROCHA

**Determinação da dose de radiação gama esterilizante pela
avaliação dos parâmetros biológicos de machos de *Ceratitis
capitata* (Diptera: Tephritidae), linhagem *ts/* – Vienna 8**

Piracicaba

2011

ALINE CRISTINA PEREIRA DA ROCHA

**Determinação da dose de radiação gama esterilizante pela
avaliação dos parâmetros biológicos de machos de *Ceratitis
capitata* (Diptera: Tephritidae), linhagem *ts/* – Vienna 8**

**Dissertação apresentada ao Centro de
Energia Nuclear da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

**Área de Concentração: Energia Nuclear na
Agricultura e no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. Julio Marcos Melges
Walder**

Piracicaba

2011

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Rocha, Aline Cristina Pereira da

Determinação da dose de radiação gama esterilizante pela avaliação dos parâmetros biológicos de machos de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), linhagem *ts/* – Vienna 8 / Aline Cristina Pereira da Rocha; orientador Julio Marcos Melges Walder. - - Piracicaba, 2011.

55 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Controle biológico 2. Fruticultura 3. Mosca-das-frutas 4. Proteção de plantas I. Título

CDU 632.939.1:535-36

Dedico,

à minha mãe Adeilde Rocha e à minha irmã Amanda Rocha,
pelo carinho, compreensão (com relação a minha
ausência), e amor que sempre me proporcionaram.

Ao meu “namorado” Leandro D. Geremias,
por todo carinho, apoio, amor, incentivo, preocupação e
dedicação (destacando as ajudas nas horas que mais precisei
para executar os experimentos), o que foram essenciais
para conseguir essa vitória.

Ofereço,

às pessoas que, cordialmente, ajudam
as outras sem esperar recompensa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida, guiando-me e dando coragem para seguir em frente.

Ao meu orientador, Prof. Julio Walder, pela amizade, atenção, confiança, incentivo, paciência, pelas palavras otimistas quando foi necessário, por ter dado soluções quando apareceu algum problema, enfim, MUITO OBRIGADA por tudo, Professor.

Ao CENA/USP, pelo excelente Programa de Pós-graduação, e por me proporcionar a oportunidade de se tornar mestre em Ciências.

A CPG/CENA, a secretaria de Pós-graduação e a bibliotecária chefe STB-CENA por toda atenção e solidariedade.

A CNEN (Comissão Nacional de Energia Nuclear) pela concessão da bolsa de mestrado, tornando possível a realização e conclusão deste trabalho.

Aos meus estimados amigos de laboratório pela ajuda e agradável companhia em todos os momentos, Aline Kamiya, Kenya Faggioni, Karen Costa, Fernanda Lima, Patricia Sanches, Adrise Nunes, Queliabe, Charlotte e Thiago Mastrangelo. Os dias ficavam muito melhores ao lado de vocês.

Aos técnicos do laboratório, Lia e Luís, pela assistência laboratorial em tudo que foi necessário, fazendo com que os experimentos estivessem sempre sendo executados em dia. A Lia agradeço também, pelos conselhos (profissionais e pessoais), amizade, carinho e pela ajuda extra (na condução dos experimentos). Muito obrigada mesmo!

A Mestre e amiga Renata Morelli, pela paciência, atenção, pelos vários conhecimentos compartilhados e por estar comigo em vários momentos, fazendo as coisas acontecerem.

Aos laboratórios de Biologia de Insetos, e de Acarologia Agrícola, do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP. Agradeço imensamente aos professores responsáveis, Prof. Dr. José Roberto Postali Parra e Prof. Dr. Gilberto José de Moraes, por, atenciosamente, terem permitido eu realizar parte dos experimentos em seus respectivos laboratórios; e a toda a equipe dos mesmos, pois sempre foram muito agradáveis e prestativos; obrigada, principalmente, aqueles que acima de tudo se tornaram meus amigos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Francisquine Delgado, do LAFA do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, por, gentilmente, ter permitido utilizar aparelhos do laboratório durante a execução dos experimentos. Um agradecimento especial as suas orientadas, Gislaine e Paula, pelo carinho, pelas ótimas conversas e por terem se tornado minhas amigas.

Aos meus avós, Paulo e Alderina, os quais sempre me ajudaram de todas as maneiras.

Aos meus padrinhos Adenilde e Isac, e meus primos queridos Paulo Alexandre, Iane Raquel e, especialmente, Caio César, pela amizade, atenção, conselhos e ótimas risadas.

A todos os parentes que sempre estiveram torcendo pra que tudo desse certo, transmitindo energias positivas através de conversas, mensagens etc.

A todos os meus amigos! Agradeço, em especial, a Mari Zério, Agostín, Daniell, Karlinha, Tiago Costa Lima, Alexandre Menezes, Kamyła, Hudson e Tarcio; pois mesmo quando estão longe, se fazem presentes. Obrigada por todos vocês terem me cativado e se tornado tão especiais pra mim.

Enfim, a todas as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram nesta caminhada.

“Não são os mais aptos nem os mais inteligentes os que sobrevivem,
mas os que se adaptam melhor às mudanças.”

- Charles Darwin -

“Crescimento significa mudança, e toda mudança implica risco de
passar do conhecido ao desconhecido.”

- George Shinn -

RESUMO

ROCHA, A. C. P. da. **Determinação da dose de radiação gama esterilizante pela avaliação dos parâmetros biológicos de machos de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), linhagem *tsl* – Vienna 8**. 2011. 55 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

A linhagem *tsl* (*temperature sensitive lethal*) - Vienna 8 da espécie *Ceratitis capitata*, por apresentar mutações que facilitam a criação e a liberação de apenas machos estéreis no campo, vem sendo utilizada em programas de controle da mosca-do-mediterrâneo com o uso da técnica do inseto estéril. O objetivo deste trabalho foi determinar a dose de radiação gama que proporciona o maior índice de esterilidade para machos da espécie *C. capitata* - linhagem *tsl* – Vienna 8, avaliando seus parâmetros biológicos que indicam a qualidade dos machos estéreis a serem liberados. Pupas marrons (machos) da linhagem *tsl*, provenientes da criação do laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia do CENA/USP, foram submetidas à radiação gama (^{60}Co) 24 horas antes da emergência nas doses de 0, 30, 60, 90 e 120 Gy. A determinação da dose esterilizante foi baseada na fertilidade de fêmeas sexualmente maduras, da linhagem bissexual e não irradiadas, acasaladas com machos dos diferentes tratamentos. A coleta dos ovos foi realizada diariamente por 6 dias, sendo possível contabilizar e estimar a fecundidade, e obter a taxa de eclosão. A determinação da porcentagem de emergência e da capacidade de voo seguiram o protocolo de controle de qualidade do manual da FAO/IAEA/USDA (2003). Para avaliar a longevidade sob estresse nutricional, os insetos ficaram um período de 48h após a emergência na ausência de água e alimento, e após este período, a mortalidade foi registrada. O tamanho dos testículos (esquerdo e direito) foi obtido ao dissecar machos irradiados e não-irradiados no 8º dia de vida, e mensurar os testículos em uma ocular micrométrica, considerando os maiores comprimento e largura de cada amostra. Para determinar o número de espermatozoides foi necessário dissecar os machos e romper seus testículos. Não houve diferença na taxa de emergência, capacidade de voo e longevidade entre machos irradiados e não-irradiados, e nem na fecundidade das fêmeas acasaladas com os machos dos diferentes tratamentos. A dose esterilizante que resultou na menor fertilidade das fêmeas foi de 120 Gy, com 1,5% de eclosão. Considerando os parâmetros de porcentagem de emergência, capacidade de vôo, longevidade sob estresse, e a esterilidade recomendada para a técnica do inseto estéril que consiste em, aproximadamente, 99% dos ovos serem inviáveis, a dose esterilizante a ser utilizada é a de 120 Gy. O tamanho dos testículos e o número de espermatozoides foram afetados pela radiação, havendo diferença entre os tratamentos. Os machos irradiados com 120 Gy apresentaram uma redução de cerca de 25% no tamanho dos testículos, comparando com os do controle (0 Gy). Os testículos dos machos normais continham uma média de 41910 espermatozoides, e esse valor foi decrescendo ao aumentar a dose de radiação, de maneira que machos irradiados com 120 Gy tinham um número médio de 27921 espermatozoides, e isto, possibilita a recomendação do uso de macho transgênico para controle de *C. capitata*.

Palavras-chave: Radiação gama. Criação massal. Mosca-do-mediterrâneo. Macho estéril. Controle de qualidade.

ABSTRACT

ROCHA, A. C. P. da. **Determination of the dose of gamma radiation sterilization for assessment of biological parameters of male *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), *tsl* - Vienna 8 strain.** 2011. 55 f. Thesis (Masters) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

The Vienna-8, *tsl* (temperature sensitive lethal) strain of *Ceratitis capitata*, by presenting mutations that facilitate the mass rearing and release only of sterile males in the field, has been used in medfly SIT (Sterile Insect Technique) programmes. The objective of this study was to determine the radiation dose that provides the highest level of sterility for Vienna-8, *tsl* males assessing their biological parameters that indicate the quality of sterile males to be released. Brown pupae (males) of the *tsl* strain were obtained from the mass rearing of the Food Irradiation and Radioentomologia laboratory of CENA/USP, and they were irradiated (with gamma radiation - ^{60}Co) 24 hours before the emergence at rates of 0, 30, 60, 90 and 120 Gy. The determination of the sterilizing dose was based on fertility of sexually mature females of the bisexual strain and not irradiated, mated with males of different treatments. Eggs were collected daily during 6 days, were counted and it was possible to estimate fecundity, and assess the hatching rate. The emergence and flight ability were determined by following the protocol of quality control manual for FAO/IAEA/USDA (2003). To assess the longevity under nutritional stress, the insects were kept a period of 48 h after emergence in the absence of water and food, and after this period, mortality was recorded. The size of the testes (left and right) was obtained by dissecting irradiated and non-irradiated males at the eighth day of life, and measure the testes in an ocular micrometer, considering the maximum length and width of each sample. To determine the sperm number was necessary to dissect the males and break their testicles. No difference was observed in emergence rate, flight ability and longevity of irradiated and non-irradiated males, nor in the fecundity of females mated with males of different treatments. The sterilizing dose that resulted in lower fertility of females was 120 Gy, with 1.5% hatching. Considering the parameters of emergence, flight ability, longevity under stress and sterility recommended for the sterile insect technique which consists of approximately 99%, the sterilizing dose to be used is 120 Gy. The size of the testes and the sperm number were affected by radiation. Males irradiated with 120 Gy presented a reduction about 25% in size of the testes, compared with the control (0 Gy). The testes of normal males contained an average of 41.910 sperm, and this value was decreased by increasing the dose of radiation, so that males irradiated with 120 Gy had a median of 27.921 sperm, and this allowed to recommend the use of GM male to control *C. capitata*.

Keywords: Gamma radiation. Mass rearing. Mediterranean fruit fly. Sterile male. Quality control.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 <i>Ceratitis capitata</i>	12
2.1.1 Distribuição geográfica e biologia.....	12
2.1.2 Linhagem <i>ts/</i> – Vienna 8.....	14
2.2 Uso da radiação ionizante no controle de insetos	16
2.3 Controle de qualidade de mosca-do-mediterrâneo estéril	21
2.4 Testículos e espermatozoides	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Aspectos gerais da criação (linhagem <i>ts/</i> – Vienna 8)	25
3.2 Efeito da radiação na fertilidade (Radioesterilização)	26
3.3 Controle de Qualidade dos machos irradiados	28
3.3.1 Efeito da radiação na porcentagem de emergência e na habilidade de voo	28
3.3.2 Efeito da radiação na longevidade sob estresse nutricional.....	29
3.3.3 Tamanho dos testículos	30
3.3.4 Número de espermatozoides	30
3.4 Análise estatística	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Radioesterilização	32
4.2 Fecundidade média das fêmeas acasaladas com machos irradiados e não-irradiados	34
4.3 Parâmetros biológicos	35
4.3.1. Porcentagem de emergência e habilidade de voo	35
4.3.2. Longevidade sob estresse nutricional	37
4.3.3 Tamanho dos testículos	38
4.3.4 Número de espermatozoides	41
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

As moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) estão entre as pragas mais importantes do mundo devido aos seus impactos econômicos diretos (a oviposição das fêmeas e a alimentação das larvas tornam os frutos e produtos hortícolas impróprios para comercialização e consumo) e as restrições quarentenárias impostas por muitos países para evitar sua entrada (ALUJA, 1994; FOLLETT; NEVEN, 2006; ALUJA; MANGAN, 2008).

No Brasil, as moscas-das-frutas de importância econômica pertencem aos gêneros *Anastrepha* Schiner, *Ceratitis* Macleay, *Bactrocera* Macquart e *Rhagoletis* Loew (ZUCCHI, 2000). O gênero *Ceratitis*, no Brasil, está representado apenas pela espécie, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), e de acordo com Zucchi (2001) ela está associada a mais de 58 espécies de plantas hospedeiras. É uma praga polífaga, de importância mundial, atacando mais de 250 tipos de frutas, amêndoas e outras partes vegetais (GONG et al., 2005).

Tanto a espécie *C. capitata* quanto outras moscas-das-frutas são alvos de supressão em larga escala, erradicação ou programas de controle preventivo baseados na Técnica do Inseto Estéril (TIE) (KOYAMA et al., 2004).

A TIE é um método de controle biológico bastante visado por não afetar o ambiente e consiste em liberar insetos estéreis no campo para competirem no processo de acasalamento com os selvagens férteis.

Esta técnica vinha sendo utilizada para controlar *C. capitata*, com a liberação tanto de machos como fêmeas estéreis, o que acarretava danos nos frutos pelo ato de oviposição e diminuição da probabilidade de cópula entre machos estéreis e fêmeas selvagens (PARANHOS, 2005). Para aumentar a eficiência do controle, geneticistas e entomologistas da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), da Áustria, desenvolveram a linhagem *ts1* – Vienna 8, a qual possui duas mutações genéticas: uma é a diferenciação na cor da pupa (pupa marrom=macho, pupa branca=fêmea), e a outra é a sensibilidade letal à temperatura, possibilitando a eliminação de embriões fêmeas com um choque térmico de 34 °C. Ambas as mutações facilitam a criação e a liberação de apenas machos estéreis no campo, contribuindo também com significativa redução de custos do processo (FRANZ; KERREMANS, 1993).

Na região nordeste do Brasil foi implantada a Biofábrica Moscamed Brasil (BMB) em Juazeiro-BA, com a finalidade de realizar a TIE dentro de um programa de Manejo Integrado de Pragas. A localização da Biofábrica é devida o Vale do Submédio São Francisco (abrangendo, principalmente, os municípios de Juazeiro e Paulo Afonso, na Bahia; e Petrolina, Ouricuri e Serra Talhada, em Pernambuco) ser considerado o maior pólo de fruticultura irrigada no país, tendo como principais culturas a uva e a manga, as quais são produzidas durante todo o ano e são alvos dos ataques por *C. capitata*. Há necessidade de realizar o controle deste inseto-praga, uma vez que a referida região é responsável por cerca de 90% da produção de uva de mesa do país (FNP CONSULTORIA E INFORMAÇÕES EM AGRONEGÓCIOS, 2010), exportando, principalmente, para os Estados Unidos e países da União Européia (AGROSOFT, 2010).

O Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia do CENA/USP recebeu da FAO/IAEA, em dezembro de 2004, a linhagem *ts/* – Vienna 8, para fazer a adaptação as condições de Brasil e manter permanentemente um banco genético dessa linhagem para fornecer a BMB.

Esta linhagem foi repassada para a BMB, no entanto, apesar do sucesso da TIE depender de uma boa metodologia de criação massal, de nada valerá se, ao final do processo, a dose de radiação ionizante (gama) utilizada para esterilizar os machos não for adequada, resultando em perda de qualidade biológica dos insetos liberados.

1.1 OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo determinar a dose de radiação gama que proporciona o maior índice de esterilidade para machos da espécie *C. capitata* - linhagem *ts/* – Vienna 8, avaliando seus parâmetros biológicos que indicam a qualidade dos machos estéreis a serem liberados nos programas de supressão populacional pelo uso da Técnica do Inseto Estéril.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Ceratitis capitata*

2.1.1 Distribuição geográfica e biologia

O gênero *Ceratitis* é composto por cerca de 65 espécies que ocorrem principalmente na África tropical. A espécie *C. capitata*, conhecida também como mosca-do-mediterrâneo (moscamed), encontra-se distribuída em quase todas as áreas tropicais e temperadas quentes do mundo (ZUCCHI, 2000). Esta mosca-das-frutas foi constatada no Brasil pela primeira vez por Ihering (1901) e, atualmente, está amplamente distribuída em todo o país (ZUCCHI, 2001) e isto se deve, em especial, ao grande número de hospedeiros utilizados como substrato para o desenvolvimento de suas larvas (MALAVASI et al., 2000).

Selivon (2000) relata que a distribuição geográfica de uma espécie de mosca-das-frutas está intimamente relacionada à distribuição dos hospedeiros que ela tem capacidade de usar como alimento.

Os insetos da família Tephritidae são insetos holometabólicos com ciclo de vida composto pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto (SOUZA FILHO et al., 2003).

Os ovos das moscas-das-frutas apresentam coloração branco-leitosa, são fusiformes, em algumas espécies são encurvados, e o tamanho pode variar de uma espécie para outra (GALLO et al., 2002). As larvas são do tipo vermiforme, sem pernas torácicas e abdominais, sem cápsula cefálica, brancas-creme e ápodas (MORGANTE, 1991 citado por FREIRE, 2007; SALLES, 2000). O desenvolvimento larval ocorre através de três instares, que podem ser caracterizados pelo aspecto dos ganchos bucais (MORGANTE, 1991 citado por FREIRE, 2007).

O adulto de *C. capitata*, dentre os tefritídeos, é um dos menores, medindo de 4 a 5 mm de comprimento e de 10 a 12 mm de envergadura; tem coloração predominantemente escura, tórax preto na face superior, com desenhos simétricos brancos; abdome amarelo com duas listras amarelas sombreadas (GALLO et al., 2002). O macho se distingue das fêmeas por apresentar na cabeça um par de apêndices bem distintos denominados de cerdas, as quais são alongadas e tem uma

estrutura em formato de espátula na ponta (FÉRON, 1962 citado por HUNT et al., 2002) e por possuírem abdômen desprovido de ovipositor.

Segundo De Araújo (2000), a duração do ciclo das moscas-das-frutas está diretamente relacionada com a temperatura, normalmente, diminuindo em temperaturas mais altas e aumentando em temperaturas mais baixas. Ovos, larvas e adultos têm desenvolvimento influenciado, principalmente, pela temperatura do ar, enquanto que a pupa, pela temperatura do solo. Duyck e Quilici (2002) observaram que a espécie *C. capitata* apresentou como limites inferiores de desenvolvimento 9,9, 8,9 e 9,2 °C, para as fases de ovo, larva e pupa, respectivamente. E o limite superior foi de 35 °C para as fases de ovo e pupa; e as larvas tiveram uma mortalidade de 95% nesta mesma temperatura. Estes mesmos autores afirmam que as altas taxas de sobrevivência de *C. capitata* em uma ampla faixa de temperatura (15-30 °C) podem explicar sua extensa distribuição em diferentes zonas climáticas.

Segundo Aluja (1994), o ciclo de vida das moscas-das-frutas, de maneira geral, ocorre da seguinte forma: uma fêmea fecundada insere o ovipositor no fruto e deposita seus ovos, dos quais eclodem as larvas que se alimentam da polpa do fruto até completar seu desenvolvimento; nesse momento, que pode ou não coincidir com a queda do fruto, as larvas abandonam e penetram no solo para se transformarem em pupas; depois de alguns dias, os adultos emergem dos pupários e, ao atingirem a maturidade sexual, darão início a um novo ciclo (Figura 1).

Em estudo realizado por Arita (1982) foi verificado que machos de *C. capitata* são reprodutivamente maduros perto do momento em que eles emergem, apesar de não atingirem a maturidade sexual até 48h depois da emergência. As fêmeas, por outro lado, mostraram-se sexualmente maduras em 48h, mas não foram reprodutivamente maduras até 4 dias de idade. Liedo et al. (2002) avaliaram o efeito da idade da mosca na sua propensão para acasalar, observando tanto moscas selvagens quanto as criadas em laboratório. As observações mostraram que a idade ideal para acasalamento variou entre 7-13 dias para moscas selvagens contra 3-5 dias para as da criação massal.

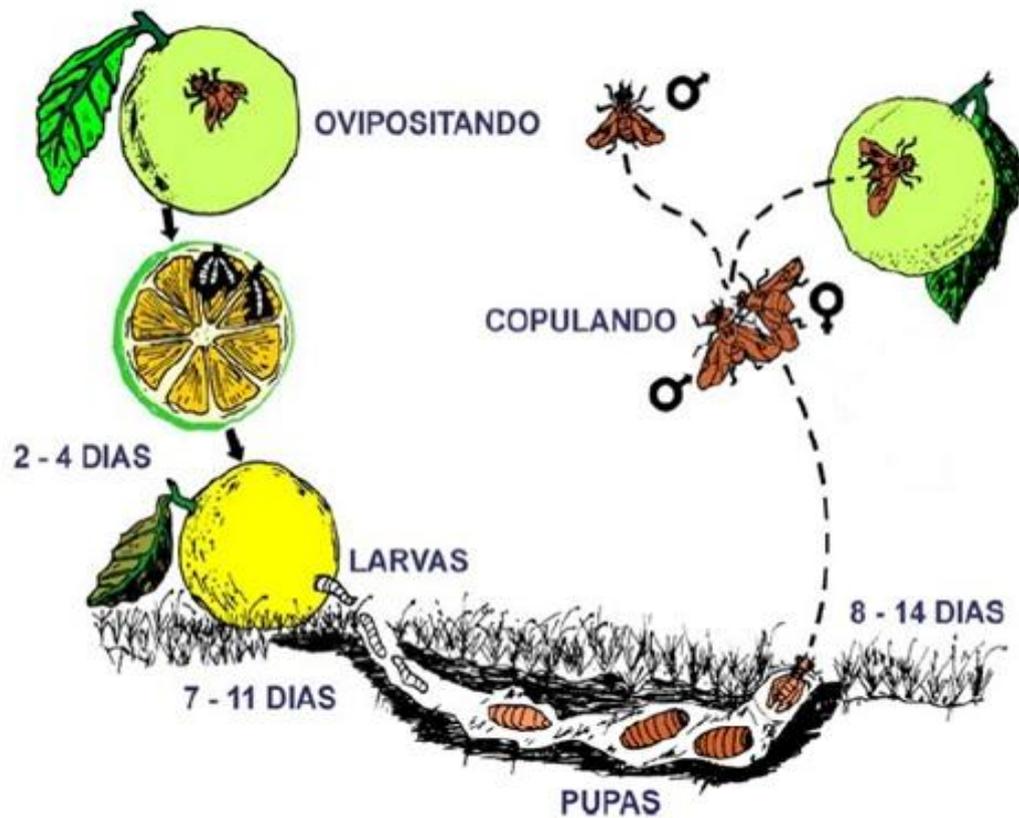


Figura 1 – Esquema do ciclo de vida de *C. capitata* (WALDER, 2002)

De acordo com Fletcher (1989), o número de ovos que uma fêmea de *C. capitata* é capaz de ovipositar durante o seu ciclo de vida varia entre 300 a 1000 ovos. Gallo et al. (2002) afirmaram que fêmeas de *C. capitata*, podem ovipositar cerca de 800 ovos durante seu ciclo de vida. E no que se refere à frequência de postura, geralmente, é maior no início do período de oviposição e decresce com a idade da fêmea (MARTINS, 1986 citado por FREIRE, 2007)

2.1.2 Linhagem *ts/* – Vienna 8

Inicialmente insetos selvagens eram coletados no campo e colonizados para sua utilização na TIE. Entretanto, com o avanço dos conhecimentos da genética, das espécies em questão e da biologia molecular, novas estratégias foram desenvolvidas, permitindo manipular certas características biológicas para gerar novas linhagens mais eficientes para a TIE. Uma destas linhagens possibilitou a

produção de somente machos, que são os indivíduos que contribuem para a indução da esterilidade no campo. Esta linhagem apresentava uma mutação (*wp* – *white pupae*) cujas fêmeas emergiam de pupas brancas, diferentemente dos machos que provinham de pupas marrons (WHITTEN, 1969). Desta forma, foi possível separar as fêmeas antes da emergência e liberar apenas machos estéreis no campo. Robinson et al. (1986) verificaram que a liberação apenas de machos aumentou a frequência de acasalamento entre machos estéreis e fêmeas selvagens de 50 a 100%, em testes realizados em gaiolas de campo.

Mais recentemente, foram desenvolvidas linhagens de mosca-do-mediterrâneo, a moscamed (*Ceratitis capitata*), que permitem a separação dos machos de fêmeas em suas fases de embrião. Estas linhagens são conhecidas como linhagens de sexagem genética, GSS (*Genetic Sexing Strain*), e estão embasadas em uma translocação recíproca entre o cromossomo que determina o sexo masculino e o autossoma que transporta o marcador ou a mutação utilizada para construir o sistema de sexagem (RÖSSLER, 1979a; ROBINSON; VAN HEEMERT, 1982; KERREMANS; FRANZ, 1994).

A linhagem de sexagem genética para *C. capitata* leva como mutações a sensibilidade letal à temperatura, *tsl* (*temperature sensitive lethal*) (FRANZ et al., 1996), e a cor branca do pupário, *wp* (*white pupae*) (RÖSSLER, 1979b), que são aplicadas em programas de diferentes países que usam a TIE como principal ferramenta para o controle desta mosca (ROBINSON et al., 1999). O mapeamento genético do cromossomo 5 permitiu determinar que a mutação *tsl* encontra-se no braço direito deste cromossomo (FRANZ; KERREMANS, 1993; KERREMANS; FRANZ, 1994) e está localizada muito próxima da mutação *wp*, usada como marcador durante o processo de criação. Os machos carregam uma translocação entre o cromossomo Y e o autossomo de número 5 e são heterozigotos para estes marcadores ao passo que as fêmeas têm o cariótipo normal e são homozigotas para estas mutações. A separação dos sexos é realizada mediante a exposição dos ovos desta linhagem a uma temperatura de 34 °C por 24 h (FISHER; CACERES, 2000; CACERES et al., 2000). Como a mutação *wp* está posicionada muito perto, a ausência de indivíduos homozigotos para *wp* depois do tratamento térmico pode ser usada para verificar que o processo de aniquilação de fêmeas é eficiente e a linhagem mantém sua configuração apropriada. A mutação *wp* é, pois, usada como

marcador para determinar se a *ts/* está atuando como mutação discriminante do sexo.

Existem cerca de cinco linhagens *ts/* desenvolvidas pelos geneticistas da FAO/IAEA, na Áustria: Vienna 4, Vienna 6, Vienna 7, Vienna 8 e Sargeant sempre com o intuito de melhorar a produtividade na criação massal e diminuir a recombinação gênica (ROBINSON et al., 1999; CACERES, 2002).

2.2 Uso da radiação ionizante no controle de insetos

A radiação ionizante é bastante utilizada para a esterilização de insetos. A irradiação causa rupturas em cromossomos das células germinativas, levando a mutações letais dominantes nos espermatozoides e nos óvulos (LaCHANCE et al., 1967; CURTIS, 1971). Este tipo de radiação é oriundo de radioisótopos como Cobalto-60 ou Césio-137, de elétrons gerados por aceleradores ou de raios-X gerados por feixe de elétrons (WALDER, 2000).

De acordo com Bakri et al. (2005a), um dos principais propósitos da aplicação da radiação ionizante em insetos é o controle de pragas através da TIE.

A TIE é um método de controle de uma população de insetos em que um grande número de insetos esterilizados, e da mesma espécie, é liberado sobre uma área para reduzir a população nativa da praga através do acasalamento com os insetos selvagens férteis (KNIPLING, 1955; MORRISON et al., 2009).

Esta técnica é utilizada em vários países para o controle, supressão e até mesmo erradicação de moscas-das-frutas e outras pragas da agricultura, pecuária e saúde pública. O emprego da TIE minimiza a utilização contínua de inseticidas, não é agressiva ao ambiente e se adéqua aos padrões de segurança alimentar. Benedict e Robinson (2003) relataram que as principais vantagens da TIE consistem em ela ser ambientalmente amigável, específica (atinge uma espécie em particular), compatível com outros métodos de controle e sua eficácia aumenta à medida que ocorre o declínio da população alvo.

Segundo Walder (2000), a introdução desta técnica no controle de pragas contribuiu para o desenvolvimento e até mesmo a criação de novas áreas entomológicas tais como a de criação de insetos em meios artificiais (produção

massal), ecologia e simulação populacional, controle de qualidade, radioentomologia, dentre outras.

Embora teorizada na década de 30 por E. F. Knipling, a primeira aplicação com sucesso da TIE (BAUMHOVER et al., 1955) consistiu na erradicação da mosca da bicheira (*Cochliomyia hominivorax*) da ilha de Curaçao, o que só foi possível após anos de pesquisas para viabilizar sua criação massal por meios artificiais (MELVIN; BUSHLAND, 1941) e determinar sua dose de radiação esterilizante (BUSHLAND; HOPKINS, 1953).

Para a espécie *C. capitata*, o primeiro teste de campo com insetos estéreis foi realizado entre 1950-1960, no Havaí, durante 13 meses, sendo realizadas liberações semanais, reduzindo a população selvagem inicial em 90% em média (STEINER et al., 1962 citado por NASCIMENTO et al., 2008). E dentre os programas de erradicação e/ou supressão populacional de *C. capitata* destaca-se o Programa *Moscamed* realizado no México e na Guatemala, e mais recentemente o Programa *Moscafrut* no México, além dos programas de erradicação do Chile e da região de Mendoza, Argentina (WALDER, 2002).

Doses de radiação para atingir 99,9% da esterilidade de machos liberados foram determinadas para as pupas de: *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (BUSHLAND; HOPKINS, 1953); *A. ludens* (RHODE et al., 1961); *A. fraterculus* (Wiedemann) (GONZÁLEZ et al., 1971); *C. capitata* (Wiedemann) (HOOPER, 1972; OHINATA et al., 1977; ZUMREOGLU et al., 1979; WILLIAMSON et al., 1985); mosca-das-frutas do Caribe, *A. suspensa* (Loew) (BURDITT et al., 1975); e *A. serpentina* (TOLEDO, 1992).

A variação na dose esterilizante pode ocorrer entre ordens, famílias, gêneros da mesma família e também para uma mesma espécie (Tabela 1). Neste último caso, provavelmente, varia em resposta a fatores como: diversidade genética da espécie nos diferentes ecossistemas; condições de alimentação; dieta; peso dos insetos; fatores físicos envolvidos durante o processo de irradiação (temperatura, umidade, atmosfera, tipo de radiação, irradiação contínua ou fracionada) e até mesmo fatores humanos (manuseio dos insetos, principalmente, na fase de pupa, e interpretação dos dados) (BAKRI et al., 2005a). Este mesmo autor cita como exemplo que, dentro da família Tephritidae, a dose de radiação relatada para a esterilização de *Ceratitidis* é semelhante à *Bactrocera*, mas duas vezes maior que a relatada para o gênero *Rhagoletis*. E geralmente, para as moscas do gênero

Anatrespha as doses aplicadas são menores que para *C. capitata* (LIEDO; CAREY, 1996; ALUJA et al., 2000 citados por TOLEDO et al., 2004).

Tabela 1 – Doses de radiação gama utilizadas para causar a esterilidade em machos de moscas-das-frutas, em diferentes locais e programas

Espécie	Dose esterilizante (Ref. bibl.)	Países
<i>C. capitata</i>	40 Gy (SHOUKRY, 1974)	Egito
<i>C. capitata</i>	150 Gy (SHELLY, 2000)	EUA (Havaí)
<i>C. capitata</i> (GSS – Cast 191)	118,5 Gy (VERA et al., 2003)	Argentina
<i>C. capitata</i> (GSS – Seib 6-96)	125 Gy (VERA et al., 2003)	Argentina
<i>C. capitata</i>	100-145 Gy (BAKRI et al., 2005b)	Guatemala
<i>C. capitata</i>	120 Gy (BAKRI et al., 2005b)	Chile
<i>C. capitata</i>	100 Gy (BAKRI et al., 2005b)	México; Portugal
<i>C. capitata</i> – (tsl- Vienna 7)	150 Gy (SHELLY et al., 2005)	EUA (Havaí)
<i>A. suspensa</i>	50 Gy (WALDER; CALKINS, 1993)	EUA (Flórida)
<i>A. ludens</i>	70-116 Gy (THOMAS; LOERA-GALLARDO, 1998)	Mexico
<i>A. fraterculus</i>	70 Gy (ALLINGHI et al., 2007)	Argentina
<i>A. fraterculus</i>	70 Gy (KAMIYA, 2010)	Brasil
<i>A. obliqua</i>	40 Gy (TOLEDO et al., 2004)	Mexico
<i>B. cucurbitae</i>	60-80 Gy (KOYAMA et al., 2004)	Japão
<i>B. zonata</i>	90 Gy (SHEHATA et al., 2006)	Egito
<i>B. philippinensis</i>	67-74 Gy (RESILVA et al., 2007)	Filipinas

Hendrichs et al. (2002) e Kraaijeveld e Chapman (2004) realizaram um estudo sobre o comportamento de acasalamento da mosca-do-mediterrâneo, no contexto da técnica do inseto estéril, e concluíram que, embora os machos estéreis possam entrar e competir nas agregações de acasalamento (*lek sites*), transferir esperma e induzir as fêmeas à reação refratária e esterilidade na descendência, eles são claramente menos competitivos do que os selvagens.

O processo de irradiação, as condições de criação massal e os anos que uma estirpe é mantida em laboratório, parecem causar alterações comportamentais (CAYOL, 2000). Gavriel et al. (2009) afirmam que a irradiação e o processo de

criação massal não afetam apenas no comportamento, mas também na fisiologia dos insetos, o que implica em uma baixa competitividade dos mesmos.

Em particular, altas doses de radiação causam redução no desempenho de machos estéreis, comparando com machos não irradiados (MORENO et al., 1991; LUX et al., 2002a); porém, no que se refere às condições de criação massal e ao número de gerações em que uma linhagem foi mantida em laboratório, são fatores que podem ou não ter um efeito sobre desempenho sexual dos machos estéreis e outras características relacionadas (MORENO et al., 1991; CAYOL, 2000; LUX et al., 2002b).

Segundo Robinson (2002a), insetos que recebem uma dose muito baixa não são suficientemente estéreis e os que recebem uma dose muito alta podem não ser competitivos no acasalamento com fêmeas selvagens no campo. Isto reduz a eficácia do programa de controle o que exige um maior número de insetos estéreis a ser liberado para compensar estas possíveis falhas no processo de irradiação.

Fisher (1997) afirmou que aumentar a dose de radiação de forma a obter índices acima de 99% de inviabilidade dos ovos reduz, drasticamente, a competitividade de acasalamento dos machos. No entanto, gestores de vários programas da TIE ainda demandam doses que possam proporcionar 99,5% de esterilidade, mesmo implicando em redução da qualidade dos insetos e obtendo apenas um ganho marginal em esterilidade (ROBINSON et al., 2002; FAO/IAEA/USDA, 2003).

Outro fator importante é a idade em que a pupa é submetida à radiação ionizante. Por isso, os tefritídeos, normalmente, devem ser irradiados 24-48h antes da emergência. Irradiar pupas nas fases iniciais de seu desenvolvimento é altamente prejudicial à qualidade do inseto, uma vez que a ação da radiação num momento de alta atividade metabólica é a causa das alterações morfológicas durante o processo de metamorfose (HOOPER, 1972). Pupas irradiadas antes dessa idade (24-48h) tendem a originar moscas de baixa qualidade, indicando que os tecidos somáticos foram negativamente afetados (FLETCHER; GIANNAKAKIS, 1973). Para a mosca-do-mediterrâneo, a cor do pigmento dos olhos do inseto, ainda no interior do pupário, é um indicador bastante confiável para saber o momento adequado de irradiar as pupas (RUHM; CALKINS, 1981; SEO et al., 1987).

Devido às várias afirmações, se torna indispensável irradiar as pupas na idade correta e estudar a melhor dose que deve ser aplicada para cada espécie, ou

seja, aquela que não afete negativamente o desempenho dos machos estéreis liberados, possibilitando alcançar um alto nível de indução de esterilidade na população do campo.

Devido a estes efeitos colaterais que a radiação esterilizante pode causar nos insetos a serem liberados, recentemente, alguns estudos começaram a ser realizados, propondo o uso da tecnologia transgênica como uma ferramenta para induzir esterilidade em populações do campo sem a necessidade de utilizar a radiação. Alphey e Andreasen (2002) afirmaram que a motivação para desenvolver linhagens transgênicas é o fato da radiação ser a maior causa da reduzida eficiência dos insetos liberados em campo.

Esterilidade molecular por transgenia, de maneira semelhante à esterilidade induzida pela radiação, baseia-se na expressão de um gene "letal dominante" no zigoto produzido após o acasalamento de machos estéreis e fêmeas selvagens. No entanto, existem diferenças entre os dois sistemas, sendo elas: a esterilidade induzida pela radiação é baseada no cromossomo, enquanto a molecular é nos genes (ROBINSON et al., 2004). Na transgenia, os insetos não são considerados estéreis, mas possuem o gene letal dominante que será expresso em todos os zigotos fertilizados pelos machos liberados, motivo pelo qual esta variação da TIE é chamada de "Release of Insects Carrying a Dominant Lethal" (RIDL) (THOMAS et al., 2000), e no caso da radiação, o macho carrega em seus espermatozoides uma coleção de vários rearranjos cromossômicos, onde cada um age de forma independente para matar o zigoto e, conseqüentemente, ocorrerá esterilidade nas fêmeas fertilizadas (ROBINSON et al., 2004).

Thomas et al. (2000) relatam que as principais vantagens da RIDL, comparando com a TIE, são os custos de produção reduzidos e a vantagem dos machos transgênicos poderem apresentar um desempenho melhor que os irradiados.

2.3 Controle de qualidade de mosca-do-mediterrâneo estéril

O sucesso do programa da TIE depende de uma boa qualidade dos insetos criados massalmente (WALDER; CALKINS, 1993). A habilidade dos machos estéreis em copular e inseminar fêmeas selvagens, não deixando descendentes, determina a efetividade da TIE (WHITTIER et al., 1994; WHITTIER; KANESHIRO, 1995).

Robinson et al. (2002) afirmaram que machos estéreis tem características fenotípicas e comportamentais competitíveis com machos selvagens, favorecendo ao uso da TIE como ferramenta de controle e, a partir deste estudo, foi desenvolvido o Manual sobre “Controle de qualidade do produto e procedimentos de envio de moscas-das-frutas estéreis criadas massalmente”, Versão 5.0 (FAO/IAEA/USDA, 2003).

Protocolos de controle de qualidade (CQ), para a mosca-do-mediterrâneo, são um componente muito importante para os programas de TIE e os machos da linhagem *ts/* – GSS – também estão sujeitos as rigorosas orientações do CQ (ROBINSON, 2002b).

As avaliações dos machos estéreis são realizadas através de procedimentos científicos padronizados e permitem analisar suas implicações no sucesso da TIE (TAYLOR et al., 2001; FAO/IAEA/USDA, 2003).

Muitos dos protocolos destinam-se à viabilidade pupal e à emergência de machos voadores (provenientes das pupas viáveis) (ROBINSON, 2002b), além da longevidade sob estresse, onde os insetos adultos ficam sem alimento e sem água. Estes são alguns dos parâmetros utilizados como uma medida de qualidade das moscas estéreis (FAO/IAEA/USDA, 2003). Ainda, de acordo com este manual, as duas estatísticas mais importantes são as porcentagens de emergência e de insetos voadores, embora a análise da longevidade sob estresse sirva como um indicador dos aspectos gerais associados ao processo de criação das larvas (dieta, densidade larval, ou qualquer fator que possa afetar a habilidade do inseto de armazenar reservas de gordura nas fases de larva e pupa).

Para todos os parâmetros de controle de qualidade, existem valores padronizados e considerados aceitáveis, variando de acordo com a espécie em estudo e, para a *C. capitata*, os valores podem variar entre as linhagens bissexual e *ts/* (FAO/IAEA/USDA, 2003).

2.4 Testículos e espermatozoides

Normalmente, para monitorar os níveis populacionais de moscas-das-frutas, os insetos estéreis são marcados com pigmentos fluorescentes antes da liberação para permitir uma posterior identificação. O monitoramento em campo é realizado com o uso de armadilhas e as moscas capturadas, usualmente, são levadas ao laboratório para determinar sua origem (se é selvagem ou estéril), usando lâmpadas UV (BARTOLUCCI et al., 2006). No entanto, existem os casos de haver pouco corante fluorescente em moscas que foram marcadas, sendo necessário retirar e esmagar a cabeça da mosca, e verificar vestígios do pigmento através de um microscópio de fluorescência, recurso este, muito caro e delicado (quanto à sua utilização). Robinson et al. (2004) afirmam que, além do processo de uso de corantes fluorescentes ser ineficiente e caro, ainda tem um impacto negativo sobre os insetos estéreis e a saúde dos trabalhadores em uma criação massal.

Devido aos fatores mencionados, se torna evidente a necessidade de usar outras ferramentas para confirmar a origem do inseto. É importante se fazer uma identificação correta do *status* da mosca, tendo em vista que isto pode levar à iniciação de novos procedimentos na área onde as capturas foram feitas.

Atualmente, uma técnica bastante útil para este tipo de monitoramento em campo é a distinção dos insetos férteis e irradiados através da dissecação dos mesmos para observar os órgãos genitais e avaliar os danos que a radiação produziu nas gônadas (ovários e/ou testículos).

Estudos envolvendo os efeitos da radiação ionizante nas gônadas de moscas-das-frutas foram realizados com: fêmeas e machos de *C. capitata* (SHOUKRY et al., 1974; ABDEL-MALEK et al., 1975); fêmeas de *A. suspensa* (WALDER; CALKINS, 1992); fêmeas e machos de *A. fraterculus* (BARTOLUCCI et al., 2006); e machos de *B. zonata* (SHEHATA et al., 2006).

No caso da espécie *C. capitata* – linhagem *ts1* – Vienna 8, é importante a análise dos efeitos da radiação nos testículos, já que apenas machos são liberados em campo.

Em geral, o sistema reprodutor dos machos de moscas-das-frutas é composto por um par de testículos, vasos deferentes e vesículas seminais, um ducto ejaculatório, vários pares de glândulas acessórias, uma “bomba” de esperma, uma

glândula edeagal e um edeago (Figura 2A). Os testículos apresentam forma oval e cor amarela (BARTOLUCCI et al., 2006). Segundo Valdez (2001), esta cor é bastante intensa, homogênea sobre toda a superfície, e a intensidade não varia de uma espécie pra outra.

Abdel-Malek et al. (1975); Shehata et al. (2006); Bartolucci et al. (2006) afirmaram que a redução gradual no tamanho dos testículos de machos irradiados depende da dose de radiação e acentua com a idade da mosca. Abdel-Malek et al. (1975) encontraram que machos de *C. capitata*, irradiados com doses de 60 e 80Gy (as duas doses mais altas utilizadas no trabalho), apresentaram testículos com tamanho cerca de 2/3 menor que os de machos não-irradiados (controle), no 8º dia de vida dos insetos.

A pupa é a fase do inseto que é submetida à radiação, e nesta fase, o sistema reprodutivo é caracterizado por intensa proliferação, diferenciação e migração celular (WALDER; CALKINS, 1993). Além de afetar o tamanho dos testículos, o processo de irradiação pode destruir todos ou quase todos os tecidos germinativos primários, inviabilizando a produção de novos espermatozoides (ANWAR et al., 1971; WILLIAMSON et al., 1985). Como resultado disto, o número de espermatozoides transferidos por machos estéreis durante a cópula é limitado aos já produzidos e completamente formados antes da irradiação (Figura 2B) e isto, aparentemente, seria uma quantidade suficiente para 5-8 acasalamentos (OHINATA et al., 1978 citado por SEO et al., 1990).

Os machos estéreis devem transferir um volume espermático suficiente durante a cópula, pois caso contrário, o comportamento da fêmea não será alterado (comportamento de atração sexual para o de oviposição) e ocorrerá a recópula. As fêmeas buscam a recópula como uma estratégia para manter as espermatecas cheias com sêmen (YUVAL et al., 1996). Seo et al. (1990) constataram que machos irradiados transferem menos espermatozoides que machos selvagens.

Kraaijeveld e Chapman (2004) afirmaram que a tendência maior é que uma segunda cópula aconteça com um macho selvagem, e não com o estéril, sendo este, um dos fatores determinantes para o sucesso da TIE uma vez que Vera et al. (2003) mencionam que o macho que insemina uma fêmea não-virgem pode garantir a paternidade da maioria da progênie de maneira eficiente. Esse êxito pode ser alcançado quando o macho direciona a ejaculação na câmara de fertilização, o que

pode acontecer, tendo em vista que a genitália do macho apresenta adaptação morfológica para isso (MARCHINI et al., 2001).

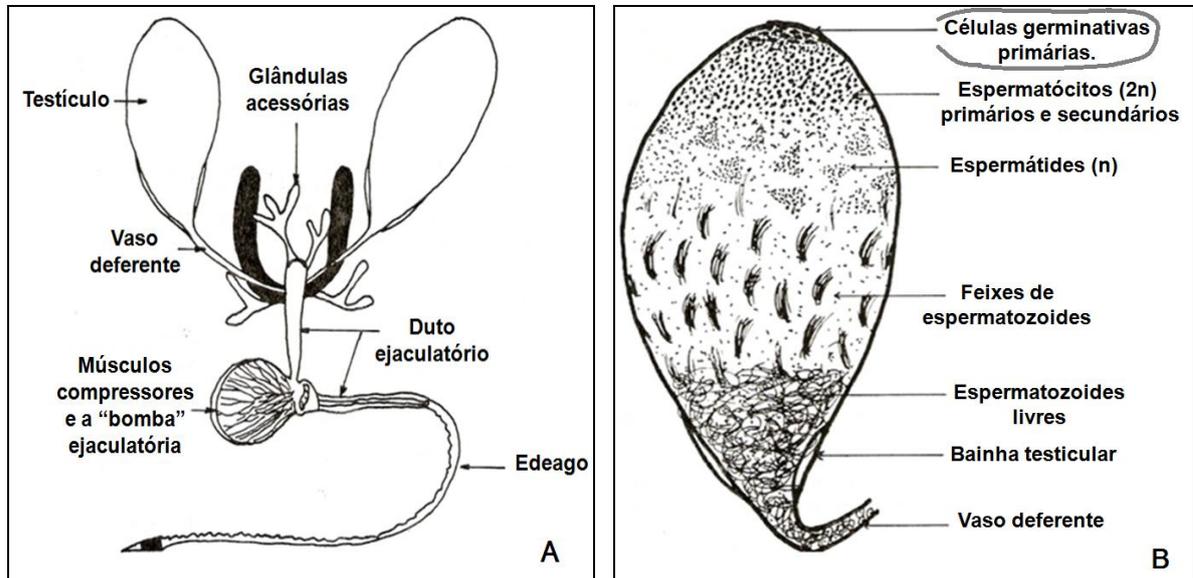


Figura 2 – **A.** Sistema reprodutor masculino de *C. capitata*. **B.** Representação longitudinal do testículo, com destaque para as células germinativas que permanecem em constante divisão e são afetadas pela radiação (GUILLÉN, 1983)

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram realizados no Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia (LIARE) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP.

A linhagem de *C. capitata* utilizada foi a *ts/* – Vienna 8, proveniente do Laboratório de Entomologia da IAEA, via Quarentenário “Costa Lima” da Embrapa Meio Ambiente – Jaguariúna-SP, e em manutenção desde 2004 no CENA.

Os insetos foram provenientes da criação estabelecida no LIARE, a qual é mantida sob as seguintes condições: temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa do ar de 60-75% e 10 horas de fotofase (WALDER, 2002).

A fonte de radiação gama (^{60}Co) foi o irradiador panorâmico Gammabeam 650, da Atomic Energy of Canadá, com atividade de $9,5 \times 10^{12}$ Bq (256,9 Ci) , no início dos experimentos. A taxa de radiação utilizada foi de 309,4 Gy/h.

3.1 Aspectos gerais da criação (linhagem *ts/* – Vienna 8)

Diariamente, os ovos são coletados das gaiolas matrizes do laboratório, lavados para retirada de resíduos, seguido de lavagem com solução de hipoclorito de sódio a 5 ppm e, finalmente, com água pura. A incubação é realizada em Erlenmeyer contendo água deionizada e ovos na proporção de 20:1. A oxigenação do meio é feita através de sistema de aeração para aquário, contendo pequeno compressor, tubo e pedra porosa. Os frascos com a mistura ficam em banho-maria a 25 °C por um período de 48 horas.

Após o período de oxigenação, os ovos e as larvas recém emergidas são transferidos para uma dieta larval apropriada (WALDER, 2002) e, após 7-9 dias, quando as larvas começam a abandonar as bandejas, são feitas coletas diárias durante cinco dias. Larvas coletadas durante o primeiro dia são exclusivamente machos. Poucas fêmeas são coletadas durante o segundo dia de coleta e esta proporção aumenta progressivamente até o quinto dia de coleta larval (CACERES, 2002).

As larvas de terceiro instar ou pré-pupas são coletadas em calhas contendo água potável, separadas por peneiras e colocadas em bandejas, contendo vermiculita extra-fina umedecida, para se transformarem em pupas.

Após 6-7 dias, as pupas são separadas da vermiculita através de peneiramento suave para evitar queda na qualidade dos insetos. Nesta fase, parte das pupas marrons era separada para os experimentos, e a outra parte seguia para o processo normal da criação do laboratório.

Para manutenção da criação, são colocadas pupas marrons da 1ª coleta e brancas da 4ª coleta dentro de gaiolas tipo “sanduíche” (Figura 3A), onde ocorre, primeiramente, a emergência dos machos, e três dias após, a das fêmeas. Cerca de dois dias após as fêmeas emergirem, os machos iniciam o comportamento de pré-cópula (liberação de feromônio e cortejo), e em seguida, as cópulas. Horas depois da cópula, as fêmeas iniciam a oviposição nos tecidos (voal) presentes nas laterais da gaiola (Figura 3B), e os ovos caem por gravidade em uma bandeja com água situada embaixo da gaiola.

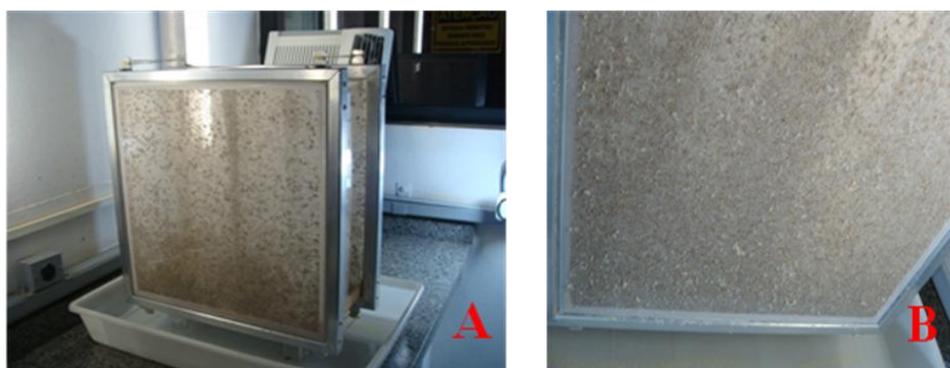


Figura 3 – **A.** Gaiola do tipo “sanduíche”, contendo machos e fêmeas da linhagem *ts/* – Vienna 8, sobre uma bandeja com água. **B.** Destaque para os ovos que as fêmeas ovipositaram no painel de voal

3.2 Efeito da radiação na fertilidade (Radioesterilização)

Pupas machos com 7 dias de idade (24h antes da emergência) foram irradiadas com as seguintes doses: 0 (testemunha), 30, 60, 90 e 120 Gy. Após a emergência, os machos foram colocados em gaiolas (baleiros plásticos de 2,4 L

adaptados) com fêmeas virgens da linhagem bissexual (normal) não-irradiadas, numa proporção de 1:1 perfazendo dez casais por gaiola.

As fêmeas da linhagem bissexual foram criadas conforme o item 3.1, tendo por diferença a coloração única das pupas (marrom) e a separação dos sexos ser feita somente após a emergência dos adultos.

Nas gaiolas utilizadas para confinamento dos casais havia água e alimento a vontade, sendo uma dieta a base de açúcar refinado, germe de trigo cru e hidrolisado de levedura de cervejaria (Bionis YE MF[®], da Biorigin), na proporção 3:1:1. A água foi fornecida em pequenos potes com algodão. As fêmeas ovipositavam através do tecido voal adaptado na tampa do baleiro que serviu como gaiola (Figura 4A), e abaixo da área de oviposição foi colocada uma placa de Petri, contendo um tecido de algodão preto sobre um pano esponja vegetal umedecido, onde os ovos caíam (Figura 4B) e permaneciam umedecidos. As placas de Petri eram substituídas a cada 24h, durante seis dias consecutivos de coleta.

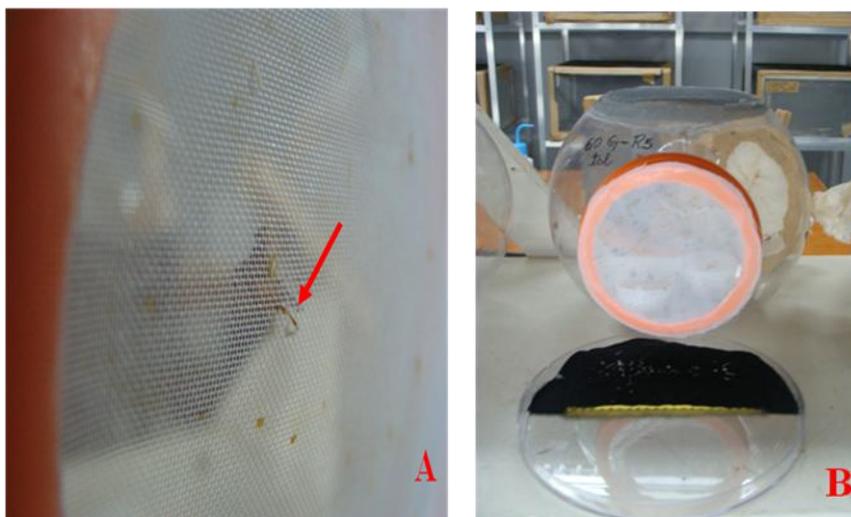


Figura 4 – **A.** Destaque para a fêmea ovipositando no voal, mostrando o ovipositor com ovos na extremidade (seta). **B.** Visão geral da gaiola contendo os casais de *C. capitata* e, abaixo da área de oviposição, a placa de Petri com o tecido de algodão preto sobre o pano esponja umedecido, para recebimento dos ovos

Os ovos coletados eram alinhados com fino pincel sobre o tecido de algodão umedecido para facilitar a contagem dos mesmos e a verificação da emergência das larvas. Em seguida as placas eram incubadas em BOD a 25 ± 1 °C por 96 horas. A viabilidade dos ovos foi avaliada após a incubação, contando-se os ovos inviáveis e

subtraindo do número total de ovos. Dessa forma, foi possível estimar a fecundidade (número de ovos/fêmea/dia) e a fertilidade (número de ovos viáveis).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e cinco repetições ou gaiolas por tratamento.

3.3 Controle de Qualidade dos machos irradiados

3.3.1 Efeito da radiação na porcentagem de emergência e na habilidade de voo

Para verificar a porcentagem de emergência, 100 pupas de cada tratamento foram colocadas em potes plásticos (500 mL) com tampas furadas. Após 72 horas do início da emergência, os adultos foram quantificados e o percentual de emergência calculado.

A porcentagem de machos voadores foi avaliada seguindo o protocolo de controle de qualidade descrito no Manual da FAO/IAEA/USDA (2003). Cem pupas foram colocadas dentro do sistema de avaliação de voo, constituído por um anel de papel centrado numa placa de Petri de 10 cm de diâmetro, a qual continha papel preto no fundo e servia de base para um tubo (9 cm D X 10 cm h) de acrílico preto contendo uma fina camada de talco neutro na superfície interna para evitar a fuga de moscas por caminhamento (Figura 5). Os tubos foram dispostos, aleatoriamente, sobre uma mesa dentro de uma sala apropriada contendo iluminação somente no teto (1500 lux e fotofase de 14 h), objetivando atrair os adultos com habilidade de voo. As moscas voadoras eram, sistematicamente, retiradas da sala por meio de um aspirador de pó domiciliar, evitando, com isto, toda e qualquer possibilidade do inseto retornar para os tubos. Após 72 horas, os sistemas eram desmontados e o material remanescente no interior dos tubos (adultos e pupas não viáveis) era contabilizado. A porcentagem de moscas voadoras (F) foi calculada através da fórmula:

$$F = \text{total de pupas} - (\text{moscas não voadoras} + \text{pupas inviáveis} + \text{moscas deformadas} + \text{moscas parcialmente emergidas}).$$

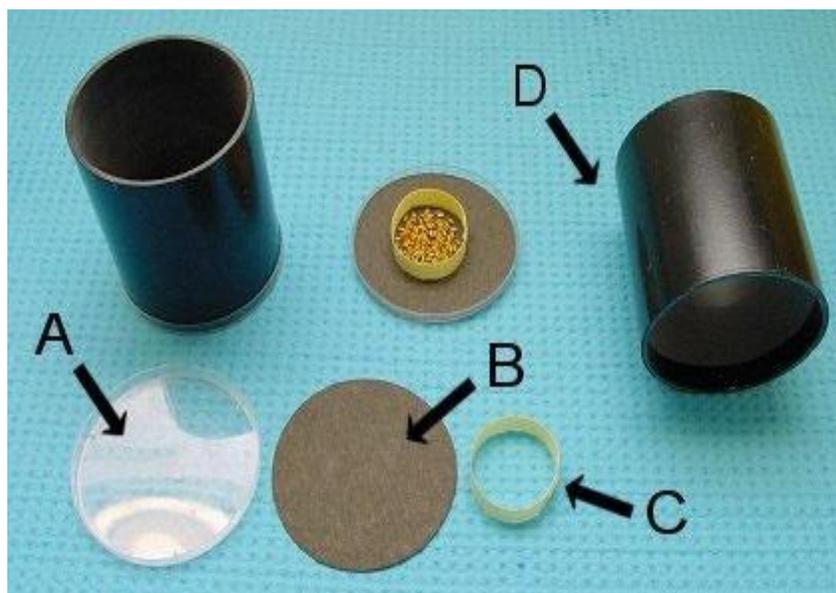


Figura 5 – Modelo de tubo para realizar o teste de habilidade de voo, sugerido pelo Manual da FAO/IAEA/USDA (2003). A- Placa de Petri (ficará sob o tubo); B- Papel poroso preto; C- Tiras de papel; D- Tubo plástico. (preto; o interior do tubo deve ser revestido com talco sem cheiro)

O delineamento experimental utilizado para estes bioensaios foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

3.3.2 Efeito da radiação na longevidade sob estresse nutricional

A sobrevivência foi determinada com o confinamento de 15 adultos recém-emergidos em potes plásticos de 500 mL com tampa perfurada para a devida aeração, sem alimento nem água. Estes potes ficaram em sala escura a 25 ± 1 °C e UR entre 60-75 %, por um período de 48 horas. Após este período a mortalidade foi registrada e os resultados expressos em porcentagem.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

3.3.3 Tamanho dos testículos

Os machos foram provenientes de pupas obtidas da criação citada no item 3.1 e irradiadas 24h antes da emergência nas doses 0, 30, 60, 90 e 120 Gy. Estes machos permaneceram em gaiolas (2,4 L) com água e alimento a vontade até o 8º dia após a emergência (ABDEL-MALEK et al., 1975), quando foram coletados 20 machos de cada tratamento, e transferidos para frascos com álcool 70% para posterior dissecação (BARTOLUCCI et al., 2006). Os testículos foram mensurados com a utilização de um medidor digital (WILD MMS 235) e uma ocular micrométrica (WILD TYP 325400) acoplados a um microscópio estereoscópico. Foi efetuada a medição de ambos os testículos, esquerdo e direito, e consideraram-se os maiores comprimento e largura de cada amostra.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e 20 repetições por tratamento, sendo cada macho considerado uma repetição.

3.3.4 Número de espermatozoides

Machos irradiados nas doses mencionadas anteriormente, vigorosos e com cinco dias de idade (sexualmente maduros), foram mantidos sob condições de refrigeração (aproximadamente 4 °C) e dissecados. Os seus testículos foram rompidos com estilete dentro de um microtubo (0,5 mL) contendo 300 µL de solução tampão fosfato salino (PBS) (YUVAL et al., 1996), e cada microtubo foi colocado no aparelho tipo vortex (Agitador de tubos AP56 - Phoenix) em uma velocidade 5 durante 1min e 30s. Para contagem dos espermatozoides (Figura 6), foram pipetados 5 µL da solução, colocando-se a amostra sobre uma lâmina e coberta com lamínula. A seguir, a amostra foi observada num aumento de 100x em microscópio de contraste de fases, tendo sido os espermatozoides contados em toda a área da lamínula. O número total de espermatozoides foi estimado através da multiplicação do número encontrado na amostra de 5 µL pelo fator de diluição, que neste caso foi 60.



Figura 6 – Espermatozoides de *C. capitata*, vistos através de um microscópio de contraste de fases. (VERA, 2008)

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e 20 repetições/tratamento, sendo cada indivíduo (macho) considerado uma repetição.

3.4 Análise estatística

O programa estatístico utilizado foi o SAS versão 9.2. Os resultados dos experimentos foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk ($n \leq 50$; $P > 0,05$) ou de Kolmogorov-Smirnov ($n > 50$; $P > 0,05$) para avaliar a normalidade da distribuição dos dados.

Quando os dados apresentaram distribuição normal, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), e não normal, foi feito o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$) (considerado uma ANOVA não-paramétrica) e, havendo diferença entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Quando necessário, antes de realizar o teste de comparação de médias, foram feitas as transformações dos dados (transformação de “rank” para os dados de radioesterilização, e transformação em raiz quadrada para os da fecundidade).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Radioesterilização

Os valores médios de fertilidade, com seus respectivos erros padrões, obtidos nos tratamentos entre machos *ts/* – Vienna 8 irradiados com diferentes doses de radiação gama e cruzados com fêmeas férteis normais estão na Tabela 2 e representados na Figura 7.

Tabela 2 – Fertilidade média das fêmeas de *C. capitata* bixessuais férteis, cruzadas com machos *ts/V8* irradiados na fase pupal com diferentes doses de radiação gama

Doses	Fertilidade (%) \pm EPM
0 Gy	71,37 \pm 1,99
30 Gy	38,43 \pm 1,66
60 Gy	16,63 \pm 0,72
90 Gy	5,27 \pm 0,28
120 Gy	1,50 \pm 0,16

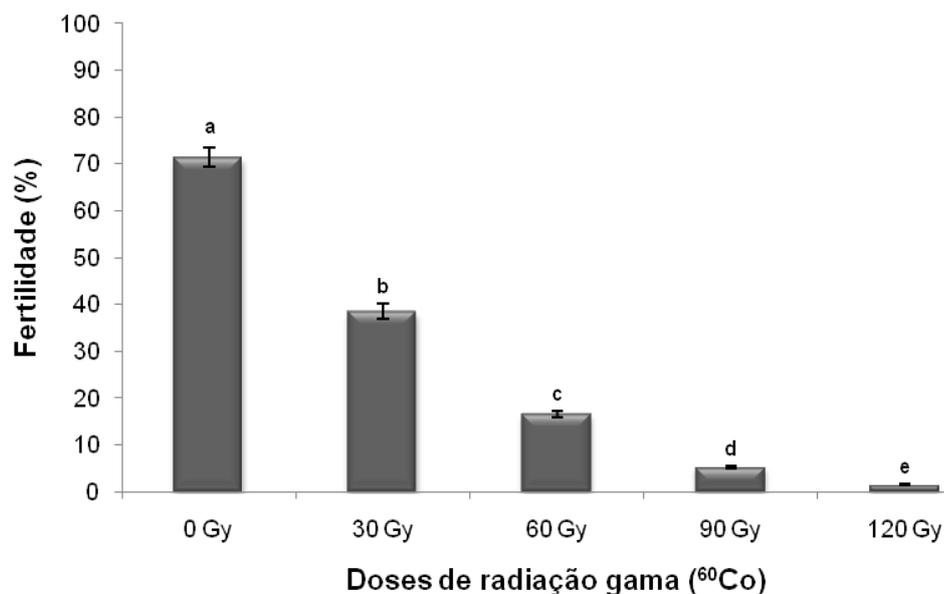


Figura 7 – Viabilidade média de ovos de fêmeas bissexuais de *C. capitata* acasaladas com machos irradiados e não-irradiados da linhagem *ts/* – Vienna 8. Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade ($P < 0,0001$). Os dados foram submetidos a uma transformação de “rank”

A fertilidade diminuiu à medida que se aumentou a dose de radiação nos machos, evidenciando uma relação direta entre grau de esterilidade dos machos e aumento da dose. A dose que resultou em maior esterilização foi a de 120 Gy, que teve como valor 98,50%, ou seja, apenas 1,50% dos ovos foram viáveis, enquanto o controle (0 Gy) apresentou uma viabilidade de 71,37%. Esta dose de 120 Gy, a maior dose aplicada no experimento, não causou 100% de esterilidade, o que é aceitável, tendo em vista que Fisher (1997) afirmou que as doses de radiação, utilizadas para obter acima de 99% de esterilidade, reduz significativamente a competitividade dos machos.

O resultado encontrado no presente trabalho difere do estudo realizado por Shoukry (1974), que constatou para *C. capitata* somente 1,12% de viabilidade dos ovos ao acasalar fêmeas não-irradiadas com machos expostos a uma dose de radiação gama de 40 Gy. Esta diferença, mostrando maior sensibilidade à radiação, deveu-se certamente a idade das pupas. Este autor irradiou pupas três dias antes da emergência, sendo, portanto muito mais sensíveis à radiação.

Franz (2000) verificou que, machos provenientes de 3 diferentes linhagens genéticas, que não a *tsl-V8*, eram parcialmente estéreis devido às mutações que carregavam no seu genoma, mas que, quando irradiados 24h antes da emergência com uma dose de 80-90 Gy, eles tornaram-se 99% estéreis. Já Mastrangelo (2009), estudando os machos da linhagem *tsl* – Vienna 8 apresentou resultado semelhante ao obtido neste trabalho, pois 99% de esterilidade foi alcançada com a dose de 128,2 Gy de radiação gama, dose esta calculada graficamente a partir de resultados experimentais.

Outros estudos referentes à esterilidade em machos de espécies pertencentes aos gêneros *Anastrepha* e *Bactrocera* já foram realizados: Walder; Calkins (1993) encontraram que 50 Gy provocaram esterilidade total em *A. suspensa*; Toledo et al. (2004) demonstraram que para *A. obliqua*, 99,50% de esterilidade é atingida com aplicação de uma dose de 40 Gy; Rull et al. (2007) relataram que doses de 40-80 Gy causam esterilidade de 95% em *A. ludens*; Allinghi et al. (2007) observaram que 60 Gy induziu 99% de esterilidade em *A. fraterculus*, e Kamiya (2010), estudando esta mesma espécie, afirmou que 70 Gy provocou cerca de 99,30%; Teruya et al. (1975) demonstraram que 98,20% de esterilidade foi alcançada quando se aplicou uma dose de 60 Gy e esterilidade total com uma dose de 80 Gy, para *B. cucurbitae*; Collins et al. (2009) observaram que 60 Gy induziu

esterilidade acima de 99,5% em *B. tryoni*; Puanmanee et al. (2010) encontraram que a dose de 30 Gy provocou esterilidade de 98,34% em *B. correcta*.

Todos os estudos realizados evidenciam a afirmação feita por Bakri et al. (2005a), ou seja, as doses esterilizantes podem variar entre ordens, famílias, gêneros e mesma espécie, e isto pode ocorrer devido a fatores genéticos, alimentares, físicos (durante a radiação das pupas) e humanos (forma de analisar os dados etc).

4.2 Fecundidade média das fêmeas acasaladas com machos irradiados e não-irradiados

Os dados da fecundidade foram obtidos considerando a média do total de ovos coletados por dia, em todas as gaiolas de cada tratamento e depois foi feita uma média dos valores dos seis dias de coleta (Tabela 3).

Tabela 3 – Fecundidade média por dia por gaiola, para cada tratamento (doses)

Doses	Fecundidade \pm EPM
0 Gy	342,47 \pm 24,42 a (n=10274)
30 Gy	334,60 \pm 31,05 a (n=10038)
60 Gy	346,47 \pm 25,40 a (n=10394)
90 Gy	350,10 \pm 23,47 a (n=10503)
120 Gy	347,97 \pm 22,38 a (n=10439)

*n= número total de ovos coletados

**Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

***Os dados precisaram ser transformados em raiz quadrada.

Foi observado que a fecundidade das fêmeas férteis não foi afetada pelo cruzamento com machos irradiados com diferentes doses de radiação ($P= 0,971$). Considerando todos os tratamentos e o período de seis dias (de coleta dos ovos), cada fêmea ovipositou um número médio (estimado) de 34,43 ovos por dia. Resultado semelhante ao encontrado por Mastrangelo (2009), onde também não foi observada diferença significativa na fecundidade das fêmeas acasaladas com machos irradiados (doses de 15, 30, 60, 90 e 120 Gy), e as mesmas ovipositaram uma média de 32,02 ovos por dia.

4.3 Parâmetros biológicos

4.3.1. Porcentagem de emergência e habilidade de voo

As doses de radiação utilizadas não afetaram negativamente a emergência dos adultos (Tabela 4) ($P= 0,715$), assim como nenhuma das categorias analisadas no teste de voo (Tabela 5).

Tabela 4 – Porcentagem média de emergência de machos da linhagem *ts/* – Vienna 8, provenientes de pupas irradiadas com diferentes doses de radiação

Doses	Porcentagem de emergência \pm EPM
0 Gy	90,6 \pm 0,93 a
30 Gy	89,6 \pm 1,25 a
60 Gy	88,4 \pm 1,89 a
90 Gy	88,0 \pm 1,38 a
120 Gy	88,4 \pm 1,75 a

*Não há diferença significativa entre as médias seguidas de mesma letra, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Silva (2007) encontrou porcentagens de emergência inferiores as relatadas neste trabalho, pois variou de 75,8 a 78,8%, para pupas machos irradiadas de *C. capitata* – linhagem *ts/* – Vienna 8, mas se tratando de pupas que permaneceram embaladas e resfriadas por um período de 24 a 30 horas em contêiner térmico para

viagem. Mastrangelo (2009) estudou pupas irradiadas da mesma linhagem e relatou uma porcentagem média de emergência, variando de 90,4 a 92,8%, valor mais próximo ao da presente pesquisa.

De acordo com o Manual da FAO/IAEA/USDA (2003), a média mínima aceitável para porcentagem de emergência de uma GSS (*tsl*) de *C. capitata* é 70%. No presente trabalho, a menor média obtida foi de 88,0% de emergência na dose de 90 Gy, ou seja, todos os tratamentos apresentaram valores acima do recomendado.

Tabela 5 – Porcentagens médias das categorias avaliadas no teste de habilidade de voo dos machos da linhagem *tsl* – Vienna 8, irradiados como pupas com diferentes doses de radiação

Doses	Voadores (%) ± EPM	Não- voadores (%) ± EPM	Deformadas (%) ± EPM	Semi- emergidas (%) ± EPM	Não- emergidas (%) ± EPM
0 Gy	96,2 ± 1,07	1,8 ± 0,58	0,4 ± 0,40	0,4 ± 0,24	1,2 ± 0,37
30 Gy	96,8 ± 0,58	1,4 ± 0,24	0,8 ± 0,37	0,2 ± 0,20	0,8 ± 0,49
60 Gy	95,2 ± 1,07	2,0 ± 0,45	0,8 ± 0,58	0,2 ± 0,20	1,8 ± 0,37
90 Gy	95,4 ± 0,81	1,8 ± 0,49	0,2 ± 0,20	0	2,6 ± 0,40
120 Gy	95,2 ± 0,58	1,4 ± 0,60	1,0 ± 0,45	0	2,4 ± 0,51
P	0,599 ^{n.s.}	0,874 ^{n.s.}	0,559 ^{n.s.}	0,406 ^{n.s.}	0,067 ^{n.s.}

*n.s. = não significativo

As porcentagens médias de adultos voadores variaram de 95,2 a 96,8%, valores acima da média aceitável que é de 60% (FAO/IAEA/USDA, 2003). Os valores obtidos no presente trabalho foram superiores aos encontrados por Silva (2007), que obteve uma variação de 68,6% a 79,2% de adultos voadores, levando-se em consideração as 24-30h de viagem em contêiner térmico, após a irradiação.

A estimativa da habilidade de voo serve como um indicativo do desempenho destes machos estéreis em condições de campo, visando avaliar a competitividade com os machos selvagens (NASCIMENTO et al., 2008). Com esta afirmação, os machos avaliados neste trabalho podem ser considerados aptos a desempenhar, de forma eficiente, a função de competidores com os machos selvagens.

4.3.2. Longevidade sob estresse nutricional

A longevidade sob estresse nutricional não foi afetada pelas doses de radiação aplicadas ($P= 0,092$). O Manual da FAO/IAEA/USDA (2003) especifica que, para GSS (cor da pupa) e GSS (*tsl*) de *C. capitata*, a porcentagem mínima de sobrevivência é de 40% e 50% de indivíduos vivos, respectivamente, após um período de 48h. No presente trabalho foram observados valores próximos ou acima de 50% de indivíduos vivos após 48h, em todos os tratamentos (Tabela 6), tendo como média geral 51,8%.

Tabela 6 – Porcentagem média da sobrevivência de machos da linhagem *tsl* – Vienna 8, irradiados com diferentes doses de radiação

Doses	Sobrevivência (%) ± EPM
0 Gy	61 ± 1,46 a
30 Gy	46 ± 1,46 a
60 Gy	59 ± 1,49 a
90 Gy	45 ± 1,84 a
120 Gy	48 ± 1,67 a

*Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os machos da linhagem *tsl*, estudados por Silva (2007), apresentaram sobrevivência média de 53,2%, resultado semelhante ao observado neste trabalho, que teve como média geral de sobreviventes 51,8%, sendo, portanto, diferente do valor relatado por Mastrangelo (2009), pois este autor observou que, após o período teste de 48h, a sobrevivência da mosca-do-mediterrâneo, da mesma linhagem em questão, mas criadas no Laboratório de Entomologia da IAEA em Seibersdorf, foi em média 84%.

Considerando-se os bioensaios de controle de qualidade discutidos nos itens 4.3.1 e 4.3.2, pode-se afirmar que o material biológico utilizado nos estudos apresentou os requisitos mínimos de qualidade exigidos para um bom desempenho dos machos adultos no campo.

4.3.3 Tamanho dos testículos

Na Tabela 7 pode ser observado que ocorreu diferença significativa entre as dimensões (largura e comprimento) dos testículos (esquerdo ou direito) dos insetos irradiados com diferentes doses. Os dados da tabela estão representados graficamente nas Figuras 8 e 9, e os testículos estão ilustrados na Figura 10.

Também foi realizada uma comparação entre a média do testículo esquerdo com a do direito, para ambas as variáveis (largura e comprimento), dentro de cada dose. Estatisticamente, o tamanho do testículo esquerdo não diferenciou do direito, em um mesmo tratamento (dose).

Tabela 7 – Larguras e comprimentos médios dos testículos, esquerdo e direito, de machos da linhagem *ts/* – Vienna 8, irradiados com diferentes doses de radiação

Doses	Testículo esquerdo		Testículo direito	
	Largura (mm) ± EPM	Comprimento (mm) ± EPM	Largura (mm) ± EPM	Comprimento (mm) ± EPM
0 Gy	0,36 ± 0,005 a	0,69 ± 0,010 a	0,35 ± 0,006 a	0,70 ± 0,008 a
30 Gy	0,30 ± 0,004 b	0,61 ± 0,010 b	0,29 ± 0,004 b	0,62 ± 0,013 b
60 Gy	0,29 ± 0,004 bc	0,58 ± 0,010 bc	0,28 ± 0,001 bc	0,58 ± 0,008 bc
90 Gy	0,28 ± 0,005 bc	0,59 ± 0,008 bc	0,27 ± 0,005 c	0,58 ± 0,010 bc
120 Gy	0,26 ± 0,005 c	0,57 ± 0,009 c	0,26 ± 0,004 c	0,56 ± 0,010 c

*Não há diferença significativa entre as médias seguidas de mesma letra pelo Teste de Tukey (5% de probabilidade), nas colunas.

**Todas as variáveis (categorias) analisadas apresentaram $P < 0,0001$ quando submetidas a análise de variância, o que representa diferença altamente significativa ($P < 0,05$).

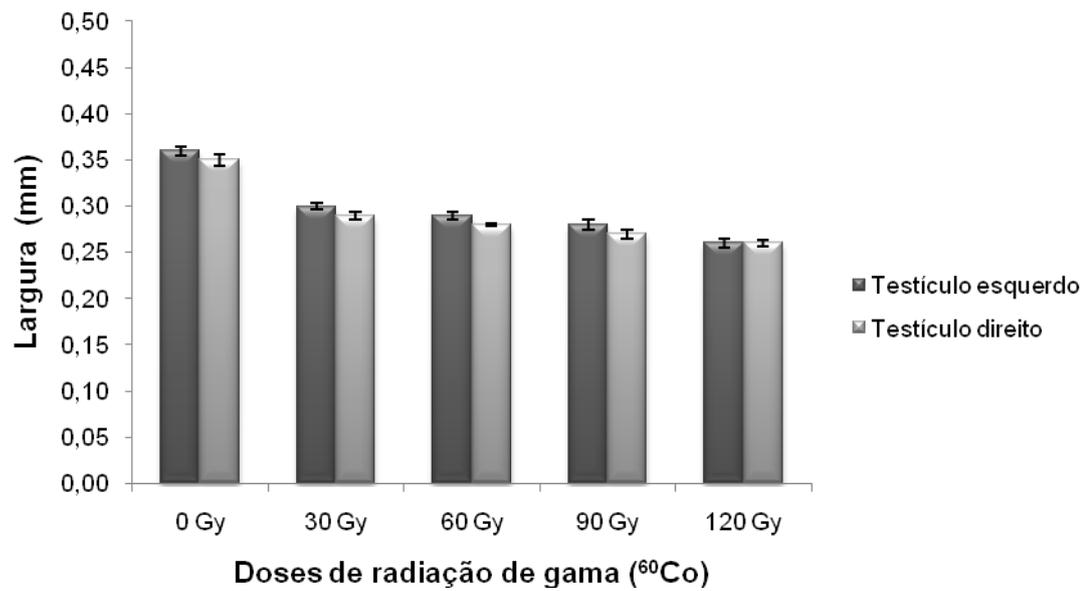


Figura 8 – Largura média dos testículos, esquerdo e direito, dos machos irradiados e não-irradiados da linhagem *ts/* – Vienna 8

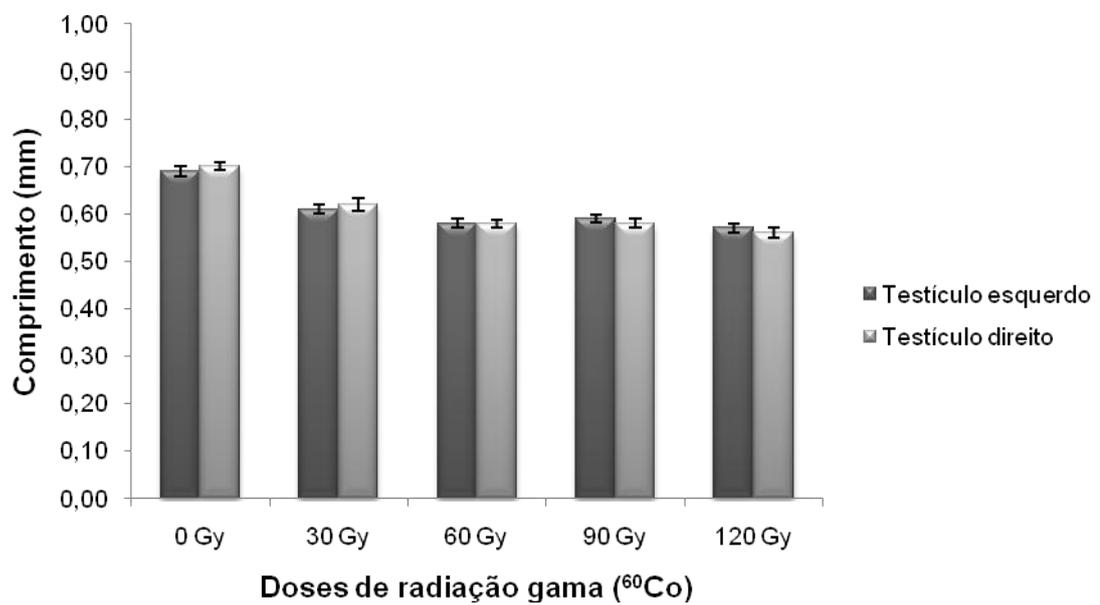


Figura 9 – Comprimento médio dos testículos, esquerdo e direito, dos machos irradiados e não-irradiados da linhagem *ts/* – Vienna 8

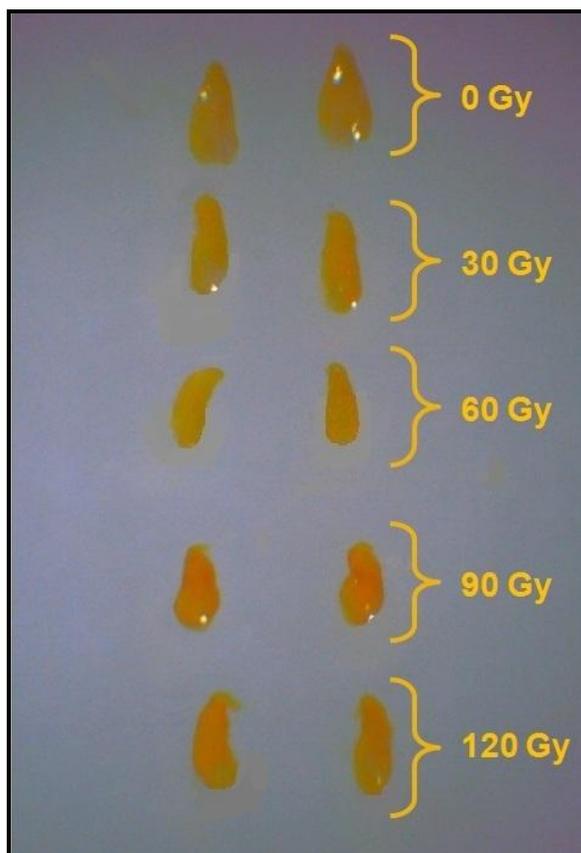


Figura 10 – Testículos de machos da linhagem *ts/* – Vienna 8, irradiados com diferentes doses

No presente trabalho, os machos tinham 8 dias de idade e, os que foram irradiados com 120 Gy (maior dose testada), apresentaram uma redução no tamanho do testículo de aproximadamente 25% quando comparado ao testículo de machos normais, resultado este, semelhante ao encontrado por Abdel-Malek et al. (1975) para machos de *C. capitata* bissexual, também no 8^o dia de idade, pois na maior dose estudada por este autor, que foi de 80 Gy, os testículos tiveram a mesma redução, comparando macho irradiado e não-irradiado.

No entanto, o tamanho dos testículos obtido neste trabalho corrobora com o relatado por Abdel-Malek et al. (1975). Para o controle (0 Gy), o autor relatou 0,247 e 0,456 mm, e na dose de 80 Gy foi 0,165 e 0,427 mm, para largura e comprimento, respectivamente; no presente estudo, sendo considerado um tamanho médio de ambos os testículos (como foi feito pelo referido autor), machos não-irradiados apresentaram 0,355 e 0,695 mm, e os irradiados com 120 Gy (maior dose), 0,260 e 0,565 mm, para largura e comprimento, respectivamente.

A diferença considerável entre o tamanho dos testículos de uma mesma espécie estudada pode ser em decorrência de fatores como o genômico, pois a

linhagem aqui estudada é *tsl-V8* enquanto a do Egito foi uma linhagem normal e, devido também a condições em que foram criados no laboratório, com destaque para a alimentação (fator nutricional) do inseto, o que influencia diretamente no seu desenvolvimento.

4.3.4 Número de espermatozoides

A Tabela 8 e a Figura 11 mostram que houve evidência estatística significativa do efeito da radiação gama sobre o número de espermatozoides

Tabela 8 – Número médio de espermatozoides, de ambos os testículos, dos machos irradiados e não-irradiados da linhagem *tsl* – Vienna 8

Doses	Número de espermatozoides \pm EPM
0 Gy	41910 \pm 750,01
30 Gy	31869 \pm 497,16
60 Gy	31317 \pm 473,33
90 Gy	30540 \pm 993,61
120 Gy	27921 \pm 966,63

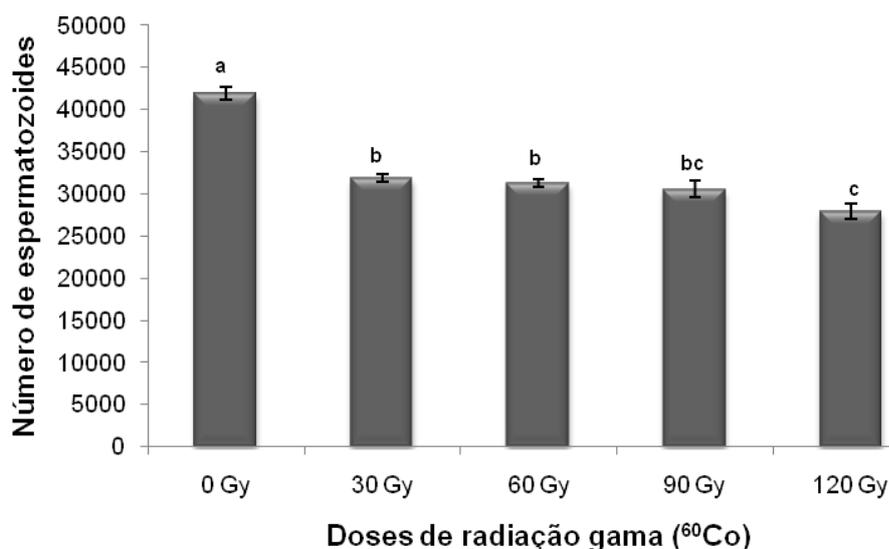


Figura 11 – Número médio de espermatozoides dos machos da linhagem *tsl* – Vienna 8, submetidos a diferentes doses de radiação. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade ($P < 0,0001$)

Pode ser observado que, mesmo na dose mais baixa que foi utilizada (30 Gy), os machos apresentaram uma diferença considerável em relação ao número médio de espermatozoides produzidos por machos não-irradiados.

Ao comparar estes valores com os dados apresentados para tamanho de testículo no item 4.3.3, pode-se perceber que existe uma relação entre ambos, ou seja, testículos menores produziram uma menor quantidade de espermatozoides. Nas Figuras 12 e 13 são apresentadas as correlações existentes entre largura e comprimento dos testículos com o número de espermatozoides produzidos, respectivamente.

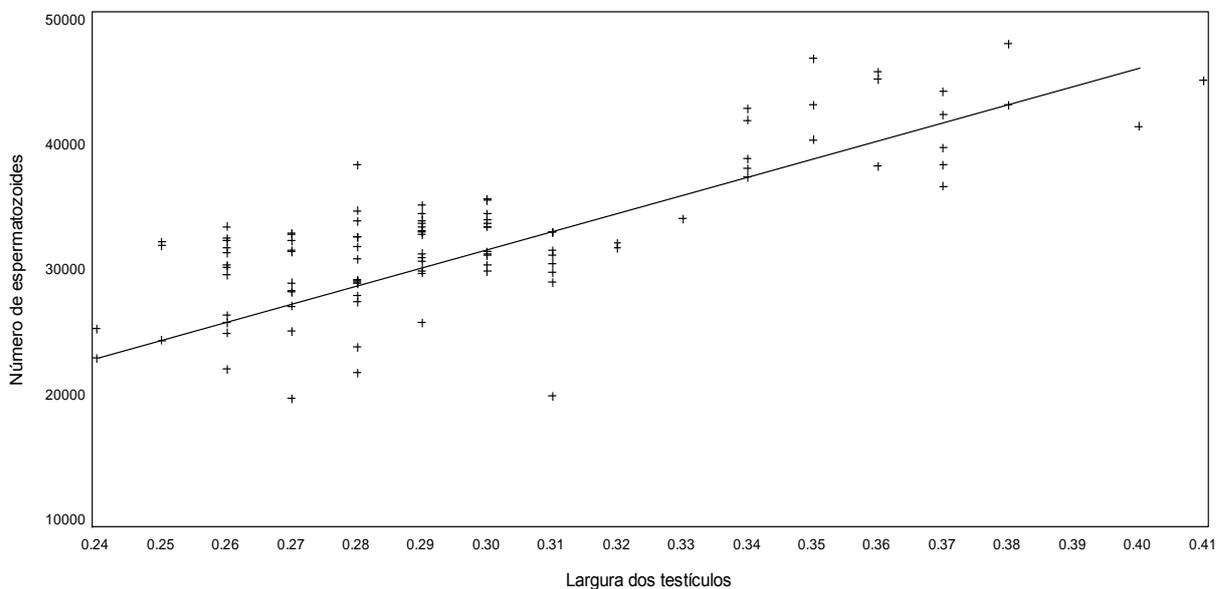


Figura 12 – Correlação entre largura média dos testículos e número de espermatozoides. Foi obtido $P < 0,0001$, refletindo uma forte evidência que a correlação entre as duas variáveis difere de zero, e o valor do coeficiente de correlação foi $r = 0,77874$, indicando Correlação positiva ($0 < r < 1$) e forte ($0,7 < r < 0,9$)

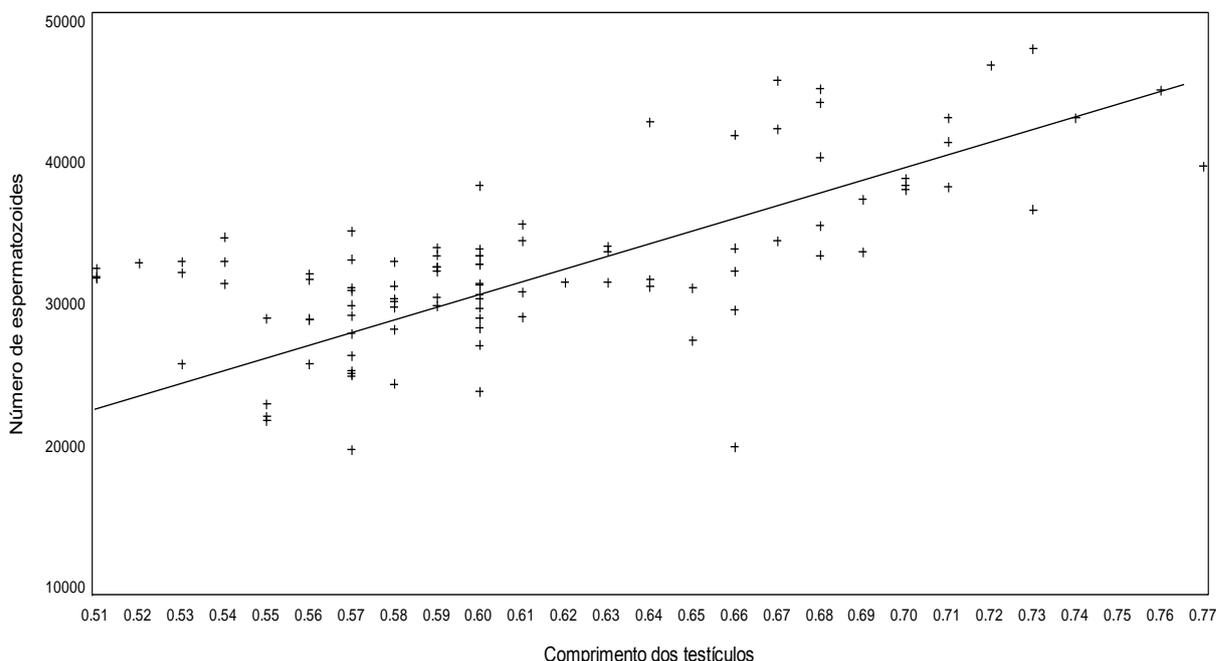


Figura 13 – Correlação entre comprimento médio dos testículos e número de espermatozoides. Obteve-se $P < 0,0001$, evidenciando que a correlação entre as variáveis é diferente de zero, e o coeficiente de correlação foi $r = 0,66129$, indicando Correlação positiva ($0 < r < 1$) e moderada ($0,4 < r < 0,7$)

O fato de ocorrer redução na quantidade de espermatozoides à medida que aumenta a dose de radiação comprova que Anwar et al (1971); Williamson et al. (1985) estavam corretos ao afirmar que a radiação destrói todos ou quase todos os tecidos germinativos e nenhum novo espermatozoide pode ser produzido, e com isto, as células germinativas dos testículos dos machos não-irradiados continuaram a originar novos espermatozoides enquanto os machos irradiados ficaram limitados a uma quantidade produzida antes do processo de irradiação.

Em estudo realizado com *C. capitata*, no Egito, por Yuval et al. (1996), foi relatado que os machos apresentaram um número médio de 34300 espermatozoides, o qual se aproxima dos valores obtidos para machos irradiados em 30, 60 e 90 Gy do presente trabalho. Acredita-se que a diferença entre o número encontrado por Yuval et al. (1996) e o desta pesquisa, que foi de 41910 espermatozoides para machos normais, ocorre devido a uma possível diferença no tamanho do testículo.

A considerável redução no número de espermatozoides, quando se compara os machos não-irradiados e os expostos a dose de 120 Gy deste trabalho, pode vir a ser um indicativo que machos irradiados não irão transferir um volume espermático suficiente durante a cópula, o que estimulará a recópula da fêmea, confirmando a suposição feita por Morelli-de-Andrade (2008).

Por este motivo, pode ser levado em consideração o uso do macho transgênico, pois ele carrega o gene letal dominante sem ter a necessidade de ser submetido à radiação, e com isto, acredita-se que o mesmo pode apresentar uma produção contínua de espermatozoides, assim como os machos não-irradiados da linhagem *ts/* – Vienna 8, estudados no presente trabalho. Além disso, Morrison et al. (2009) realizaram um estudo sobre a competitividade de uma linhagem transgênica (OX3376B) e observaram que os machos da mesma competem efetivamente com machos do tipo selvagem pelo acasalamento com a fêmea selvagem; ainda os mesmos autores, ao compararem esta linhagem transgênica com uma GSS (Vienna-8), relataram não haver diferença na capacidade entre os machos destas linhagens para competir com os machos selvagens, e quando os transgênicos e os da referida GSS foram colocados juntos em uma gaiola com fêmeas selvagens, machos Vienna-8 foram ligeiramente mais competitivos do que os transgênicos, porém, no contexto de competitividade, o parâmetro relevante é a capacidade de competir com macho selvagem.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados obtidos neste estudo, pode-se dizer que as doses de radiação gama utilizadas não afetaram a habilidade de voo, a porcentagem de emergência e a longevidade sob estresse dos machos (linhagem *tsl* – Vienna 8), assim como a fecundidade das fêmeas, acasaladas com machos irradiados e não irradiados.

Das doses aplicadas, nenhuma provocou 100% de esterilidade nos machos da linhagem *tsl* – Vienna 8, e a dose de 120 Gy deve ser recomendada para esterilização de machos da linhagem *tsl*, considerando que foi obtida uma esterilidade de 98,5%, a qual é satisfatória.

A radiação gama afetou negativamente os testículos e o número de espermatozoides, pois à medida que aumentou a dose, ocorreu redução no tamanho e na quantidade produzida, respectivamente.

O fato de reduzir o número de espermatozoides pode vir a tornar a TIE ineficiente, pois ao liberar os machos estéreis em campo para controle da mosca-do-mediterrâneo e os mesmos não transferirem volume espermático suficiente, induzirá a fêmea a fazer recópula. Devido a este fator, pode ser recomendada a nova forma de controle que vem sendo estudada que é a utilização do macho transgênico, pois o mesmo não é esterilizado, mas expressa o gene letal dominante e não irá gerar descendentes.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MALEK, A. A.; SHOUKRY, A.; SHEHATA, N. F. Anatomical effects of gamma irradiation on the male reproductive organs of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* Wied. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, Berlin, v. 78, p. 190-194, 1975.
- AGROSOFT – BRASIL. **Uvas finas de mesa e mangas do Vale do Submédio São Francisco ganham Indicação de Procedência**. Brasília, DF, 2010. Disponível em: <<http://www.agrosoft.org.br/agropag/210831.htm>>. Acesso em: jan. 2011.
- ALLINGHI, A.; GRAMAJO, C.; WILLINK, E.; VILARDI, J. Induction of sterility in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by gamma radiation. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 90, n. 1, p. 96-102, 2007.
- ALPHEY, L.; ANDREASEN, M. Dominant lethality and insect population control. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 121, p. 173–178, 2002.
- ALUJA, M. Bionomics and management of *Anastrepha*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 39, p. 155-178, 1994.
- ALUJA, M.; MANGAN, R. L. Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Host Status Determination: Critical Conceptual, Methodological, and Regulatory Considerations. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 53, p. 473-502, 2008.
- ANWAR, M.; CHAMBERS, D. L.; OHINATA, K.; KOBAYASHI, R. M. Radiation-sterilization of the mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): Comparison of spermatogenesis in flies treated as pupae or adults. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 64, n. 3, p. 627-633, 1971.
- ARITA, L. H. Reproductive and sexual maturity of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann). **Proceedings of the Hawaiian Entomological Society**, Honolulu, v. 24, n. 1, p. 25-29, 1982.
- BAKRI, A.; HEATHER, N.; HENDRICHS, J.; FERRIS, I. Fifty Years of Radiation Biology in Entomology: Lessons Learned from IDIDAS. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 98, n. 1, p. 1-12, 2005a.
- BAKRI, A.; MEHTA, K.; LANCE, D. R. Sterilizing insects with ionizing radiation. In: DYCK, V. A.; HENDRICHS, J.; ROBINSON, A. S. (Ed.). **Sterile insect technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management**. Dordrecht: Springer, 2005b. cap. 3.3, p. 233-269.
- BARTOLUCCI, A.; VERA, M. T.; YUSEF, V.; OVIEDO, A. Morphological characterization of the reproductive system of irradiated *Anastrepha fraterculus*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FRUIT FLIES OF ECONOMIC IMPORTANCE: from basic to applied knowledge, 7., 2006, Salvador, Bahia. **Proceedings...** Juazeiro, Bahia, Brasil: MOSCAMED, 2006. p. 45-52.

BAUMHOVER, A. H.; GRAHAM, A. J.; BITTER, B. A.; HOPKINS, D. E.; NEW, W. D.; DUDLEY, F. H.; BUSHLAND, R. C. Screw-worm control through release of sterilized flies. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 48, p. 462-466, 1955.

BENEDICT, M. Q.; ROBINSON, A. S. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 19, n. 8, p. 349-355, 2003.

BURDITT JUNIOR, A. K.; LOPEZ, D. F.; STEINER, L. F.; VON WINDEGUTH, D. L.; BARANOWSKI, R.; ANWAR, M. Application of sterilization techniques to *Anastrepha suspensa* (Loew) in Florida, USA. In: SYMPOSIUM ON THE STERILITY PRINCIPLE FOR INSECT CONTROL, 1974, Innsbruck, Vienna. **Proceedings...** Vienna: IAEA, 1975. p. 93-101.

BUSHLAND, R. C.; HOPKINS, D. E. Sterilization of screw-worm flies with x-rays and gamma-rays. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 46, p. 648-656, 1953.

CACERES, C. Mass rearing of temperature sensitive genetic sexing strains in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitidis capitata*). **Genetica**, Gravenhage, v. 116, p. 107-116, 2002.

CACERES, C.; FISHER, K.; RENDON, P. Mass rearing of medfly temperature sensitive lethal genetic sexing strain in Guatemala. In: TAN, K. H. (Ed.). **Area-wide management of fruit flies and other major insect pests**. Penang, Malaysia: Universiti Sains Malaysia Press, 2000. p. 543-550.

CAYOL, J. P. Changes in sexual behavior and life history traits of tephritid species caused by mass-rearing processes. In: ALUJA, M.; NORRBOM, A. L. (Ed.). **Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 843-860.

COLLINS, S. R.; WELDON, C. W.; BANOS, C.; TAYLOR, P. W. Optimizing irradiation dose for sterility induction and quality of *Bactrocera tryoni*. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 102, n. 5, p. 1791-1800, 2009.

CURTIS, C. F. Induced sterility in insects. **Advances in Reproductive Physiology**, New York, v. 5, p. 119-165, 1971.

DE ARAÚJO, K. R. P. **Modelo matemático para simular a aplicação da técnica do inseto estéril (SIT) e etapas de implementação de um programa de controle da mosca-do-mediterrâneo no Brasil**. 2000. 301 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

DUYCK, P. F.; QUILICI, S. Survival and development of different life stages of three *Ceratitidis* spp. (Diptera: Tephritidae) reared at five constant temperatures. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 92, p. 461-469, 2002.

FAO/IAEA/USDA. **Manual for product quality control and shipping procedures for sterile mass-reared tephritid fruit flies**. Version 5.0. Vienna: IAEA, 2003. 85 p.

FISHER, K. Irradiation effects in air and in nitrogen on Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) pupae in Western Australia. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 90, p. 1609-1614, 1997.

FISHER, K.; CACERES, C. A filter rearing system for mass reared genetic sexing strains of Mediterranean fruit fly (Diptera:Tephritidae). In: TAN, K. H. (Ed.). **Area-wide management of fruit flies and other major insect pests**. Penang, Malaysia: Universiti Sains Malaysia Press, 2000. p. 543-550.

FLETCHER, B. S. Life history strategies of tephritid fruit flies. In: ROBINSON, A. S.; HOOPER, G. **Fruit flies: their biology, natural enemies and control**. Amsterdam: Elsevier, 1989. 82 p.

FLETCHER, B. S.; GIANNAKAKIS, A. The selection of age is also affecting adult males of *Dacus (Strumeta) tryoni*. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 66, p. 62-64, 1973.

FNP CONSULTORIA E INFORMAÇÕES EM AGRONEGÓCIOS. Manga. **Agriannual 2010**: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo, 2010. p. 380-386.

_____. Uva. **Agriannual 2010**: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo, 2010. p. 505-514.

FOLLETT, P. A.; NEVEN, L. G. Current trends in quarantine entomology. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 51, p. 359–385, 2006.

FRANZ, G. 'The Combi Fly Concept' Revised: how much radiation is required to sterilize males of a genetic sexing strain? In: TAN, K. H. (Ed.). **Area-wide control of fruit flies and other insect pests**. Penang, Malaysia: University Sains, 2000. p. 511-516.

FRANZ, G. Genetic sexing strains in Mediterranean fruit fly, an example for other species amenable to large-scale rearing for the sterile insect technique. In: DYCK, V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. (Ed.). **Sterile insect technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management**. Dordrecht: Springer, 2005. cap. 4.3, p. 427–451.

FRANZ, G.; KERREMANS, P. Radiation induced chromosome aberrations for the genetic analysis and manipulation of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Management of insect pests: Nuclear and related molecular and genetic techniques**. Vienna: IAEA, 1993. p. 187-190.

FRANZ, G.; KERREMANS, P.; RENDON, P.; HENDRICH, J. Development and application of genetic sexing systems of the Mediterranean fruit fly based on a temperature sensitive lethal. In: McPHERON, B. A.; STECK, G. J. **Fruit fly pests: A world assessment of their biology and management**. Delray Beach, FL: St. Lucie Press, 1996. 185 p.

FREIRE, R. M. **Modelagem matemática para a simulação de estratégias de controle biológico da mosca-do-mediterrâneo *C. capitata* (Diptera: Tephritidae), em plantações de *Citrus***: “utilização de variáveis temporais e espaciais”. 2007. 134 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2007.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GAVRIEL, S.; GAZIT, Y.; YUVAL, B. Remating by female Mediterranean fruit flies (*Ceratitis capitata*, Diptera: Tephritidae): temporal patterns and modulation by male condition. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 55, p. 637–642, 2009.

GONG, P.; EPTON, M. J.; FU, G.; SCAIFE, S.; HISCOX, A.; CONDON, K. C.; CONDON, G. C.; MORRISON, N. I.; KELLY, D. W.; DAFA'ALLA, T.; COLEMAN, P. G.; ALPHEY, L. A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruit fly. **Nature Biotechnology**, New York, v. 3, n. 4, p. 453-456, 2005.

GONZÁLEZ, B. J.; VARGAS, V. C.; JARA, P. B. Estudios sobre la aplicación de la técnica de machos estériles en el control de la mosca sudamericana de la fruta *Anastrepha fraterculus* (Wied.). **Revista Peruana de Entomología**, Lima, v. 14, p. 77–83, 1971.

GUILLÉN, J. C. A. **Manual para la diferenciación de Moscas del Mediterráneo *Ceratitis capitata* (Wied). Silvestres (fértils) de moscas Irradiadas (estériles)**. México, DF: Programa Mosca del Mediterráneo, Dirección General de Sanidad Vegetal, 1983.

HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S.; CAYOL, J. P.; ENKERLIN, W. Medfly areawide sterile insect technique programmes for prevention, suppression or eradication: the importance of mating behavior studies. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, n. 1, p. 1-13, 2002.

HOOPER, G. H. S. Sterilization of the Mediterranean fruit fly with gamma radiation effect on male competitiveness and change in fertility of females alternately mated with irradiated and untreated males. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 65, p. 1–6, 1972.

HUNT, M. K.; ROUX, E. A.; WOOD, R. J.; GILBURN, A. S. The effect of supra-fronto-orbital (sfo) bristle removal on male mating success in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, n. 1, p. 83-88, 2002.

IHERING, H. VON. Laranjas bichadas. **Revista Agrícola**, Maceió, v. 6, p. 179-181, 1901.

KAMIYA, A. C. **Criação massal em dieta líquida e radioesterilização da mosca-sul-americana *Anastrepha* sp. 1 aff. *fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae)**. 2010. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

KERREMANS, P.; FRANZ, G. Cytogenetic analysis of chromosome 5 from Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. **Chromosoma**, Berlin, v. 103, p.142-146, 1994.

KNIPLING, E. F. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 48, p. 459-462, 1955.

KOYAMA, J.; KAKINOHANA, H.; MIYATAKE, T. Eradication of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, in Japan: importance of behavior, ecology, genetics, and evolution. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 49, p. 331-349, 2004.

KRAAIJEVELD, K.; CHAPMAN, T. Effects of male sterility on female remating in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 271, p. S209-S211, 2004.

LACHANCE, L. E.; SCHMIDT, C. H.; BUSHLAND, R. C. Radiation-induced sterilization. In: KILGORE, W. W.; DOUTT, R. L. (Ed.). **Pest control: Biological, physical and selected chemical methods**. New York: Academic Press, 1967. p. 147-196.

LIEDO, P.; De LEON, E.; BARRIOS, M. I.; VALLEMORA, J. F.; IBARRA, G. Effect of age on the mating propensity of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, p. 94-101, 2002.

LIEDO, P.; CAREY, J. R. Demography of fruit flies and implications to action programs. In: McPHERON, B. A.; STECK, G. J. **Fruit fly pests a world assessment of their biology and management**. Delray Beach, FL: St. Lucie Press, 1996. p. 299-308.

LUX, S. A.; VILARDI, J. C.; LIEDO, P.; GAGGL, K.; CALCAGNO, G. E.; MUNYIRI, F. N.; VERA, M. T.; MANSO, F. Effects of irradiation on the courtship behavior of medfly mass reared for the sterile insect technique. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, p. 102-112, 2002a.

LUX, S. A.; MUNYIRI, F. N.; VILARDI, J. C.; LIEDO, P.; ECONOMOPOULOS, A. P.; HASSON, O.; QUILICI, S.; GAGGL, K.; CAYOL, J. P.; RENDON, P. Consistency in courtship pattern among populations of medfly *Ceratitis capitata* comparison among wild strains and strains mass-reared for SIT operations. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, p. 113-125, 2002b.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A.; SUGAYAMA, R. L. Biogeografia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 10, p. 93-98.

MARCHINI, D.; Del BENE, G.; FALSO, L. F.; DALLAI, R. Structural organization of the copulation site in the medfly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) and observations on sperm transfer and storage. **Arthropod Structure and Development**, Oxford, v. 30, p. 39-54, 2001.

MASTRANGELO, T. de A. **Esterilização de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) com raios-X para Programas de Técnica do Inseto Estéril**. 2009. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MELVIN, R.; BUSHLAND, R. C. The nutritional requirements of screw-worm larvae. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 33, p. 850-852, 1941.

MORELLI-DE-ANDRADE, R. **Influência da recópula de fêmeas selvagens de *Ceratitis capitata* (Wied., 1824) (Diptera: Tephritidae) na eficiência da técnica do inseto estéril**. 2008. 56 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MORENO, D. S.; SANCHEZ, M.; ROBACKER, D. C.; WORLEY, J. Mating competitiveness of irradiated Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 84, p. 1227-1234, 1991.

MORRISON, N. I.; SEGURA, D. F.; STANTON, K. C.; FU, G.; DONNELLY, C. A.; ALPHEY, L. S. Sexual competitiveness of a transgenic sexing strain of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 133, p. 146–153, 2009.

NASCIMENTO, A. S.; AGUIAR, W.; SA, R. F. de; CARVALHO, R. S.; CASTELLANI, M. A.; MOREIRA, A. A.; SAO JOSE, A. R.; WALDER, J. M. M.; SILVA, V. E. da S.; MALAVASI, A.; PARANHOS, B. J. Técnica do Inseto Estéril (TIE): nova tecnologia para o controle de moscas-das-frutas no Brasil - Projeto Piloto Livramento de Nossa Senhora. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 8, n. 2, p. 53-57, 2008.

OHINATA, K.; ASHRAF, M.; HARRIS, E. J. Mediterranean fruit flies sterility and sexual competitiveness in the laboratory after treatment with gamma irradiation in air, carbon dioxide, helium, nitrogen or partial vacuum. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 70, p. 165–168, 1977.

PARANHOS, B. A. J. Técnica do inseto estéril e controle biológico: métodos ambientalmente seguros e eficazes no combate às moscas-das-frutas. In: SIMPÓSIO DE MANGA DO VALE DO SÃO FRANCISCO, 1., 2005, Juazeiro, BA. **Palestras...** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2005. (Documentos, 189). Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/OPB63ID-egwWrmJdPY.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2010.

PUANMANEE, K.; WONGPIYASATID, A.; SUTANTAWONG, M.; HORMCHAN, P. Gamma irradiation effect on guava fruit fly, *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Diptera: Tephritidae). **Kasetsart Journal: Natural Science**, Bangkok, v. 44, p. 830-836, 2010.

RESILVA, S.; OBRA, G.; ZAMORA, N.; GAITAN, E. Development of quality control procedures for mass produced and released *Bactrocera philippinensis* (Diptera: Tephritidae), for sterile insect technique programs. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 90, n. 1, p. 58-63, 2007.

RHODE, R. H.; LOPEZ, D. F.; EGUISA, F.; TELICH, J. Effect of gamma radiation on the reproductive potential of the Mexican fruit fly. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 54, p. 202–203, 1961.

ROBINSON, A. S. Mutations and their use in insect control. **Mutation Research – Reviews**, Amsterdam, v. 511, p. 113-132, 2002a.

ROBINSON, A. S. Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitidis capitata*, sterile insect technique programmes. **Genetica**, Gravenhage, v. 116, p. 5-13, 2002b.

ROBINSON, A. S.; VAN HEEMERT, C. *Ceratitidis capitata*: a suitable case for genetic sexing. **Genetica**, Gravenhage, v. 58, p. 229-237, 1982.

ROBINSON, A. S.; CIRIO, U.; HOOPER, G. H. S.; CAPPARELLA, M. Field cage studies with a genetic sexing strain in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 41, p. 231-236, 1986.

ROBINSON, A. S.; FRANZ, G.; FISHER, K. Genetic sexing strains in the medfly, *Ceratitidis capitata*: development, mass rearing and field application. **Trends in Entomology**, Amsterdam, v. 2, p. 81-104, 1999.

ROBINSON, A. S.; CAYOL, J. P.; HENDRICHS, J. Recent findings on medfly sexual behavior: implications for SIT. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, n. 1, p. 171-181, 2002.

ROBINSON, A. S., FRANZ, G. AND ATKINSON, P. W. Insect transgénesis and its potential role in agriculture and human health. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 34, p. 113–120, 2004.

RÖSSLER, Y. Automated sexing of *Ceratitidis capitata* (Dip. Tephritidae): The development of strain with inherited sex-limited pupae color dimorphism. **Entomophaga**, Paris, v. 24, p. 411-416, 1979a.

RÖSSLER, Y. The genetics of the Mediterranean fruit fly: a "white-pupa" mutant. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 72, p. 583-590, 1979b.

RUHM, M. E.; CALKINS, C. O. Eye-color changes in *Ceratitidis capitata* pupae, a technique to determine pupal development. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 29, p. 237-240, 1981.

RULL, J.; DIAZ-FLEISCHER, F.; ARREDONDO, J. Irradiation of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) revisited: optimizing sterility induction. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 100, n. 4, p. 1153-1159, 2007.

SALLES, L. A. Biologia e ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus* (WIED.). In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 8, p. 81-86.

SELIVON, D. Relações com as plantas hospedeiras. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 9, p. 87-91.

SEO, S. T.; WILLIAMSON, D. L.; FUJIMOTO, M. S. *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): colorimetric method to estimate age and rate of development of pupae for the sterile-insect technique. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 80, p. 1087-1090, 1987.

SEO, S. T.; VARGAS, R. I.; GILMORE, J. E.; KURASHIMA, R. S.; FUJIMOTO, M. S. Sperm transfer in normal and gamma-irradiated, laboratory-reared Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 83, n. 5, p. 1949-1953, 1990.

SHEHATA, N. F.; YOUNES, M. W. F.; MAHMOUD, Y. A. Anatomical effects of gamma-ray on the peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saund.) male gonads. **Journal of Applied Sciences Research**, Punjab, v. 2, n. 8, p. 510-513, 2006.

SHELLY, T. E. Aggression between wild and laboratory-reared sterile males of the Mediterranean fruit fly in a natural habitat (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 83, n. 1, p. 105-108, 2000.

SHELLY, T. E.; EDU, J.; PAHIO, E. Lack of an irradiation effect on the mating performance of mass-reared males of the Mediterranean fruit fly. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 88, n. 4, p. 547-548, 2005.

SHOUKRY, A. Determination of the sterile dose of gamma irradiation for adult Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* Wied. in Egypt. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, Berlin, v. 75, p. 109-112, 1974.

SHOUKRY, A.; ABDEL-MALEK, A. A.; SHEHATA, N. F. Anatomical effects of gamma irradiation on the female reproductive organs of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* Wied. In: SYMPOSIUM ON THE USE OF ISOTOPES IN PESTICIDES AND PEST CONTROL, 1974, Beirut, Lebanon. **Proceedings...** Lebanon, Asia, 1974.

SILVA, V. E. da S. **Dispersão de machos estéreis de *ceratitis capitata* (wied.) (diptera: tephritidae) em agroecossistemas de manga e café na região Sudoeste da Bahia**. 2007. 84 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Vitória da Conquista, 2007.

SOUZA FILHO, M. F.; RAGA, A.; ZUCCHI, R. A. Fruit flies in the state of São Paulo (Brazil): occurrence and damages. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 24, n. 1, p. 45-69, 2003.

TERUYA, T.; ZUKEYAMA, H.; ITÔ, Y. Sterilization of the melon fly, *Dacus cucurbitae* Coquillett with gamma radiation: effect on rate of emergence, longevity and fertility. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 10, n. 4, p. 298-301, 1975.

TAYLOR, P. W.; BEAR, A.; GAZIT, Y.; ROSSLER, Y. Sexual competitiveness of Vienna 4/Tol-94 'genetic sexing' sterile Mediterranean fruit fly males in Israel. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 29, n. 1, p. 7-14, 2001.

THOMAS, D. B.; LOERA-GALLARDO, J. Dispersal and Longevity of Mass-Released, Sterilized Mexican Fruit Flies (Diptera: Tephritidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 27, n. 4, p. 1045-1052, 1998.

THOMAS, D. D.; DONNELLY, C. A.; WOOD, R. J.; ALPHEY, L. S. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. **Science**, Washington, DC, v. 287, n. 5462, p. 2474-2476, 2000.

TOLEDO, A. J. **Dosis óptimas de irradiación a pupas de *Anastrepha serpentina* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) para la obtención de adultos estériles sexualmente competitivos**. 1992. 68 p. Tesis (Maestría en Ciencias) - Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Universidad de Monterrey, México, DF, 1992.

TOLEDO, J.; RULL, J.; OROPEZA, A.; HERNANDEZ, E.; LIEDO, P. Irradiation of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) Revisited: Optimizing Sterility Induction. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 97, n. 2, p. 383-389, 2004.

VALDEZ, J. M. Ultrastructure of the testis of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 94, n. 2, p. 251-256, 2001.

VERA, M. T.; CLADERA, J. L.; CALCAGNO, G.; VILARDI, J. C.; McINNIS, D. O. Remating of wild *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) females in field cages. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 96, n. 4, p. 563-570, 2003.

VERA, M. T. **Sistema reproductivo de moscas de la fruta (Familia: Tephritidae)**. 2008. 12 p. Piracicaba:ESALQ/USP, 2008. (Material didático).

WALDER, J. M. M. Técnica do Inseto Estéril - Controle genético. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: Conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 19, p. 151-158.

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.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: Parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. cap. 11, p. 181-190.

WALDER, J. M. M.; CALKINS, C. O. Gamma radiation effects on ovarian development of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 75, p. 267-271, 1992.

WALDER, J. M. M.; CALKINS, C. O. Effects of gamma radiation on the sterility and behavioral quality of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 50, p. 157-165, 1993.

WHITTEN, M. J. Automated sexing of pupae and its usefulness in control by sterile insects. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 62, p. 272-273, 1969.

WHITTIER, T. S.; NAM, F. Y.; SHELLY, T. E.; KANESHIRO, K. Y. Male courtship success and female discrimination in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 7, n. 2, p. 159-170, 1994.

WHITTIER, T. S.; KANESHIRO, K. Y. Intersexual selection in the Mediterranean fruit fly: does female choice enhance fitness? **Evolution**, Lancaster, v. 49, n. 5, p. 990-996, 1995.

WILLIAMSON, D. L.; MITCHELL, S.; SEO, S. T. Gamma irradiation of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) effects of puparial age under induced hypoxia on female sterility. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 78, p. 101-106, 1985.

YUVAL, B.; BLAY, S.; KASPI, R. Sperm transfer and storage in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 89, n. 3, p. 486-492, 1996.

ZUCCHI, R. A. Taxonomia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 1, p. 13-24.

ZUCCHI, R. A. Mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). In: VILELA, E. F.; ZUCCHI, R. A.; CANTOR, F. (Ed.). **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. cap. 1, p. 15-22.

ZUMREOGLU, A.; OHINATA, K.; FUJIMOTO, M.; HIGA, H.; HARRIS, E. J. Gamma irradiation of the Mediterranean fruit fly effect of treatment of immature pupae in nitrogen or emergence, longevity, sterility, sexual competitiveness, mating ability and pheromone production of males. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 72, p. 173-176, 1979.