

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

JAIR FERNANDES VIRGINIO

**Avaliação da linhagem transgênica, OX3864A de *Ceratitits capitata*
(Wied.,1824) (Diptera: Tephritidae), comparada à linhagem tsl
Vienna 8, para aplicação na Técnica do Inseto Estéril**

Piracicaba

2015

JAIR FERNANDES VIRGINIO

Avaliação da linhagem transgênica, OX3864A de *Ceratitis capitata* (Wied.,1824) (Diptera: Tephritidae), comparada à linhagem tsl Vienna 8, para aplicação na Técnica do Inseto Estéril

Versão revisada em conformidade com a Resolução CoPGr 6018, de 13/10/2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Júlio Marcos Melges Walder

Piracicaba

2015

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

Virginio, Jair Fernandes

Avaliação da linhagem transgênica, OX3864A de *Ceratitis capitata* (Wied., 1824) (Diptera: Tephritidae), comparada à linhagem tsl Vienna 8, para aplicação na Técnica do Inseto Estéril / Jair Fernandes Virginio; orientador Julio Marcos Melges Walder. - - Versão revisada em conformidade com a Resolução CoPGr 6018, de 13/10/2011.- - Piracicaba, 2015.

82 p. : il.

Tese (Doutorado – 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 vegetal 2. Controle de insetos 3. Fruticultura 4. Moscas-frutas 5. Raios X 6. Sistema de Informação Geográfica I. Título

CDU 595.773.4 : 632.935.4

Dedico

À minha esposa Ivana e à minha filha Hebe, pelo amor e compreensão nas minhas ausências ao longo da vida.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Elias e Marina, pelo amor incondicional e à minha família pelo suporte e carinho, aqui representada pelos meus irmãos Elias e Rogério e suas famílias.

Aos meus sogros Dário e Hebe, pelo afeto e convívio enriquecedor.

Ao Mestre Júlio Marcos Melges Walder, pela amizade e orientação. Sem o seu apoio esta fase da vida teria sido muito mais difícil.

Ao amigo e incentivador Aldo Malavasi, pelo apoio inestimável.

Aos amigos Jorge Hendrichs, Don McInnis e Rui Pereira, pelas contribuições e sugestões dadas.

Ao amigo Carlos Caceres, pelas contribuições enriquecedoras e pela troca de ideias na discussão da tese.

Ao Mestre Sinval Silveira Neto e sua Regina, pela acolhida familiar e pelas lições de vida que me foram compartilhadas. Obrigado por me adotar.

Aos professores do Departamento de Entomologia da Esalq, Roberto Zucchi, Marinéia Haddad, Regina Botequio, Keiko Uramoto e Djair Vendramim por compartilharem momentos de suas vidas e suprirem com carinho a ausência da minha família e dos meus amigos. Piracicaba não é a mesma sem vocês.

A amiga e professora do Departamento de Economia da Esalq, Silvia Helena Miranda, por ampliar os meus horizontes na área de Economia Agrícola.

Ao amigo Wilson Magela Gonçalves, da Universidade Federal de Lavras pelo suporte antes e durante a caminhada.

Aos colegas de doutorado do Departamento Entomologia da Esalq, pelo momentos de alegria e companheirismo, aqui representados pela colega Gleydiane Novais Lopes-Mielzrski.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura-CENA/USP, pela oportunidade de realização do doutorado, aqui representado por Lia Costa e Fábio Oliveira.

À Biofábrica Moscamed Brasil e seus funcionários pelo apoio inestimável na realização da pesquisa, aqui representados por Marijke Damenn, Aline Taiane Macedo, Géssyca Gomes e Meire Soares. Em especial à Maylen Gomez Pacheco pelo apoio na pesquisa e na troca de ideias.

À Oxitec Ltd, por ter cedido e autorizado o uso da linhagem transgênica nos experimentos, aqui representada por Martha Koukidou e Glen Slade.

À Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), pelo suporte técnico e pela oportunidade de compartilhar as experiências com a comunidade científica internacional.

Aos homens livres e de bons costumes espalhados pelo mundo, pelo exemplo de luta por uma sociedade mais justa e fraterna.

RESUMO

VIRGINIO, J. F. **Avaliação da linhagem transgênica, OX3864A de *Ceratitis capitata* (Wied.,1824) (Diptera:Tephritidae), comparada à linhagem tsl Vienna 8, para aplicação na Técnica do Inseto Estéril.** 2015. 83 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

As moscas-das-frutas se constituem no maior obstáculo para a produção, processamento e comércio de frutas frescas em todo o mundo. O Brasil não é exceção e, embora as condições brasileiras sejam bastante adequadas à produção de frutas tropicais e temperadas, a fruticultura enfrenta, continuamente, o problema das moscas-das-frutas. Dentre as espécies de maior importância econômica e quarentenária, destaca-se a mosca-do-mediterrâneo *Ceratitis capitata* (Wied., 1824) que tem, como centro de origem, a África Equatorial, e é uma das pragas mais destrutivas, causando elevados prejuízos à fruticultura mundial. No Brasil, onde sua presença foi registrada no início do século passado, esta praga se encontra amplamente distribuída em todo o território nacional. Os processos integrados de controle de pragas e doenças, com emprego de controle biológico, monitoramento populacional da praga, sistema de informação geográfica e aplicação de técnicas de controle das populações têm se desenvolvido significativamente nos últimos anos, permitindo a obtenção de frutas de alta qualidade. Com o sucesso da aplicação da Técnica do Inseto Estéril (TIE) na erradicação da *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) da Ilha de Curaçao e da região Sudeste dos Estados Unidos, houve um estímulo para o uso de programa contra várias espécies de moscas-das-frutas. A necessidade de se buscar respostas para o uso de fontes alternativas na esterilização de insetos, notadamente o uso de raios X, em escala industrial e a busca de novos modelos que possam inovar desde o ponto de vista tecnológico a TIE, com métodos que dispensem, por completo, o uso de radiação ionizante é o desafio do presente estudo, que teve como objetivo avaliar, através de testes em laboratório e em gaiola de campo, a linhagem transgênica de *Ceratitis capitata* (Wied.), OX3864A, comparada à linhagem tsl Vienna 8 da mesma espécie, esterilizada por raios X, visando a sua possível aplicação em programas de controle de moscas-das-frutas, com foco na TIE. Os resultados obtidos mostram que a criação massal da linhagem transgênica esta dominada e que a dieta adotada pela BIOFÁBRICA MOSCAMED BRASIL (BMB), para a linhagem tsl Vienna 8, pode ser usada para a criação da linhagem transgênica OX3864A sem afetar o rendimento e os padrões de qualidade requeridos para o uso da linhagem na TIE. No que diz respeito aos bioensaios em gaiola de campo, os machos de ambas linhagens apresentaram uma boa performance sexual sendo capazes de competir com machos coespécíficos selvagens pela cópula com fêmeas selvagens virgens. O desempenho dos machos transgênicos OX3864A não deferiu do desempenho dos machos irradiados de tsl Vienna 8. A fim de aprofundar os estudos, necessário se faz a realização de novas pesquisas para avaliar o desempenho de linhagens transgênicas em campo aberto.

Palavras-chave: Mosca-das-frutas. Técnica do Inseto Estéril. Raios X. *Ceratitis capitata* transgênica.

ABSTRACT

VIRGINIO, J. F. **Evaluation of the RIDL transgenic lineage, OX3864A of *Ceratitis capitata* (Wied.,1824) (Diptera:Tephritidae), compared to tsl-Vienna 8 strain, for sterile insect technique purposes.** 2015. 83 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Fruit flies are within the main barriers to fresh fruit production, processing and trade throughout the world. In that sense, Brazil is not an exception, and although Brazilian conditions are favorable to the production of tropical and temperate fruits, this industry continually faces problems related to the fruit fly. From an economical and quarantine point of view, *Ceratitis capitata* (Wied., 1824) can be considered the most important fruit fly species, which has the Equatorial Africa as center of origin, is also one of the most destructive pests, causing high losses to the world fruit industry. In Brazil, where its presence has been first noticed in the beginning of the past century, nowadays this pest is widespread throughout the whole national territory. With the latest developments on biological control, pest monitoring, geographical information systems and application of population control techniques it is seen that the integrated pest management systems are allowing the production of high quality fruits. Since the successful application of the sterile insect technique on the eradication of *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) in Curaçao and in the US Southeast region, there has been an incentive to the use of this technique in programs against various fruit fly species. On the search for alternative sources for insect sterilization especially the use of X-ray in high scale and the search for new models able to innovate the sterile insect technique from a technological point of view with methods that exempt the use of ionizing irradiation is the challenge of the present study, whose aim was to evaluate through lab and field cage tests the transgenic OX3864A RIDL of *Ceratitis capitata* (Wied.) strain, compared to X-ray sterilized tsl Vienna 8 strain, looking for a possible application on fruit fly control programs focused on the Sterile Insect Technique (SIT). Results obtained show that the mass rearing of the transgenic strain is dominated and the diet adopted by MOSCAMED BRAZIL rearing facility, for tsl Vienna 8 can also be used for the OX3864A transgenic strain without affecting its yield and quality standards required for its use in SIT. Regarding the field cage bioassays, males from both strains presented a good sexual performance, being able to compete with wild co-specific to mate with virgin wild females. Transgenic males did not differ from irradiated tsl Vienna 8 males. Further studies on sexual performance evaluation on open field of transgenic strain is recommended in order to provide more knowledge.

Keywords: Fruit fly. Sterile Insect Technique. X-ray. *Ceratitis capitata* transgenic.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	14
3. REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1. Biogeografia de moscas-das-frutas	15
3.2. Importância econômica e quarentenária de moscas-das-frutas	15
3.3. Moscas-das-frutas e a produção de frutas no Vale do Submédio São Francisco	16
3.4. Métodos de controle e o Manejo Integrado de Pragas aplicado à moscas-das-frutas	17
3.5. Controle Autocida – Técnica do Inseto Estéril (TIE)	17
3.6. Programas de ação com o uso da TIE	18
3.7. Criação massal de linhagens não transgênicas	19
3.8. Métodos de esterilização	20
3.9. TIE e o uso de linhagens transgênicas	21
Referências	22
4. Estabelecimento de criação massal de linhagem transgênica OX3864A, DE <i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae), no Brasil	24
Resumo	24
Abstract	25
4.1. Introdução	26
4.2. Material e Métodos	27
4.2.1. Material biológico	27
4.2.2. Adaptação e estabelecimento da colônia da linhagem transgênica <i>C. capitata</i> OX3864A	29
4.2.3. Parâmetros de produção e qualidade da linhagem <i>C. capitata</i> OX3864A	32
4.2.4. Relação ovos inoculados/kg de dieta larval para manutenção da colônia transgênica de <i>C. capitata</i> , linhagem OX3864A	34
4.2.5. Análise dos dados	36
4.3. Resultados	36
4.4. Discussão	43
4.5. Conclusões	44
Referências	44

5. Sobrevivência e frequência de cópula de machos de <i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae), linhagem transgênica OX3864A: implicações para a Técnica do Inseto Estéril	47
Resumo	47
Abstract	48
5.1. Introdução	49
5.2. Material e Métodos	50
5.2.1. Material biológico utilizado	50
5.2.2. Frequência e duração de cópulas de machos de <i>C. capitata</i>, linhagens tsl Vienna 8 e transgênica OX3864A	53
5.2.3. Influência da nutrição na sobrevivência de machos de <i>C. capitata</i> linhagem transgênica OX3864A	54
5.2.4. Análise estatística	55
5.3. Resultados	55
5.4. Discussão	58
5.5. Conclusões	61
Referências	61
6. Competitividade sexual de machos de duas linhagens de <i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae): tsl Vienna 8 e transgênica OX3864A, em condições de gaiola de campo	63
Resumo	63
Abstract	64
6.1. Introdução	65
6.2. Material e Métodos	68
6.2.1. Local de Estudo	68
6.2.2. Insetos utilizados	68
6.2.3. Testes de competitividade sexual	71
6.2.4. Análise dos dados	73
6.3. Resultados	74
6.4. Discussão	77
6.5. Conclusões	78
Referências	79

1. INTRODUÇÃO

As moscas-das-frutas se constituem no maior obstáculo para a produção, processamento e comércio de frutas frescas em todo o mundo. O Brasil não é exceção e, embora as condições brasileiras sejam bastante adequadas à produção de frutas tropicais e temperadas, a fruticultura enfrenta, continuamente, o problema das moscas-das-frutas.

Segundo Malavasi e Sugayama (2000), a mosca-das-frutas *Ceratitidis capitata*, mundialmente conhecida como mosca-do-mediterrâneo ou moscamed, tem, como centro de origem, a África Equatorial e é uma das pragas mais destrutivas, causando elevados prejuízos à fruticultura mundial. No Brasil, onde sua presença foi registrada no início do século passado (IHERING,1901), esta praga se encontra amplamente distribuída em todo o território nacional.

O desafio posto é o permanente controle de moscas-das-frutas, para viabilizar a produção de frutas de qualidade, de maneira sustentável e de baixo impacto ambiental.

A tendência mundial moderna, para conferir sustentabilidade aos sistemas de produção, é a progressiva migração para técnicas de controle com o menor impacto possível sobre organismos não alvos e que sejam inócuos do ponto de vista da contaminação ambiental e de resíduos de agroquímicos.

Os sistemas integrados de controle de pragas e doenças, com emprego de controle biológico, monitoramento populacional da praga, sistema de informação geográfica e aplicação de técnicas de controle das populações têm se desenvolvido significativamente nos últimos anos, permitindo a obtenção de frutas de alta qualidade.

A necessidade de se buscar respostas para o uso de fontes alternativas na esterilização de insetos, notadamente o uso de raios X, em escala industrial e a busca de novos modelos que possam inovar desde o ponto de vista tecnológico a Técnica do Inseto Estéril, com métodos que dispensem, por completo, o uso de radiação ionizante é o desafio que se impõe à ciência neste momento.

2. OBJETIVO

Avaliar, através de testes em laboratório e em gaiola de campo, a linhagem transgênica RIDL (do inglês **R**elease of **I**nsects carryng a **D**ominant **L**ethal”) de *Ceratitis capitata* (Wied.), OX3864A, comparada a linhagem baseada em mutação, *temperature sensitive letal* - tsl Vienna 8 (tsl V-8), desenvolvida, pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), da mesma espécie, esterilizada por raios X, visando a sua possível aplicação em programas de controle de moscas-das-frutas, com foco na Técnica do Inseto Estéril (TIE).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Biogeografia de moscas-das-frutas

Segundo Malvasi e Zucchi (2000), as espécies de moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil pertencem a quatro gêneros – *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis* e *Rhagoletis*. Sem margem para dúvidas, o gênero *Ceratitis* é o de maior importância econômica e quarentenária e é oriundo da região biogeográfica Afrotropical, contudo está presente como invasora nas regiões Neotropical, Neártica, Paleártica, Oriental, Australásia e Oceânica.

O gênero *Ceratitis* é constituído por, aproximadamente, 65 espécies, que ocorrem principalmente na África tropical. Dentre os tefritídeos, *Ceratitis capitata*, a mosca-do-mediterrâneo, é a espécie mais cosmopolita e invasora. Consequentemente, é a que mais causa danos à fruticultura em todo o mundo (VILELA; ZUCCHI; CANTOR, 2001).

Pereira (1996) afirma que a biologia desta espécie, envolvendo aspectos tais como o alto potencial biológico, longevidade estendida do adulto, mobilidade e polifagia, associada às condições climáticas favoráveis, sistemas de produção e práticas fitossanitárias deficientes e irregulares, contribuem para o status de praga da mosca-do-mediterrâneo.

Ainda segundo Malvasi e Sugayama (2000), no Brasil, a espécie *C. capitata* está presente de Norte a Sul, contudo é de pouca importância nos estados do Sul, onde são encontradas nas áreas urbanas. Sua ocorrência é mais intensa no Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste. Também ocorre na região Norte até o limite do estado do Pará.

3.2. Importância econômica e quarentenária de moscas-das-frutas

As moscas-das-frutas *C. capitata* e *Anastrepha* spp. fazem parte de um grupo de pragas responsável por grandes prejuízos econômicos a fruticultura e em especial na cultura da mangueira (BARBOSA; PARANHOS, 2005).

Além dos danos diretos causados por *C. capitata*, o dano indireto, ainda mais prejudicial, está relacionado ao custo de medidas regulatórias requeridas para exportar frutas frescas para países que a consideram praga quarentenária, tais como os Estados Unidos da América (EUA), o Japão e outros países da Ásia. Apesar do cenário favorável à ampliação do agronegócio fruta, os maiores entraves ao comércio internacional, são

as barreiras fitossanitárias, sendo as moscas-das-frutas o grupo de pragas que exige a implementação de um rígido programa de controle. Essas moscas têm uma importância particular já que são alvos das maiores barreiras não tarifárias impostas pelos países importadores. Seu controle é fundamental para a exportação de frutas frescas para aqueles mercados. As moscas-das-frutas representam um dos fatores mais comuns de disputa dentro da Organização Mundial do Comércio (OMC) (EMBRAPA, 2007).

3.3. Moscas-das-frutas e a produção de frutas no Vale do Submédio São Francisco

Um dos maiores desafios dos fruticultores do Vale do Submédio São Francisco é a fitossanidade dos seus produtos. Nesse aspecto, definitivamente, o maior problema reside na presença das moscas-das-frutas. Essas moscas inserem seus ovos nas frutas (manga, uva, acerola, goiaba, etc.) que originam larvas que se alimentam da polpa. Os frutos caem, precocemente, no chão ou, se a fruta infestada é colhida ainda verde, suas larvas e sinais externos deixados por elas acabam impedindo sua comercialização. Para o mercado externo de manga, a detecção de larvas no destino final (Europa ou EUA) resulta em perdas, não somente econômicas diretas, mas, também, da reputação da fruta brasileira.

Nas áreas de produção de manga no Vale do São Francisco, há grande variação quanto à densidade populacional de moscas das frutas, desde áreas totalmente livres, como algumas regiões em municípios da Bahia, até áreas com alta população que necessitam, continuamente, de intervenção para seu controle, como o Projeto de Perímetro Irrigado Senador Nilo Coelho. Os órgãos de proteção fitossanitária dos países importadores exigem, entretanto, que os pomares que se destinam à exportação sejam continuamente monitorados para que se conheça a população estabelecida de moscas-das-frutas (MALAVASI et al., 2007).

3.4. Métodos de controle de moscas-das-frutas e o Manejo Integrado de Pragas aplicado às moscas-das-frutas

A tendência moderna para conferir sustentabilidade aos sistemas recomenda a progressiva migração para técnicas de controle com o menor impacto possível sobre

organismos não alvos e que sejam inócuas do ponto de vista da contaminação ambiental e de resíduos de agroquímicos.

Os sistemas integrados de controle de pragas e doenças, com emprego de controle biológico, monitoramento populacional da praga, sistema de informação geográfica e aplicação de técnicas de controle das populações têm se desenvolvido significativamente nos últimos anos, permitindo a obtenção de frutas de alta qualidade.

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO, *apud* EMBRAPA (2007), o "Manejo Integrado de Pragas é o sistema de manejo de pragas que no contexto associa o ambiente e a dinâmica populacional da espécie, utiliza todas as técnicas apropriadas e métodos de forma tão compatível quanto possível e mantém a população da praga em níveis abaixo daqueles capazes de causar dano econômico".

Observa-se, ao longo do tempo, uma evolução dos métodos de controle de pragas. Tal evolução se baseia na mudança dos métodos antigos de controle, notadamente aplicações por calendário, que consideravam fixos os períodos de pulverizações, para um controle supervisionado, baseado no conhecimento da realidade de campo quanto à presença ou não de pragas, e quando presentes, dos níveis de infestação das pragas em campo, bem como na aceitação e a utilização de conceitos de controle integrado, como afirma Giudice *apud* Donadio (1994).

3.5. Controle autocida - Técnica do Inseto Estéril

A definição clássica para TIE considera tal técnica como um tipo de controle autocida ou genético, onde a praga é empregada para o seu próprio controle, como afirma Walder (2000). De forma bem simplificada pode-se dizer que a TIE é um método de “controle da natalidade” aplicada a insetos. Historicamente, cita-se o exemplo de erradicação da mosca da bicheira *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) como o de maior sucesso de uso da TIE em várias partes do mundo como as Ilhas de Sanibel e Captiva, localizadas no Golfo do México, estado da Florida/EUA; na ilha de Curaçao, localizada a 70 km da costa da Venezuela; no Sudoeste americano, em Porto Rico e no Sul da Califórnia. São citados vários outros exemplos como os de Honduras, El Salvador, Costa Rica, Panamá e Nicarágua. Em 1988/1989, a mosca da bicheira invadiu o Líbano e a África. Através dessa técnica a praga foi erradicada desses países em uma área de 40.000 Km², em outubro de 1991, após a liberação de 1,4 bilhões de moscas estéreis

importadas do México. Com o sucesso da aplicação da TIE na mosca da bicheira, houve grande estímulo para o desenvolvimento de programas visando o controle das moscas-das-frutas, (WALDER, 2000).

No Gráfico abaixo (Figura 3.1), observa-se que a TIE é mais efetiva quando aplicada em níveis populacionais mais baixos e quando o controle químico perde efetividade.

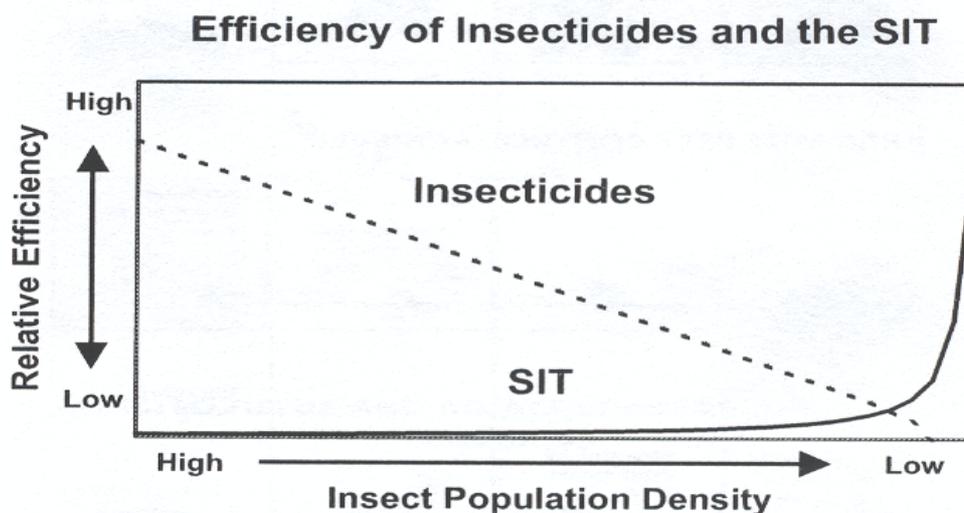


Figura 3.1 – Eficiência de Inseticidas e da TIE. (Fonte: Feldmann; Hendrichs, 2001)

3.6. Programas de ação que usam a TIE

Com a substituição gradual das barreiras alfandegárias pelas barreiras fitossanitárias, a fruticultura mudou seu perfil para atender às expectativas dos mercados. Além disso, a questão da segurança alimentar promoveu a mudança de comportamento dos consumidores, ávidos por produtos mais saudáveis. Desse modo, o uso de agentes biológicos de controle de pragas da fruticultura surgiu como uma alternativa que agrega maior valor ao produto e oferece maior segurança para os consumidores.

Devido a sua grande importância econômica e facilidade de criação artificial, as moscas-das-frutas foram candidatas a programas de erradicação em várias partes do mundo. Dentre todos os programas de erradicação e/ou supressão populacional de moscas-das-frutas, é importante destacar o Programa MOSCAMED realizado no México

e na Guatemala, o Programa de erradicação da mosca do melão (*Bactrocera curcubitae*) nas ilhas do Japão e, na América do sul, os programas de erradicação de *C. capitata* no Chile e na região de Mendoza, Argentina (WALDER, 2000).

Segundo ainda Walder (2000), o primeiro teste de campo com *Ceratitidis capitata* estéreis foi realizado, entre 1950-1960, no Havaí. Durante 13 meses, uma área piloto recebeu, semanalmente, insetos estéreis, reduzindo a população selvagem inicial em cerca de 90%.

Em um cenário mundial em que a questão da segurança alimentar é de vital importância, tanto na disponibilidade de alimentos quanto na qualidade desses alimentos, o uso de técnicas que priorizem a redução de impactos ao meio ambiente e coloquem à disposição dos consumidores produtos livres de riscos à saúde humana tem ocupado, cada vez mais, um lugar de destaque.

3.7. Criação massal de linhagens não transgênicas

A busca por alternativas eficientes no controle de pragas, que sejam de baixo impacto ambiental e de baixo custo econômico, tem sido permanente. Neste contexto, a Técnica do Inseto Estéril (TIE) surge como uma alternativa viável, sendo considerada um controle autocida ou genético, onde a praga é empregada para o seu controle, cuja introdução desta técnica no controle de pragas contribuiu para o desenvolvimento e até mesmo a criação de novas áreas como a Radioentomologia (WALDER, 2000), com destaque para a criação de insetos em meio artificial, para o estabelecimento de uma criação massal.

Sem margem para dúvida, a melhoria do uso da TIE está fortemente ligada aos avanços no processo da criação massiva. Um dos trabalhos mais importantes neste processo resulta na busca contínua para reduzir custos de operação ao tempo em que se mantém ou melhora a qualidade do inseto produzido (DOMÍNGUEZ; ARTIAGA-LOPEZ; SOLÍS, 2010). Dessa forma, a produção de insetos em número suficiente e com a qualidade adequada é um dos principais requerimentos para o sucesso da TIE.

3.8. Métodos de esterilização

Segundo Parker (2008), a Técnica do Inseto Estéril, que é usada em muitos países para supressão populacional, usa radiação ionizante para esterilizar insetos no processo de criação massiva. A irradiação gama proveniente do Co ou do Cs, que podem ionizar átomos e quebrar ligações moleculares, tem sido usada extensivamente para esterilizar diferentes insetos praga. Recentemente, entretanto, o transporte dessas fontes de radiação tem se tornado problemática, principalmente no que concerne à segurança do transporte de isótopos radioativos. Vários países já não permitem mais tal transporte dentro de suas fronteiras. Como resultado desse problema, foi iniciada uma avaliação de fontes alternativas de radiação que podem ser utilizadas na esterilização de insetos e, uma dessas fontes é a máquina de raios X. A principal vantagem desta alternativa é a possibilidade de transportar esse equipamento sem os riscos e os cuidados especiais relativos à logística de proteção radiológica, que demandam altíssimos custos.

A Moscamed Brasil é a primeira biofábrica de inseto estéril do mundo a receber uma máquina de raios X especialmente desenhada para esterilização de insetos (Rad Source Inc., www.radsourse.com). Este novo tipo de equipamento, possui capacidade para esterilizar até 20 litros de pupas de moscas-do-mediterrâneo em 15 minutos, ou seja, mais de 5 milhões de insetos por hora. Mas, como todo equipamento que emite radiação ionizante, a dose de radiação recebida pelos insetos varia de acordo com a proximidade ou afastamento da fonte emissora e, desta forma, não existe uma dosagem uniforme de radiação esterilizante. O processo de irradiação nos programas de TIE é crucial. Insetos que recebem doses abaixo da recomendada não ficam totalmente estéreis e não servem para os propósitos de TIE. Por outro lado, doses muito altas resultam em insetos com baixa competitividade contra insetos selvagens devido aos efeitos colaterais da radiação, o que também não é desejável.

Uma alternativa a ser considerada é o uso de transgenia para a esterilização de insetos, cuja principal característica é causar esterilidade através da indução de mutação letal dominante por transgenia sem causar danos ao comportamento dos insetos e consequentemente melhor performance em campo, na competitividade com machos selvagens na busca de fêmeas selvagens (THOMAS et al., 2000).

3.9. TIE e o uso de linhagens transgênicas

Os benefícios ambientais do uso da Técnica do Inseto Estéril (TIE) são inegáveis e, segundo Alphey (2006), ela tem sido usada com sucesso contra diversas espécies de insetos. No entanto, a genética moderna pode proporcionar várias melhorias na logística ou na segurança de um programa com o uso da TIE. Entre estas, incluem-se: melhoria da identificação de indivíduos liberados, proporcionada por um marcador genético que permite a fácil discriminação entre o tipo selvagem e os insetos estéreis liberados; eliminação da necessidade de esterilização por radiação, fornecendo uma linhagem com "esterilização genética"; redução do perigo representado pela liberação acidental de insetos não-irradiados ou fuga na instalação de criação massal; organização dos insetos que precisam de uma condição artificial prevista, por exemplo, um suplemento dietético, a fim de sobreviver ou reproduzir; fornecimento automatizado de separação de sexo antes da liberação, para eliminar as fêmeas da população a ser liberada ("sexagem genética"). Nenhum destes pontos é, necessariamente, inatingível pelos métodos clássicos. No entanto, o uso de métodos de recombinação de DNA pode permitir que esses benefícios sejam alcançados em um curto período e ser transferidos mais facilmente de uma espécie de praga para outra do que são os produtos de genética clássica.

Esta técnica é chamada de Liberação de Insetos com Letal Dominante (RIDL - da sigla em inglês, Release of Insects carrying a Dominant Lethal). Testes realizados por Morrison et al., (2009) para avaliar a competitividade sexual de uma linhagem transgênica de mosca-do-mediterrâneo, com moscas selvagens da Argentina, mostraram que a performance da linhagem transgênica OX3376B foi, a princípio, aceitável em termos de TIE, mas necessitavam de pesquisas adicionais para aprofundar as conclusões.

O Brasil, através da Moscamed Brasil, é um dos líderes mundiais com os experimentos de liberação de moscas-das-frutas transgênicas e é o primeiro país no mundo a autorizar a liberação desses insetos em campo aberto. O que, entretanto ainda não aconteceu, devido ao fato dos critérios de biossegurança ainda estarem em fase de discussão entre o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e a Moscamed Brasil.

Referências

ALPHEY, L. S. **Engineering insects for SIT**. Oxford: Department of Zoology, Oxford University, 2006.

BARBOSA, F. R.; PARANHOS, B. A. J. Artrópodes-praga associado à cultura da mangueira no Brasil e seu controle. In: MENEZES, E. A.; BARBOSA, F. R. (Org.). **Pragas da mangueira: monitoramento, nível de ação e controle**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2005. p. 17-50.

DONADIO, L. C.; GRAVENA, S. **Manejo integrado de pragas dos citros**. Campinas: Fundação Cargill, 1994.

DOMÍNGUEZ, J.; ARTIAGA-LÓPEZ, T.; SOLÍS, E. H. Métodos de colonización y cría masiva. In: MONTOYA, P.; TOLEDO, J.; HERNÁNDEZ, E. (Ed.). **Moscas de la fruta: fundamentos y procedimientos para su manejo**. México, DF: SyG Editores, 2010. p. 259-276.

EMBRAPA. **Cultivo de milho – manejo integrado de pragas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. (Sistema de Produção, 2). Disponível em: www.cnpms.embrapa.br. Acesso em: 03 out. 2014.

FELDMANN, U.; HENDRICH, J. **Integrating the sterili insect technique as a key component of area-wide tsetse and trypanosomiasis intervention**. (PAAT - Programma Against Africa Trypanossomiasis). Rome, Italy: FAO, 2001. (Technical and Scientific Series, 3).

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.

KNIPLING, E. F. **The basic principles of insect population suppression and management**. Washington, DC: USDA, 1979. 659 p. (Handbook, 512).

MALAVASI, A.; NASCIMENTO, A. S.; VIANA, R. E.; GONÇALVES, N. **Guia de armadilhamento de moscas-das-frutas**. Juazeiro: MOSCAMED, 2007.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**. Conhecimento Básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. 327 p.

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* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 133, p. 146-153, 2009.

PARKER, A.; JESSUP, A.; METHA, K.; MEMON, R.; MASTRANGELO, T.; PEREIRA, R.; HENDRICH, J. Assessment of X-ray irradiation for fruit fly sterilization. In: MEETING OF THE WORKING GROUP ON FRUIT FLIES OF THE WESTERN HEMISPHERE, 7., 2008, Mazatlan, Mexico.

PEREIRA, R. C.; CARVALHO, J. P. Trap utilization by Mediterranean fruit fly populations in citrus grove in Portugal. In: McPHERRON, B. A.; STECK, G. J. (Ed.). **Fruit fly pests: A world assessment of their biology and management**. Delray Beach: St. Lucie Press, 1996. p. 135-140.

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

VILELA, E. F.; ZUCCHI, R. A; CANTOR, F. **Histórico e impactos das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 173 p.

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.

4. Estabelecimento de criação massal de linhagem transgênica OX3864A, de *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Díptera: Tephritidae), no Brasil

Resumo

A busca por alternativas eficientes no controle de pragas, de baixo impacto ambiental e de baixo custo econômico, tem sido permanente. Neste contexto, a Técnica do Inseto Estéril (TIE) surge como uma alternativa viável, sendo considerada um controle autocida ou genético, onde a mesma espécie é empregada para o seu controle. Sem margem para dúvida, a melhoria da TIE depende aos avanços no processo da criação massal. Um dos trabalhos mais importantes neste processo resulta na busca contínua para reduzir custos de operação, ao tempo em que se mantém ou melhora a qualidade do inseto produzido. Os benefícios ambientais do uso da TIE são inegáveis. Esta técnica tem sido usada com sucesso no controle de diversas espécies de insetos-pragas. No entanto, a genética moderna pode proporcionar várias melhorias na logística ou segurança de um programa com o uso da TIE. O uso de métodos de recombinação de DNA pode permitir que esses benefícios sejam alcançados em um curto período e ser transferidos mais facilmente de uma espécie de praga para outra. O objetivo do trabalho foi solucionar problemas identificados no estabelecimento da criação da linhagem transgênica OX3864A, no que diz respeito à qualidade das pupas e implementar ajustes no processo de criação de *Ceratitis capitata*, a partir da definição da proporção de ovos a ser inoculada por quilograma de dieta, tomando-se, como base para a avaliação, os parâmetros de qualidade mínimos estabelecidos pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA) para linhagem tsl Vienna 8 de *C. capitata*. O estabelecimento da colônia de *C. capitata*, linhagem transgênica, e os experimentos foram conduzidos no Laboratório Nível 2 de Biossegurança, da Biofábrica Mosamed Brasil (BMB), Juazeiro/Bahia, em salas sob condições ambientais controladas. Pelos resultados obtidos, verificou-se que a melhor proporção de ovos na dieta para a criação, foi 1,5 mL/3 kg, respeitados os parâmetros internacionais para o controle de qualidade dos insetos produzidos em criação massal de *C. capitata* e que a dieta larval adotada pela BMB, para a linhagem tsl Vienna 8, pode ser usada para a criação massal da linhagem transgênica OX3864A sem afetar o rendimento e os padrões de qualidade requeridos para o uso da linhagem na TIE. A linhagem transgênica OX3864A, pode ser considerada como uma alternativa para produção de machos em criação massal.

Palavras-chave: Criação massal. *Ceratitis capitata* transgênica. Parâmetros de qualidade. Dieta Larval.

Abstract: Mass rearing establishment of the transgenic strain OX3864A of *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae) in Brazil.

The search for efficient alternatives to control pests, with low environmental impact and low economic costs, has been permanent. In this context, the Sterile Insect Technique (SIT) arises as a viable alternative, considered genetic or autocide, in which the pest is used for its control. Improvements on SIT depend of the advances on its mass rearing process. One of the most important actions in this process results on the continuous search to reduce operational costs while keeping or improving the final quality of the produced insect. The environmental benefits of the use of SIT are undeniable. This technique is being successfully used on the control of various species of pests. Nonetheless, modern genetics can provide many improvements in logistics and safety of a program using SIT. The use of DNA recombination methods can bring benefits that could be reached in a shorter period of time and being transferred easier from specie to another. The aim of this study was to solve problems identified in the establishment of the mass rearing of OX3864A transgenic strain with regard to pupae quality and implementation of adjustments in the mass rearing process of *Ceratitis capitata*, since the definition of the egg proportion to be inoculated per kilogram of diet considering the minimal quality standards determined by International Atomic Energy Agency (IAEA) for tsl Vienna 8 strain of *C. capitata*. The establishments of transgenic *C. capitata* colony, as well as the experiments have been conducted in controlled conditions rooms at the Level 2 Biosafety lab at Moscamed Brazil (MB) facility in Juazeiro, Bahia. Results have shown that the best proportion of eggs in the rearing diet was 1,5 mL/3 kg respecting the international quality control standards for mass reared *C. capitata* and that the larval diet used by MB facility on the mass rearing of tsl Vienna 8 can be used for OX3864A transgenic strain without affecting the yield and quality standards requested for the use of the strain on SIT. The transgenic strain OX3864A, can be considered as an alternative for production in mass rearing.

Keywords: Mass rearing. Transgenic *Ceratitis capitata*. Quality standards. Larval diet.

4.1. Introdução

A busca por alternativas eficientes no controle de pragas, de baixo impacto ambiental e de baixo custo econômico, tem sido permanente. Neste contexto a Técnica do Inseto Estéril (TIE) surge como uma alternativa viável, sendo considerada um controle autocida ou genético, onde a praga é empregada para o seu controle, cuja introdução desta técnica no controle de pragas contribuiu para o desenvolvimento de novas ferramentas (WALDER, 2000), com destaque para a criação de insetos em meio artificial, também conhecida com criação, ou criação massal.

Sem margem para dúvida, a melhoria da TIE está fortemente ligada aos avanços no processo da criação massal. Um dos trabalhos mais importantes neste processo resulta na busca contínua para reduzir custos de operação, ao tempo em que se mantém ou melhora a qualidade do inseto produzido (DOMÍNGUEZ; ARTIAGA-LOPEZ; SOLÍS, 2010). Dessa forma, a produção de insetos em número suficiente e com a qualidade adequada é um dos principais requerimentos para o sucesso da TIE.

Desde agosto de 2006, a Biofábrica Moscamed Brasil (BMB) produz, em larga escala, machos estéreis de *Ceratitidis capitata* (Díptera: Tephritidae), linhagem baseada em mutação, *temperature sensitive letal* Vienna 8 (tsl V-8), desenvolvida, pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), com o propósito de controlar esta espécie no Vale do São Francisco. Recentemente, em setembro de 2012, foi introduzida a linhagem transgênica de *C. capitata*, OX3864A, com a finalidade de se avaliar seu comportamento, assim como as possíveis vantagens quando comparada com a linhagem tsl V-8, para emprego futuro na TIE. Um dos requisitos principais para aplicação da técnica é, justamente, a produção em larga escala do inseto desejado.

Os benefícios ambientais do uso da TIE são inegáveis. Esta técnica tem sido usada com sucesso no controle de diversas espécies de insetos-pragas. No entanto, a genética moderna pode proporcionar várias melhorias (vantagens) na logística ou segurança de um programa com o uso da TIE. Entre estas incluem-se: aperfeiçoar a identificação (ou o método de identificação) dos indivíduos liberados, proporcionada por um marcador genético que permite a fácil discriminação entre o tipo selvagem e os insetos estéreis liberados; eliminação da esterilização por radiação, fornecendo uma linhagem com "esterilização genética"; redução do perigo representado pela liberação acidental de insetos não-irradiados ou fuga na instalação de criação massal. Nenhum destes pontos é necessariamente inatingível pelos métodos clássicos. No entanto, o uso

de métodos de recombinação de DNA podem permitir que esses benefícios sejam alcançados em um curto período e ser transferidos mais facilmente de uma espécie de praga para outra, do que são os produtos de genética clássica (ALPHEY, 2002).

Um dos principais desafios da criação, senão o principal é a definição do meio artificial (dieta) adequado para a multiplicação dos insetos. Além do que, a dieta artificial representa um dos custos mais altos do processo de produção.

O objetivo do trabalho foi solucionar problemas identificados no estabelecimento da criação da linhagem transgênica OX3864A, no que diz respeito à qualidade das pupas e implementar ajustes no processo de criação de *Ceratitits capitata*, a partir da definição da proporção de ovos a ser inoculada por quilograma de dieta, tomando-se, como base para a avaliação os parâmetros de qualidade mínimos estabelecidos pela AIEA para linhagem tsl V-8 de *C. capitata* (FAO/IAEA/USDA, 2003; 2014).

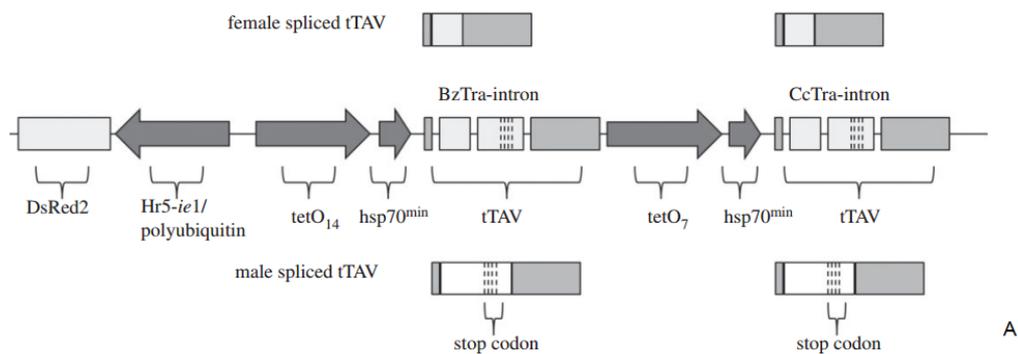
4.2. Material e métodos

O estabelecimento da colônia de *C. capitata*, linhagem transgênica OX3864A, assim como os experimentos foram conduzidos no Laboratório Nível 2 de Biossegurança, da BMB, em Juazeiro/Bahia, em salas sob condições ambientais controladas [temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa (UR) de $50 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas].

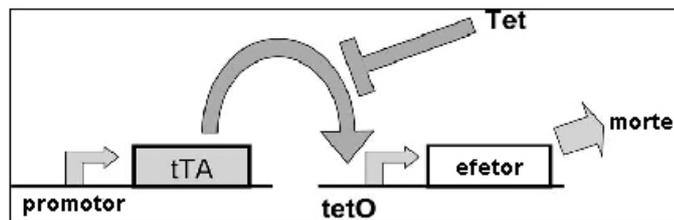
4.2.1. Material biológico

A linhagem transgênica da mosca-do-mediterrâneo, *C. capitata* utilizada nos experimentos foi a OX3864A, gerada a partir de material biológico proveniente da cepa TOLIMAN originária da Guatemala (LEFTWICH et al., 2014). A transformação genética foi conduzida no laboratório de criação de insetos da Empresa Oxitec Ltd, Oxford, Reino Unido, utilizando métodos padrões de transformação de insetos. Estes métodos são baseados em microinjeção usando um sistema não-autônomo de *transposon* (HANDLER; MCCOMBS, 1998), o qual tem sido utilizado para a transformação genética de várias espécies de moscas-das-frutas, bem como do conhecido modelo genético *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) (HANDLER et al., 1998; HANDLER; MCCOMBS, 2000; HANDLER; HARRELL, 2001; CONDON et al., 2007). O *transposon* específico usado na construção da linhagem OX3864A de *C. capitata* foi o *piggyBac*

(LEFTWICH et al., 2014). Esta linhagem carrega, como marcador, a proteína fluorescente DsRed2. Além disso, possui, em seu genoma, o gene ativador de transcrição tetraciclina-repressível (tTA), sendo que tTA funciona tanto como transativador, quanto efetor letal do sistema de letalidade repressível fêmea-específico (Figura 4.1) (GONG et al., 2005).



A



Fonte: Alphey 2002

B

Figura 4.1 - Esquema do sistema de expressão utilizado para gerar a letalidade específica em fêmeas de *Ceratitis capitata*, linhagem OX 3864A. a) Elementos da construção genética; b) Sistema de letalidade repressível fêmea-específico tetO/tTA (A)

4.2.2. Adaptação e estabelecimento da colônia de *C. capitata*, linhagem transgênica OX3864A no Brasil

A criação de *C. capitata*, linhagem OX3864A, iniciou-se, em setembro de 2012, a partir de 2000 pupas provenientes do laboratório de criação de insetos, da Empresa Oxitec Ltd, Oxford, Reino Unido. As pupas recebidas foram acondicionadas em quatro gaiolas adaptadas de embalagem de balas (3,5L de capacidade), de plástico transparente, com tecido voal na parte lateral (6x10cm), adaptado como superfície para a oviposição das moscas fêmeas (Figura 4.2). As gaiolas foram provisionadas com dieta artificial e água *ad libitum*. A dieta foi composta por açúcar refinado e levedura hidrolisada (Biones®) na proporção de 3:1 (SILVA NETO et al., 2012). No terceiro dia após a emergência dos insetos, placas de Petri (90X15 mm) contendo água filtrada foram acondicionadas sob as gaiolas para coleta dos ovos (Figura 4.2). A coleta de ovos foi realizada, a cada 24h durante 10 dias consecutivos, com ajuda de um pincel macio. Foi medido o volume dos ovos coletados e, posteriormente, inoculados em dieta artificial.

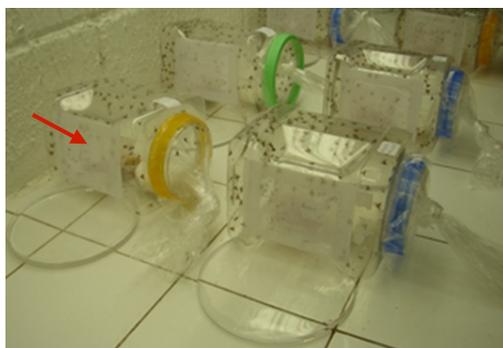


Figura 4.2 - Gaiolas adaptadas com volume de 3,5L. Seta vermelha mostrando superfície para a oviposição

Para o estabelecimento da colônia, os ovos foram semeados sobre fitas de papel higiênico neutro, acondicionados em bandejas plásticas (57x37x2,7cm) contendo dieta larval (Figura 4.3a). A dieta larval foi composta de: bagaço de cana (13,4%), açúcar (8,24%), farinha de soja (8,24%), levedura de cerveja (8,24%), benzoato de sódio (0,2%), ácido cítrico (1,7%), Nipagin (0,24%) e Tetraciclina® (0,01%). A dieta descrita é utilizada pela BMB para a criação massal da linhagem de *C. capitata* tsl V-8, porém com adição de Tetraciclina® na proporção de 0,10 g/kg de dieta.

A linhagem transgênica OX3864A carrega um transgene condicional que expressa o fator de transcrição tTA. Este fator se liga a um promotor levando a expressão da proteína letal fêmea específica (LEFTWICH et al., 2014). Na presença de Tetraciclina® no substrato larval, o sistema é desativado e a produção da colônia é normal, ou seja, indivíduos machos e fêmeas são produzidos na proporção 1:1. O fato de não ser colocado este antibiótico na dieta larval garante apenas a recuperação de pupas de machos, pois as fêmeas precisam de concentrações adequadas de Tetraciclina® no substrato larval para completar seu ciclo biológico.

Após a inoculação dos ovos em dieta, as bandejas foram cobertas com tecido voal, acondicionadas em carrinhos de produção e mantidas sob condições controladas ($T=25\pm 2^{\circ}\text{C}$, $\text{UR}=70\pm 10\%$, fotofase de 14h) (Figura 4.3b).

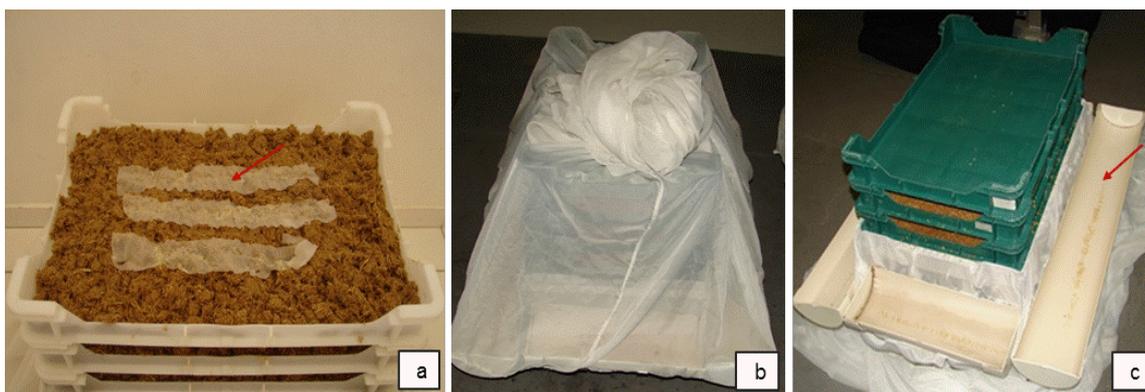


Figura 4.3 – Etapas do desenvolvimento larval de *C. capitata*, linhagem OX3864A. a) Bandejas contendo dieta artificial (seta vermelha mostrando fitas de papel higiênico); Carrinho de produção acondicionado bandejas cobertas com tecido voal; c) Coleta de larvas do 3º estágio (seta mostrando detalhe da canaleta com as larvas coletadas)

Transcorridos sete dias após a inoculação, as larvas iniciaram o salto para fora da dieta à medida que atingiram o 3º estágio de desenvolvimento, na busca de um substrato para formação do pupário. As larvas foram coletadas em calhas com água localizadas nas laterais do carrinho de produção (Figura 4.3c). Em seguida, as larvas foram acondicionadas em novas bandejas (38x27x10 cm) contendo vermiculita como substrato para formação da pupa (Figura 4.4a) e mantidas, durante oito dias, em sala escura também sob condições controladas ($T=25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e UR de $70 \pm 10\%$). Dois dias antes da emergência dos adultos, a vermiculita foi peneirada para recuperação das pupas, que posteriormente teve seu volume medido (Figura 4.4b).

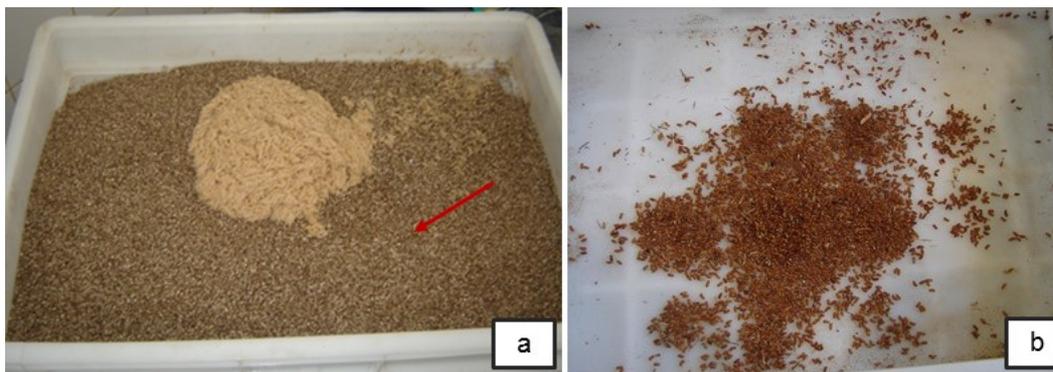


Figura 4.4 – Larvas de *C. capitata* linhagem OX3864A acondicionadas em bandejas contendo vermiculita (seta vermelha); b) Pupas de machos e fêmeas

Com as pupas recuperadas em outubro de 2012, iniciou-se a geração F2. A partir desta geração, para a manutenção dos insetos adultos, foram utilizadas gaiolas tipo “sanduiche” (77x71x10,5cm), com estrutura, fundo e topo de alumínio, e com duas laterais de tecido voal como superfície para a oviposição (Figura 4.5). Em cada gaiola, foram acondicionadas 5 canaletas, sendo 2 para a colocação das pupas prestes a emergir, 2 para o alimento (3 açúcar : 1 proteína hidrolisada Biones®) (SILVA NETO et al., 2012) e 1 para água. O alimento e a água foram colocados em quantidade suficiente para todo o período de vida dos adultos, sem necessidade de reposição. Cada gaiola comportou 300 mL de pupas de segunda coleta larval, com uma proporção estimada de 1♀:1♂. Após constatado o início das cópulas, bandejas de acrílico (83x40x6 cm) contendo água filtrada foram posicionadas sob as gaiolas para coleta dos ovos (Figura 4.5). O período de coleta de ovos estendeu-se por 11 dias. Entretanto, os ovos da primeira coleta foram descartados para todos os lotes de produção.

Para cada geração, realizaram-se apenas duas inoculações de ovos em dieta larval, seguindo a metodologia supracitada. A partir da geração F2 para a inoculação dos ovos em dieta, adotou-se a proporção de 1,5 mL de ovos/3 kg de substrato larval.



Figura 4.5 – Gaiolas de adulto tipo “sanduiche” com bandeja de acrílico embaixo para coleta de ovos de *C. capitata* (seta vermelha)

Em novembro de 2014, seguindo as orientações da equipe técnica da Oxitec Ltd, fez-se necessário o descarte da linhagem, após 36 gerações, devido à contaminação da colônia com indivíduos recombinantes. A partir de informações obtidas dos testes de controle de qualidade, foi detectada a recuperação de fêmeas provenientes de dieta larval sem a presença do antibiótico Tetraciclina® (fêmea recombinante).

4.2.3. Parâmetros de produção e qualidade da linhagem transgênica de *C. capitata*, OX3864A

Rotineiramente, para cada lote de produção, foram retiradas amostras das fases de desenvolvimento: ovo e pupa, para a avaliação de parâmetros de qualidade, seguindo os protocolos estabelecidos pela FAO/IAEA/USDA (2003/2014) para a linhagem tsl V-8 de *C. capitata*. Os parâmetros avaliados foram:

Rendimento ovo-pupa - foi determinado através da relação: nº de pupas recuperadas/nº de ovos inoculados. Esta avaliação é de extrema importância, pois revela a qualidade nutricional do substrato utilizado na criação e o potencial reprodutivo e biológico de cada linhagem em particular.

Peso da pupa - verificou-se em balança analítica de precisão, modelo AR3130 e desvio de 0,001g, sendo pesadas cinco amostras contendo 100 pupas cada, com

5 dias de idade. Finalizada esta avaliação, retirou-se uma amostra de pupas, sendo avaliado o número de pupas/mL.

Razão sexual - a razão sexual (RS) determinou-se através da fórmula: $RS = \frac{n^\circ \text{ de fêmeas}}{n^\circ \text{ de fêmeas} + n^\circ \text{ de machos}}$.

Emergência e adultos voadores (%) - Para avaliação destes parâmetros, uma amostra de 10 mL de pupas foi retirada de cada lote de produção, sendo a mesma dividida em cinco sub-amostras aleatoriamente, cada uma contendo cem pupas. As pupas foram colocadas no centro de um anel de papel sulfite (1 cm de altura e diâmetro de 3 cm) e acondicionadas dentro de placas de Petri (90x15 mm). Em seguida, sobre estas placas, foram colocados tubos negros de PVC (altura de 10 cm e 9cm de diâmetro interno), polvilhados com talco inodoro nas paredes internas para impedir que as moscas saíssem caminhando através das paredes (Figura 4.6a). Os tubos foram transferidos para gaiolas de acrílico (30x30x30 cm) contendo pisos adesivos de cor amarela (5x5cm) pendurados no teto para captura dos adultos voadores (Figura 4.6b). Após cinco dias da emergência dos adultos, avaliou-se o material, contabilizando-se o número de adultos semi-emergido (SE), normal não voador (NN), não voador defeituoso (DF) e pupário fechado (PF). A emergência foi determinada através da fórmula: $(\frac{n^\circ \text{ adultos emergidos}}{\text{total de pupas}}) \times 100$. Para o cálculo do percentual de voadores, utilizou-se a fórmula: $100 - (PF + SE + NN + DF) \times 100$ (FAO/IAEA/USDA, 2003).

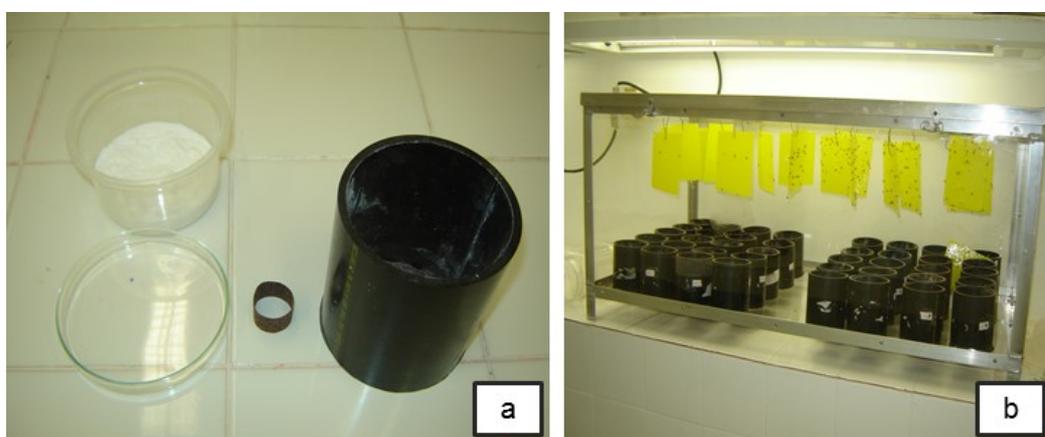


Figura 4.6 – Testes de emergência e habilidade de voo de adultos. a) Modelo de tubo utilizado para teste de habilidade de voo; b) Gaiola contendo tubos de PVC com pupas e painéis amarelos para o teste de adultos voadores

4.2.4. Relação ovos inoculados/kg de dieta larval para manutenção da colônia transgênica de *C. capitata*, linhagem OX3864A

Com a finalidade de estabelecer a metodologia de criação da linhagem transgênica OX3864A de *C. capitata*, conduziu-se experimento para definir a melhor relação ovos/kg de dieta visando obter pupas e adultos de boa qualidade. Para isso, ovos do quarto dia de postura das fêmeas foram semeados em bandejas contendo a dieta artificial descrita anteriormente. Tomando-se em consideração que, para a manutenção da colônia matriz (machos e fêmeas), adiciona-se a Tetraciclina à dieta (formulação 1) e, para a produção de machos, somente, a Tetraciclina é subtraída da dieta larval (formulação 2) (Morrison et al., 2009), neste experimento foram testadas as duas combinações de dieta larval (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Formulações das dietas artificiais utilizadas para o desenvolvimento larvário de *C. capitata* linhagem transgênica OX3864A, adaptadas pela BMB*

Ingredientes	Formulação 1	Formulação 2
Bagaço de cana	13,4	13,4
Farinha de soja	8,24	8,24
Levedura de cerveja	8,24	8,24
Açúcar cristal	8,24	8,24
Methylparaben (Nipagin)	0,24	0,24
Benzoato de sódio	0,2	0,2
Acido cítrico	1,7	1,7
Tetraciclina	0,01	—
Água filtrada	59,73	59,74

* Os valores representam a % de cada ingrediente por cada 100 gramas de dieta larval.

As proporções de ovos inoculadas/kg de dieta no experimento foram: tratamento 1 (T1) = 0,5 mL/3 kg, tratamento 2 (T2) = 1,0 mL/3 kg e tratamento 3 (T3) = 1,5 mL/3kg. Para cada tratamento, utilizaram-se sete repetições. Cada 1mL de ovos corresponde a 25.000 ovos de *C. capitata*. Foram usadas bandejas plásticas (29x22x7,5 cm) contendo 1 kg de dieta artificial, portanto, em função disto, as proporções de ovos foram reajustadas respectivamente (0,17; 0,33 e 0,5 mL de ovos). Após a inoculação dos ovos, as bandejas foram mantidas em salas com condições de temperatura, umidade e fotofase controladas (temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa (UR) de $50 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas).

Depois de cinco dias do início do salto das larvas, foi medido o volume (mL) do material recuperado (pupas) de cada tratamento/repetição para avaliar o rendimento ovo-pupa/tratamento. Este parâmetro foi determinado por meio da relação: Rendimento ovo-pupa = nº de pupas recuperadas/nº de ovos inoculados. Finalizada esta avaliação, retirou-se, de cada repetição, uma amostra de pupas para avaliação dos parâmetros de qualidade: pupas/mL (nº), peso de pupa (mg), emergência de adultos (%), habilidade de voo (%) e razão sexual da progênie para cada tratamento testado seguindo as metodologias descritas (FAO/IAEA/USDA, 2003).

4.2.5. Análise dos dados

O delineamento experimental utilizado no experimento foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com três tratamentos e sete repetições, sendo os tratamentos constituídos por três proporções de ovos/kg de dieta. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) mediante a utilização do programa STATISTICA, versão 6.0. Para a comparação das médias, utilizou-se o teste de Tukey (5 % de significância). Previamente às análises, determinou-se a normalidade e homocedasticidade, por meio dos testes de Kolmogorov-Smirnov ($P > 0,05$) e Cochran C, Hartley, Bartlett ($P > 0,05$), respectivamente.

4.3. Resultados

Densidade de ovos inoculados/kg de dieta larval para manutenção da colônia transgênica de *C. capitata*, linhagem OX3864A

Com o aumento da densidade de ovos/kg de dieta larval, observou-se um aumento no volume de pupas machos e/ou fêmeas recuperadas a partir das duas formulações de dieta artificial testadas (Tabelas 4.2 e 4.3). O maior volume de pupas por quilograma de dieta artificial foi obtido no tratamento 3, seguido, em ordem decrescente, dos tratamentos 2 e 1 para as formulações de dieta 1 e 2 (Tabelas 4.2 e 4.3). Apesar dos tratamentos 1 e 2 terem apresentado volumes menores de pupas, as pupas recuperadas foram as mais pesadas no caso da dieta normal (machos e fêmeas) o que é normal pela maior disponibilidade de alimento por larva. O contrário ocorreu com a dieta sem antibiótico (só machos) onde a concorrência por dieta foi menor. O comportamento observado neste experimento deve-se à quantidade de ovos inoculados nos diferentes tratamentos, considerando que o substrato larval utilizado nos três tratamentos foi o mesmo.

Tabela 4.2 - Parâmetros avaliados para pupas de machos e fêmeas de *C. capitata* linhagem transgênica OX3864A desenvolvidas em dieta artificial com tetraciclina (formulação 1) e com diferentes densidades de ovos/kg de dieta

Tratamento	Parâmetros de Qualidade (X±EP)		
	Vol total de pupas (ml)	Pupas/ ml (und)	Peso da pupa (mg)
T1	40,43 ± 1,79 c	49,24 ± 0,68	8,63 ± 0,02 a
T2	102,29 ± 4,01 b	48,33 ± 0,53	8,64 ± 0,03 a
T3	171,71 ± 2,74 a	49,24 ± 0,38	8,52 ± 0,04 b

As colunas representam a média do tratamento ± o erro padrão (EP). Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, apresentam diferenças estatisticamente significativas, Teste de Tukey 5% significância. Volume de pupas F=38,53 e P<0,0001; Pupas/ml: F=0,83 e P=0,4427; Peso da pupa: F=5,22 e P<0,05.

Tabela 4.3 - Parâmetros avaliados para pupas de machos de *C. capitata* linhagem transgênica OX3864A desenvolvidas em dieta artificial sem tetraciclina (formulação 2) e com diferentes densidades de ovos/kg de dieta

Tratamento	Parâmetros de Qualidade (X±EP)		
	Vol total de pupas (ml)	Pupas/ ml (und)	Peso da pupa (mg)
T1	17,14 ± 1,79	54,10 ± 0,44	8,01 ± 0,04 b
T2	48,14 ± 4,01	54,43 ± 0,60	8,17 ± 0,05 ab
T3	101,86 ± 2,74	53,14 ± 0,57	8,24 ± 0,06 a

As colunas representam a média do tratamento ± o erro padrão (EP). Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, apresentam diferenças estatisticamente significativas, Teste de Tukey 5% significância. Volume de pupas F=205,83 e P<0,0001; Pupas/ml: F=1,51 e P=0,2292; Peso da pupa: F=5,94 e P<0,05.

Os resultados de rendimento ovo-pupa são apresentados na Figura 4.7 Para a formulação 1 (dieta contendo Tetraciclina), o tratamento 3 apresentou o melhor resultado (0,67 ± 0,05), entretanto não houve diferença estatística entre os tratamentos (F=1,87 e P=0,1826). Para a formulação 2, foram observadas diferenças significativas entre as três densidades de ovos testadas (F=21,37; P<0,0001).

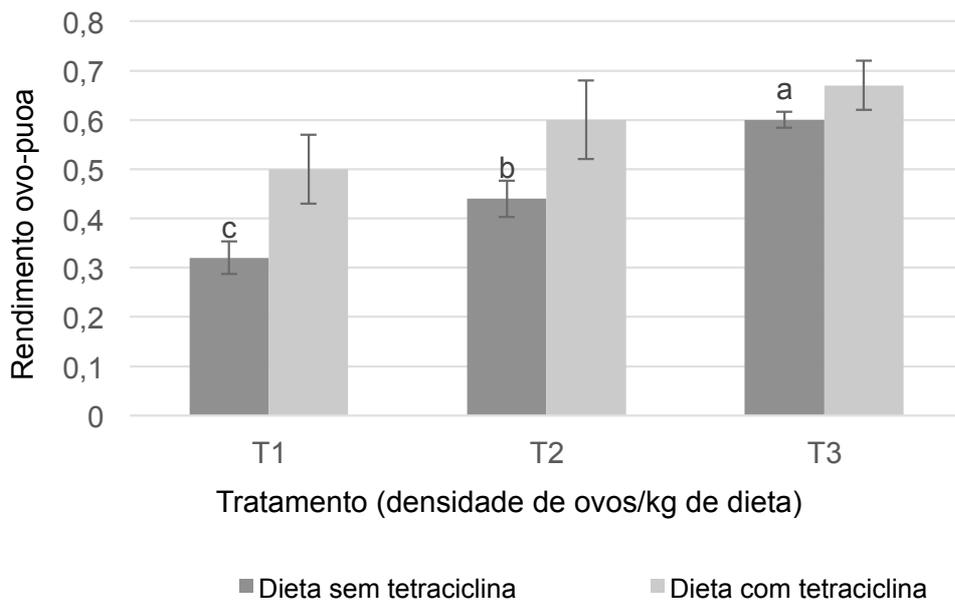


Figura 4.7. - Rendimento ovo-pupa de *C. capitata* linhagem transgênica OX3864A. As colunas representam as médias \pm erro padrão. As colunas da mesma cor com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas (Teste Tukey, 5% de significância)

Os resultados de emergência e de adultos voadores são apresentados nas Figuras 4.8 e 4.9. O comportamento da emergência foi similar nos três tratamentos para as duas formulações de dietas testadas [(formulação 1: $F=1,12$; $P=0,3326$) (formulação 2: $F=0,01$; $P=0,9880$)], e com valores acima do parâmetro mínimo estabelecido para a linhagem tsl V-8 de *C. capitata*, segundo FAO/IAEA/USDA (2003).

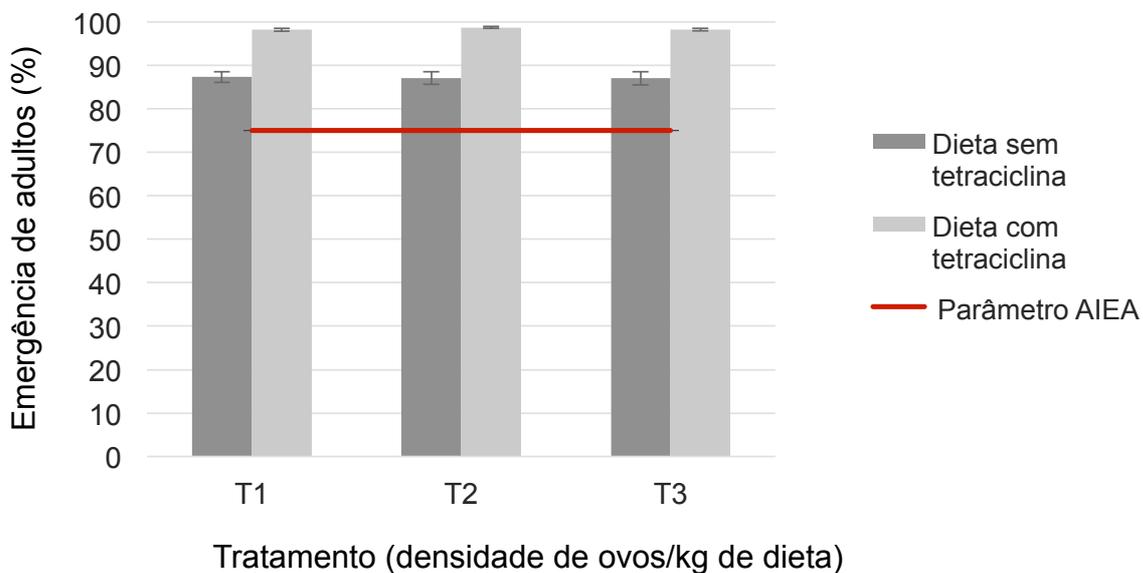


Figura 4.8 - Emergência de adultos de *C. capitata* linhagem transgênica OX3864A. As colunas representam as médias \pm erro padrão dos tratamentos. A linha vermelha representa o valor mínimo aceitável estabelecido pela AIEA para a linhagem tsl V-8 de *C. capitata*

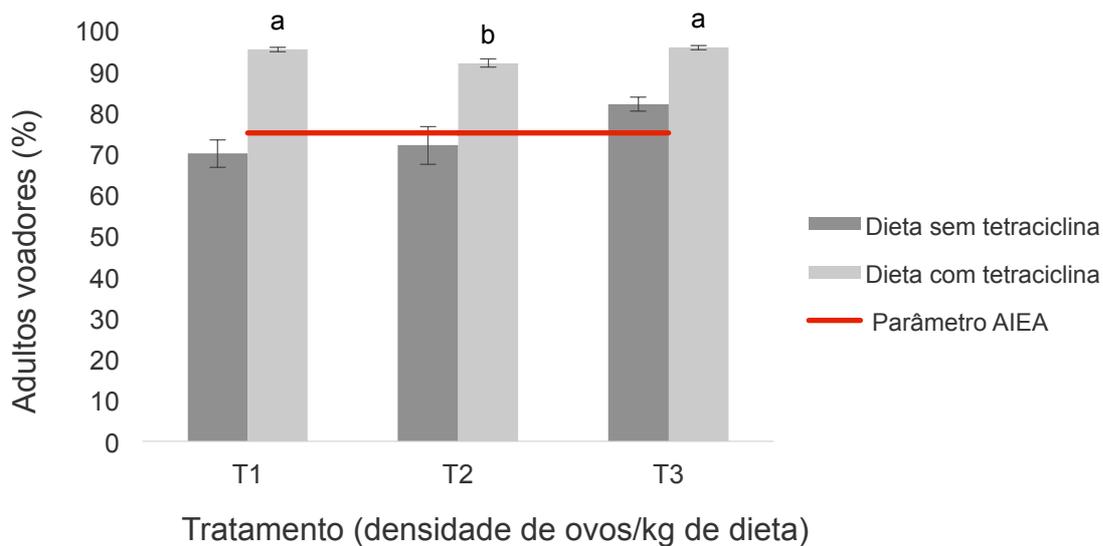


Figura 4.9 – Habilidade de voo de adultos de *C. capitata* linhagem transgênica OX 3864A. As colunas representam as médias \pm erro padrão dos tratamentos. A linha vermelha representa o valor mínimo aceitável estabelecido pela AIEA para a linhagem tsl V-8 de *C. capitata*

No que se refere à habilidade de voo dos adultos, não foram detectadas diferenças em função das densidades de ovos testadas para a formulação 2 ($F=3,35$; $P=0,0418$). Entretanto, diferenças foram observadas em relação a este parâmetro quando os adultos se desenvolveram em dieta artificial contendo Tetraciclina (formulação 1) ($F=7,99$; $P=0,0008$) (Figura 4.9). Além disso, quando comparadas as duas formulações de dietas testadas em relação a este parâmetro, observou-se que a porcentagem de adultos voadores foi menor para adultos desenvolvidos em dieta artificial sem Tetraciclina, independentemente da densidade de ovos utilizada (Figura 4.9).

Para a razão sexual (RS), os resultados obtidos (Figura 4.10) foram semelhantes nos três tratamentos, não havendo diferença estatística entre eles ($F= 3.15$; $P=0.0498$). Isto indica que o aumento do volume de ovos inoculado não interferiu na recuperação de machos e fêmeas.

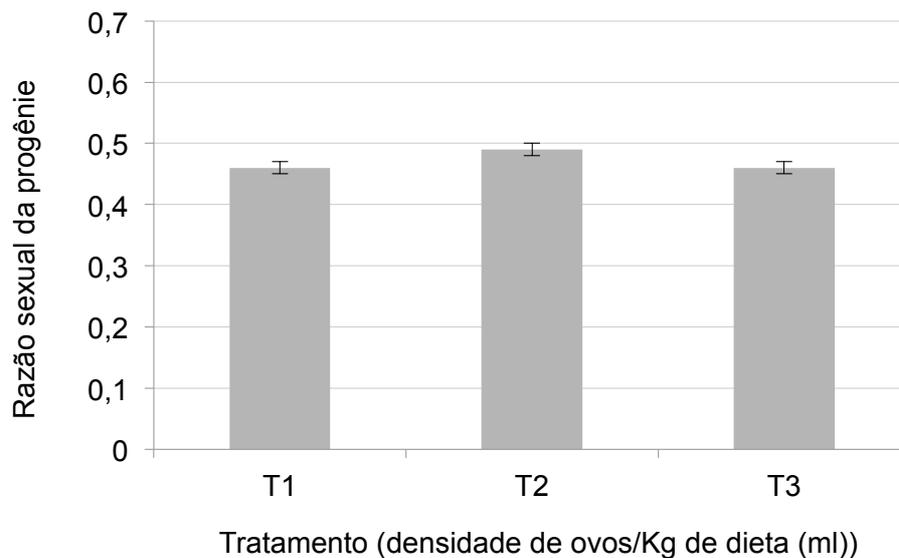


Figura 4.10 – Razão sexual da progênie de adultos de *C. capitata* linhagem transgênica OX 3864A, desenvolvidos em dieta contendo tetraciclina.

Estabelecimento e adaptação da colônia de *C. capitata*, linhagem transgênica OX3864A no Brasil

Os parâmetros apresentados correspondem a 31 gerações criadas em condições artificiais durante um período de 2 anos e 3 meses. O volume médio de ovos produzidos por geração foi de $106,8 \pm 9,12$ mL. Este parâmetro variou conforme as gerações devido a variações na emergência de adultos nos diferentes lotes e ao número de gaiolas de adultos em produção (Figura 4.11). A média de ovos produzidos/gaiola e ovos/dia foi de $67,55 \pm 3,56$ e $7,06 \pm 0,31$ mL, respectivamente.

Os parâmetros de produção: volume total de larvas e pupas recuperadas em cada geração, também apresentaram variações em função do número de lotes produzidos/geração. A média de larvas e pupas recuperadas por geração foi de $975,96 \pm 105,75$ e $1245,71 \pm 134,72$, respectivamente. O volume de larvas e pupas recuperadas correspondeu ao número de ovos inoculados, e este último variou conforme as necessidades da multiplicação do material (Figura 4.12).

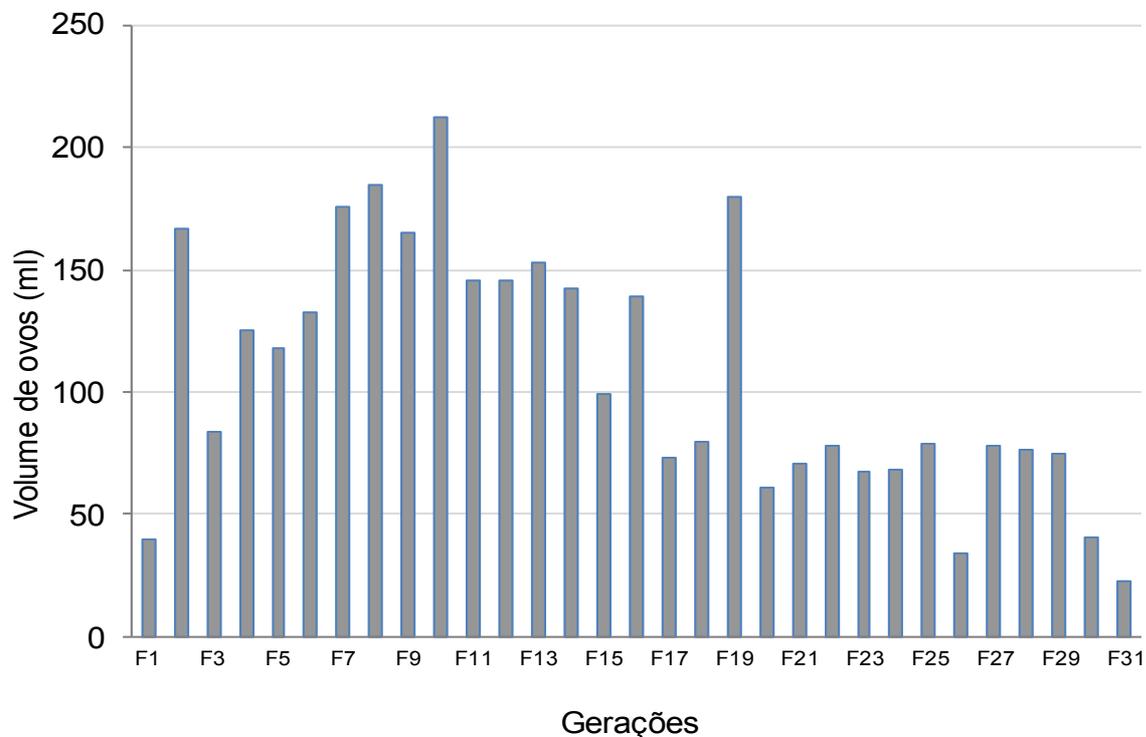


Figura 4.11 – Produção de ovos de *Ceratitis capitata*, linhagem transgênica OX3864A ao longo de 31 gerações

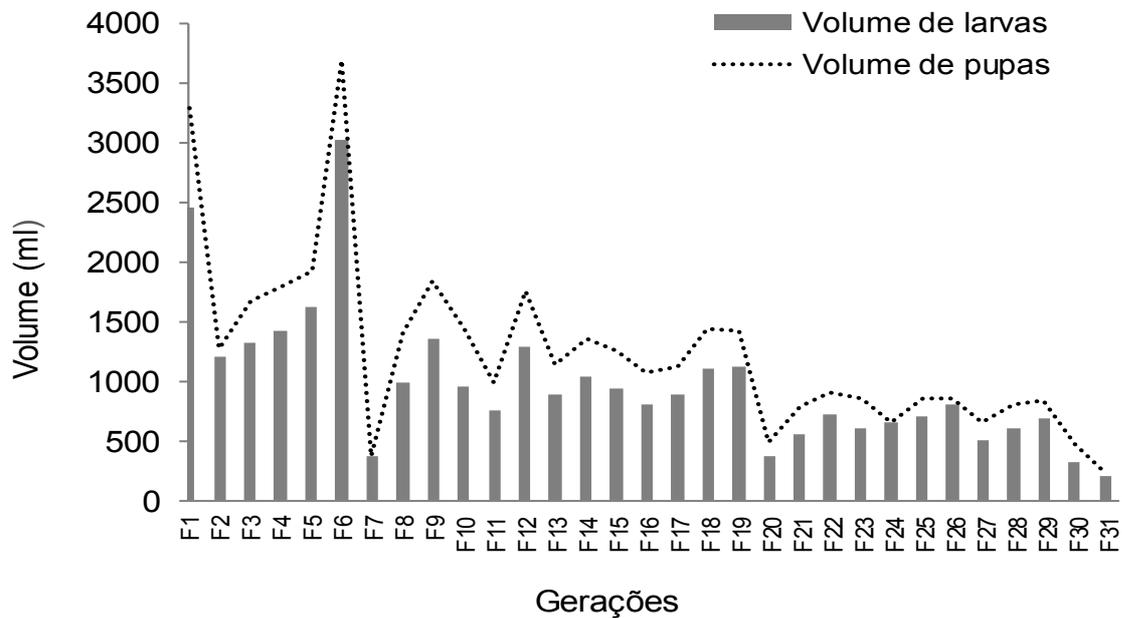


Figura 4.12 – Produção de larvas e pupas de *Ceratitits capitata*, linhagem transgênica OX3864A ao longo de 31 gerações

O rendimento ovo-pupa para os lotes de colônia oscilou entre 0,17 a 0,74, sendo o valor médio para as 31 gerações de $0,55 \pm 0,02$ (Figura 4.13).

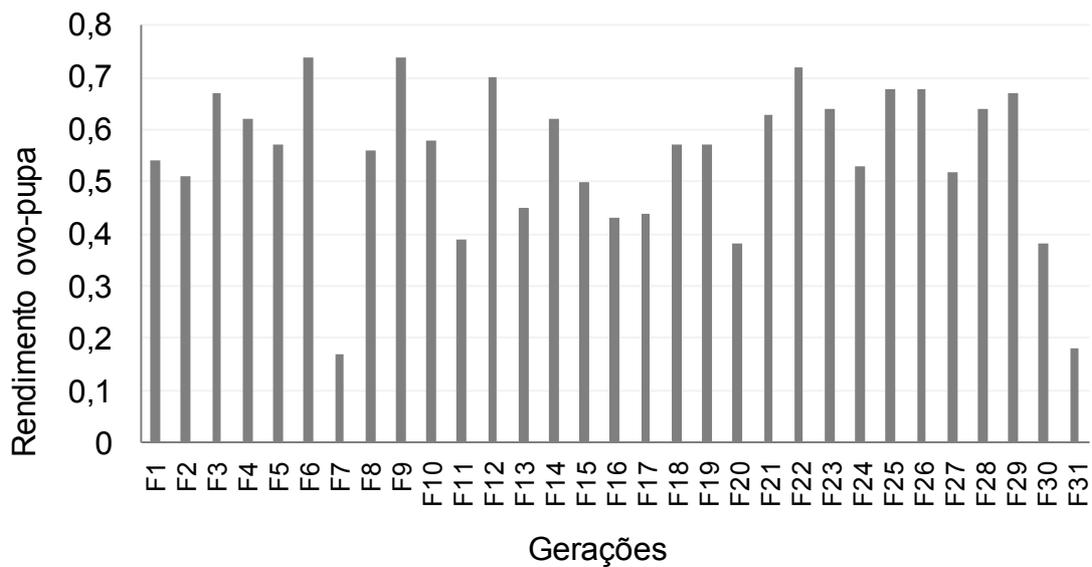


Figura 4.13 – Rendimento ovo-pupa de *Ceratitits capitata*, linhagem transgênica OX3864A ao longo de 31 gerações

Na Tabela 4.4, apresenta-se os resultados do controle de qualidade da criação ao longo de 34 gerações.

Tabela 4.4 – Parâmetros de qualidade de *Ceratitis capitata*, linhagem transgênica OX3864A ao longo de 34 gerações

Geração	Peso da pupa (mg)	n° pupas/ml	Emergência de adultos (%)	Razão sexual da progênie
F1	7,04 ± 0,31	61,14 ± 2,09	93,14 ± 0,00	0,47 ± 0,03
F2	7,60 ± 0,21	57,00 ± 0,20	93,93 ± 3,26	0,51 ± 0,04
F3	7,47 ± 0,32	56,00 ± 0,00	90,67 ± 6,56	0,43 ± 0,04
F4	7,60 ± 0,16	56,50 ± 0,50	94,10 ± 6,36	0,49 ± 0,03
F5	7,16 ± 0,23	60,29 ± 1,95	93,49 ± 1,42	0,48 ± 0,02
F6	7,45 ± 0,13	56,45 ± 0,84	77,04 ± 7,52	0,47 ± 0,05
F7	7,45 ± 0,21	58,00 ± 0,71	92,75 ± 2,36	0,46 ± 0,02
F11	8,35 ± 0,05	54,50 ± 1,50	96,30 ± 1,1	0,43 ± 0,05
F12	8,25 ± 0,23	55,25 ± 1,43	96,40 ± 0,62	0,45 ± 0,03
F13	8,28 ± 0,18	53,75 ± 0,75	97,00 ± 0,54	0,45 ± 0,04
F14	8,10 ± 0,15	56,00 ± 1,15	96,00 ± 1,68	0,47 ± 0,01
F15	8,03 ± 0,10	56,25 ± 1,60	95,25 ± 1,54	0,47 ± 0,05
F16	7,65 ± 0,22	58,25 ± 1,11	93,50 ± 1,93	0,47 ± 0,03
F17	7,23 ± 0,22	57,75 ± 1,31	81,75 ± 7,00	0,43 ± 0,03
F18	8,07 ± 0,23	55,00 ± 1,00	93,00 ± 0,57	0,47 ± 0,03
F19	8,10 ± 0,1	53,00 ± 0,01	84,70 ± 0,90	0,44 ± 0,04
F23	7,80 ± 0,1	63,00 ± 0,50	92,50 ± 0,50	0,48 ± 0,02
F24	7,60 ± 0,06	60,00 ± 0,74	72,00 ± 0,80	0,45 ± 0,03
F29	8,70 ± 0,08	54,00 ± 0,72	95,00 ± 1,12	0,39 ± 0,06
F30	9,00 ± 0,02	54,00 ± 0,72	75,00 ± 2,90	0,52 ± 0,03
F31	8,40 ± 0,05	56,00 ± 0,00	93,00 ± 1,40	0,46 ± 0,02
F32	8,50 ± 0,02	55,00 ± 1,15	97,00 ± 0,37	0,53 ± 0,01
F33	7,50 ± 0,2	61,00 ± 1,00	92,00 ± 4,00	0,53 ± 0,04
F34	7,50 ± 0,1	60,50 ± 1,50	92,00 ± 0,03	0,49 ± 0,04
Média	7,87 ± 0,10	57,03 ± 0,55	90,73 ± 1,46	0,47 ± 0,01

4.4. Discussão

O fato da *C. capitata* ser uma espécie tropical, polífaga e multivoltina, segundo Domínguez, Artiaga-Lopez e Solís (2010) tem facilitado sua adaptação a sistemas de criação artificiais.

Durante as primeiras gerações, é comum observar uma baixa fecundidade. Este comportamento está relacionado com a resistência a aceitação de um novo substrato para oviposição. Além disso, durante o estabelecimento das colônias de moscas-das-frutas, também se produz uma redução na longevidade dos adultos. Conseqüentemente,

a fecundidade das fêmeas se concentra num curto período de tempo (DOMÍNGUEZ; ARTIAGA-LOPEZ; SOLÍS, 2010).

O peso da larva e a pupa também são parâmetros que sofrem mudanças como resultado do processo de criação artificial (HERNANDEZ et al., 2010). Neste sentido, a dieta larval é de extrema importância.

O peso corporal é um dos fatores fundamentais no processo de metamorfose. Um armazenamento adequado de reservas nutritivas é extremamente importante, pois garante um desenvolvimento pupal satisfatório (CRUZ, I.; CRUZ, J.; TAUFER; KALISZ, 2000). Em geral, nos três tratamentos testados para as duas formulações, o parâmetro peso de pupa, indicativo da qualidade do inseto, se manteve acima do valor mínimo aceitável para a linhagem de *C. capitata* tsl V-8 (7,0 mg) (Tabelas 4.2 e 4.3) (FAO/IAEA/USDA, 2003).

4.5. Conclusões

- A dieta adotada pela Biofábrica Moscamed Brasil para a linhagem mutante tsl V-8, pode ser usada para a criação massal da linhagem transgênica OX3864A, nas formulações com e sem Tetraciclina, sem afetar o rendimento e os padrões de qualidade requeridos para o uso da linhagem na TIE.
- A linhagem transgênica OX3864A, é uma alternativa para produção de machos em criação massal, para uso na TIE.

Referências

ALPHEY, L. Re-engineering the sterile insect technique. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 32, n. 10, p. 1243-1247, 2002.

CONDON, K.; CONDON, G.; DAFA'ALLA, T.; FORRESTER, O.; PHILLIPS, C.; SCAIFE, S.; ALPHEY, L. Germ-line transformation of the Mexican fruit fly. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 16, p. 573-580, 2007.

CRUZ, I. B. M.; NASCIMENTO, J. C.; TAUFER, M.; OLIVEIRA, A. K. Morfologia do aparelho reprodutor e biologia do desenvolvimento. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 6, p. 55-66.

DOMÍNGUEZ, J.; ARTIAGA-LÓPEZ, T.; SOLÍS, E. H. Métodos de colonización y cría masiva. In: MONTOYA, P.; TOLEDO, J.; HERNÁNDEZ, E. (Ed.). **Moscas de la fruta**:

fundamentos y procedimientos para su manejo. México, DF: SyG Editores, 2010. p. 259-276.

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

FAO/IAEA/USDA. **Manual for product quality control for sterile mass-reared and released tephritid fruit flies**. Version 6.0. Vienna, Austria: IAEA, 2014. 162 p.

GONG, P.; EPTON, M.; FU, G.; SCAIFE, S.; HISCOX, A.; CONDON, K.; CONDON, G.; MORRISON, N.; KELLY, D.; DAFA'ALLA, T.; COLEMAN, P. G.; ALPHEY, L. A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly. **Nature Biotechnology**, New York, v. 23, p. 453-456, 2005.

HANDLER, A.; McCOMBS, S. D.; FRASER, M. J.; SAUL, S. H. The lepidopteran transposon vector, piggyBac, mediates germ-line transformation in the Mediterranean fruit fly. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 95, p. 7520-7525, 1998. (doi:10.1073/pnas.95.13.7520).

HANDLER, A.; HARRELL, R. A. I. Transformation of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*, with a piggyBac vector marked with polyubiquitin-regulated GFP. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 31, p. 199-205, 2001.

HANDLER, A.; McCOMBS, S. The piggyBac transposon mediates germ-line transformation in the Oriental fruit fly and closely related elements exist in its genome. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 9, p. 605-612, 2000.

HANDLER, A. M.; MCCOMBS, S. D.; FRASER, M. J.; SAUL, S. H. The lepidopteran transposon vector, piggyBac, mediates germ-line transformation in the Mediterranean fruit fly. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 95, p. 7520-7525, 1998.

HERNÁNDEZ, M. R.; OROZCO, D.; QUINTERO, J. L.; MONIGUEZ, J. Control de calidad en la cria masiva. In: MONTOYA, P.; TOLEDO, J.; HERNÁNDEZ, E. (Ed.). **Moscas de la fruta**: fundamentos y procedimientos para su manejo. México, DF: SyG Editores, 2010. p. 277-290.

LEFTWICH, P. T.; KOUKIDOU, M.; REMPOULAKIS, P.; GONG, H.-F.; ZACHAROPOULOU, A.; FU, G.; CHAPMAN, T.; ECONOMOPOULOS, A.; VONTAS, J.; ALPHE, L. Genetic elimination of field-cage populations of Mediterranean fruit flies. **Proceedings of the Royal Society. Serie B**, London, v. 281, 2014. DOI: 10.1098/rspb.2014.1372.

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, *Ceratitidis capitata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 133, p. 146-153, 2009.

SILVA NETO, A. M.; SANTOS, T. R. O.; DIAS, V. S.; JOAQUIM-BRAVO, I. S.; BENEVIDES, L. J.; BENEVIDES, C. M. J.; SILVA, M. V. L.; SANTOS, D. C. C.;

VIRGINIO, J.; OLIVEIRA, G. B.; WALDER, J. M. M.; PARANHOS, B. A. J.; NASCIMENTO, A. S. Mass-rearing of Mediterranean fruit fly using low-cost yeast products produced in Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 69, n. 6, p. 364-369, 2012.

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**. Ribeirao Preto: Holos, 2000.

5. Sobrevivência e frequência de cópula de machos de *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae), linhagem transgênica OX3864A, comparada com a linhagem tsl Vienna 8: Implicações para a Técnica do Inseto Estéril.

Resumo

Nos últimos 40 anos a técnica de liberação de machos estéreis de moscas-das-frutas tem sido a forma mais comum de controle e erradicação desta praga. A técnica se baseia na liberação de grandes quantidades de moscas estéreis produzidas em sistema de criação massal. Para que a Técnica do Inseto Estéril (TIE) tenha sucesso, é preciso conhecer e levar em consideração aspectos importantes, tais como o comportamento e a ecologia de espécies de pragas alvo. O presente estudo teve, como objetivo, avaliar a sobrevivência de machos de *Ceratitis capitata* das linhagens transgênica OX3864A e a tsl Vienna 8 (tsl V-8) e a frequência de cópula dos referidos machos, para determinar fatores que otimizem a TIE. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia e no Laboratório Nível 2 de Biossegurança, ambos da Biofábrica Moscamed Brasil (BMB), Juazeiro/Bahia. Os resultados demonstraram que o desempenho sexual do macho foi influenciado pela idade e a linhagem de mosca. Para a linhagem tsl V-8 de *C. capitata*, o maior índice de cópula foi observado em machos de 7 (sete) dias de idade (82,4%). Já para a linhagem transgênica OX3864A, o maior índice verificou-se em machos de 3 (três) dias (64%). Nos dados de duração de cópula, observou-se que as cópulas que envolveram a participação de machos estéreis (linhagem tsl V-8), apresentaram a maior duração, para as idades de 5 (cinco) e 7 (sete) dias. Para a linhagem transgênica OX3864A, as cópulas que envolveram a participação de machos de 11 (onze) dias foram as mais prolongadas. No tocante à sobrevivência após a liberação em gaiola de campo, observou-se que, até às 72h não houve um efeito significativo das dietas na sobrevivência dos machos. Com base nos resultados e considerando a importância da maturidade sexual dos insetos, recomenda-se a liberação do macho da linhagem OX3864A com 3 dias de idade, e da linhagem tsl V-8, com 5 dias de idade.

Palavras-chave: Comportamento sexual. Transgênico. Moscas-das-frutas. Técnica do Inseto Estéril.

Survival and copulation frequency of *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae) males, transgenic OX3864A strain compared to tsl Vienna 8 strain: Implications to the Sterile Insect Technique.

Abstract: The last 40 years the technique of releasing sterile fruit fly males have been the most common way to eradicate this pest. The technique is based on releasing huge amounts of sterile fruit fly males produced in mass rearing systems. In order to be successful with the SIT, behavior and target pest ecology have to be known and taken into consideration. This study aims to evaluate the survival rates and mating frequency of *C. capitata* males, transgenic OX3864A and tsl-Vienna 8 (tsl-V8) strains, in order to determine the SIT contributing factors. The experiments were conducted in the Entomology Lab and at the Level 2 Biosafety Lab, both located at the Moscamed Brazil facility in Juazeiro, Bahia state. Results have shown that the male sexual performance was influenced by the fruit fly age and lineage. For *C. capitata* tsl V-8 strain, the highest copulation index observed for 7 days old males was 82,4%. While for the transgenic OX3864A strain the highest index was obtained for 3 days old males (64%). On the mating length data, it has been observed that copulations that involved the participation of sterile males (tsl V-8 strain) had the longest duration, for ages five (5) and seven (7) days. For transgenic strain OX3864A, the copulations involving the participation of males of eleven (11) days were longer. Regarding survival rates after release in field cage, it has been observed that until 72 hours there were no significant effect of the diets in the survival of males. Based in these results, it is recommended that OX3864A males should be released with 3 days old and tsl V-8 males should be released with 5 days old.

Keywords: Sexual behavior. Transgenic male. Fruit fly. Sterile Insect Technique.

5.1. Introdução

Segundo Malavasi e Zucchi (2000), o primeiro teste de campo com *C. capitata* estéreis foi realizado, entre 1950-1960, no Havaí/Estados Unidos. Durante 13 meses, uma área piloto recebeu, semanalmente, insetos estéreis, reduzindo a população selvagem inicial em 90% em média.

De acordo com Pereira (2009), a técnica de liberação de machos estéreis de moscas-das-frutas tem sido a forma mais comum de erradicação desta praga. A técnica se baseia na liberação de grandes quantidades de moscas estéreis produzidas em sistema de cria massal. A quantidade de machos estéreis a ser liberados dependerá da diversidade encontrada na natureza. Os machos estéreis competem com os selvagens pelo acasalamento, copulando com as fêmeas que, a partir de então produzem ovos inviáveis (KNIPLING, 1979).

O modelo teórico envolvendo a liberação de insetos estéreis foi desenvolvido por Knipling (1955) e se baseia em um número "x" de indivíduos da população nativa, onde a taxa de crescimento é igual a 5 (cinco), e é regulada pelo ambiente. De posse desses conhecimentos, libera-se um número nove vezes maior (9:1) de indivíduos estéreis em relação à população nativa. Este mesmo autor esclarece que nem todo inseto é passível de controle pela TIE e que os seguintes requisitos devem ser observados:

- Existirem métodos que sejam sustentáveis do ponto de vista econômico e que seja viável o desenvolvimento desta tecnologia;
- Que o inseto se reproduza sexualmente através de cópulas;
- Existir técnicas economicamente viáveis para a criação de milhões de insetos;
- Os insetos estéreis devem apresentar rápida dispersão no ambiente, buscando prontamente a fêmea selvagem, competindo com os machos férteis;
- A irradiação ou outro método esterilizante deve produzir esterilidade sem afetar o comportamento ou longevidade dos machos;
- As fêmeas devem, preferencialmente, acasalar uma só vez;
- O inseto a ser controlado deve ter, em uma fase do seu ciclo natural, uma baixa população para que o método possa ser economicamente viável.

A busca por maiores conhecimentos da biologia, do comportamento e da ecologia de espécies de pragas alvo, é fundamental para o êxito de qualquer ferramenta de controle de pragas. Neste particular, um fator que é passível de melhorar a eficiência e a efetividade da TIE é o desenvolvimento de novos e melhores métodos para estimar ou

avaliar a competitividade dos machos na cópula e determinar os fatores que são importantes no sucesso do acasalamento (LIEDO et al., 2002).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a sobrevivência de machos de *C. capitata* da linhagem transgênica OX3864A e da linhagem baseada em mutação, *temperature sensitive letal* Vienna 8 (tsl V-8), e a frequência de cópula dos referidos machos, para determinar fatores que otimizem a Técnica do Inseto Estéril.

5.2 .Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia e no Laboratório Nível 2 de Biossegurança, ambos da Biofábrica Moscamed Brasil (BMB), Juazeiro/Bahia, em salas sob condições ambientais controladas [temperatura (T) de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa (UR) de $50 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas].

5.2.1. Material biológico utilizado

Os insetos adultos utilizados nos experimentos foram provenientes de três linhagens de *C. capitata*: tsl V-8 (machos), desenvolvida pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), transgênica OX3864A (machos), desenvolvida pela Oxitec e bissexual (fêmeas). Todas as linhagens foram criadas nos laboratórios da BMB.

Insetos estéreis

Os machos estéreis utilizados foram provenientes da colônia de *C. capitata* linhagem tsl V-8 (FRANZ, 2005) da BMB, criados em dieta artificial (DAMASCENO, 2013) sob condições ambientais controladas ($T=18-23 \pm 1^\circ\text{C}$; $UR=65 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas), seguindo os protocolos de criação e controle de qualidade estabelecidos pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA) (FAO/IAEA/USDA, 2014).

A esterilização dos insetos foi conduzida numa máquina de raios X, modelo RadSource RS 2400. O irradiador foi operado com voltagem de 125 Kv, corrente de 18 mA, e com uma relação dose – energia de: 0,0207 Gy/Kw.s. Os insetos foram irradiados em condições de hipóxia (colocados em sacola plástica hermeticamente fechada) na fase de pupa, 24 a 48 horas antes da emergência (10 -11 dias idade), com dose de 115 Gy. Concluído o processo de esterilização, as pupas foram transferidas para gaiolas de laboratório (30x30x30 cm), sendo mantidas em salas com temperatura, umidade e fotofase controladas ($23 \pm 2^\circ\text{C}$, $65 \pm 10\%$; 14 horas de fotofase) para a emergência dos

adultos. Após emergência, os machos estéreis tiveram livre acesso à dieta artificial e água até o início dos experimentos. A dieta foi composta por açúcar refinado e levedura hidrolisada (Biones®) na proporção de 3:1 (SILVA NETO et al., 2012).

Insetos transgênicos

Os machos transgênicos utilizados na pesquisa foram provenientes da colônia de *C. capitata*, linhagem OX3864A RIDL (do inglês **R**elease of **I**nsects carryng a **D**ominant **L**ethal”), mantida no Laboratório de Biossegurança Nível 2 da BMB sob condições ambientais controladas (T: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR= $65 \pm 10\%$; fotofase de 14 horas). Esta linhagem tem a característica das fêmeas possuírem dependência de Tetraciclina® no substrato larval para completar seu desenvolvimento. O fato de não ser colocado este antibiótico na dieta larval garante somente a recuperação de pupas de machos. Portanto, para a recuperação de apenas machos, ovos foram semeados em bandejas plásticas (57x37x2,7cm), contendo dieta larval na proporção de 1mL de ovos/kg de dieta (Figura 5.1a). A dieta larval foi composta de: bagaço de cana (13,4%), açúcar (8,4%), farinha de soja (8,4%), levedura de cerveja (8,4%), benzoato de sódio (0,3%), ácido cítrico (1,7 %), e Nipagin (0,24%). As bandejas inoculadas foram cobertas com tecido voal, acondicionadas em carrinhos de produção e mantidas sob condições controladas (T= $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR= $70 \pm 10\%$, fotofase de 14h).

Transcorridos sete dias, após a inoculação dos ovos (Figura 5.1a), as larvas iniciaram o salto fora da dieta, à medida que atingiram o 3º estágio de desenvolvimento, em busca de um substrato para formação do pupário. As larvas foram coletadas em calhas com água localizadas nas laterais do carrinho de produção (Figura 5.1b). Em seguida, as larvas foram acondicionadas em novas bandejas (38x27x10cm), contendo vermiculita como substrato para formação da pupa (Figura 5.1c) e mantidas durante oito dias em sala escura também sob condições controladas (T= $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR de $70 \pm 10\%$). Dois dias antes da emergência dos adultos, a vermiculita foi peneirada para recuperação das pupas. As pupas recuperadas foram acondicionadas em gaiolas de adultos (30X30X30cm), provisionadas com água e dieta artificial *ad libitum*, esta última na proporção de 3:1 (açúcar refinado e levedura hidrolisada Biones®) (SILVA NETO et al., 2012).



Figura 5.1 – Etapas do desenvolvimento larval de *C. capitata*, linhagem OX3864A. a) Bandejas contendo dieta artificial; b) Coleta de larvas do 3º estágio; c) larvas acondicionadas em bandejas contendo vermiculita

Insetos da linhagem bissexual

Os insetos adultos de *C. capitata* linhagem bissexual utilizados nos experimentos foram provenientes da colônia desta linhagem mantida no Laboratório de Entomologia da BMB sob condições ambientais controladas (T: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR= $65 \pm 10\%$; fotofase de 14 horas).

Os insetos foram criados em gaiola para adultos (25 x 40 x 35 cm) com estrutura de alumínio, base de acrílico e as laterais de tecido voal (Figura 5.2). Em cada gaiola, foram acondicionadas 100 mL de pupas (aproximadamente 4.200 adultos; 1 ♀:1 ♂), um recipiente contendo água e outro contendo dieta de adulto (3:1, açúcar: proteína hidrolisada - Biones®) (SILVA NETO et al., 2012). Após emergência dos insetos e posterior verificação das cópulas, cada gaiola foi colocada sobre uma bandeja contendo água filtrada, para a coleta de ovos. Os ovos coletados foram semeados sobre bandejas contendo a dieta artificial para larvas já descrita neste capítulo. Durante o desenvolvimento larval e pupal, seguiram-se as metodologias descritas previamente.

Entre 6 e 8 horas após a emergência dos adultos, foi feita a separação das moscas por sexo, e as fêmeas foram acondicionadas em gaiolas do tipo baleiro em salas separadas, para serem utilizadas no experimento sem contato prévio com o feromônio dos machos.



Figura 5.2 - Gaiola de criação contendo adultos de *Ceratitís capitata* linhagem bissexual

5.2.2. Frequência e duração de cópula de machos de *C. capitata*, linhagens tsl Vienna 8 e transgênica OX3864A.

Com a finalidade de avaliar a frequência de cópula de machos de *C. capitata* de diferentes linhagens, foram conduzidos experimentos em gaiolas de laboratório adaptadas de embalagens de balas (3,5L de capacidade), de plástico transparente, adaptado com tecido voal na parte lateral (6x10cm) e frontal para facilitar o acondicionamento dos insetos (Figura 5.3a). As gaiolas foram provisionadas com água *ad libitum* e um pequeno ramo de goiabeira (*Psidium guajava* L.) contendo três folhas, como superfície para o pouso e cópula dos insetos. Cada gaiola recebeu populações de insetos sexualmente maduros e virgens nas proporções: 25 fêmeas linhagem bissexual (4-5 dias de idade) e 25 machos das linhagens de laboratório: tsl V-8 e transgênica OX3864A. Entretanto, as linhagens de machos foram testadas de forma independente, ou seja, cada gaiola somente recebeu populações de machos de uma única linhagem. As idades de machos testadas no experimento foram: 3, 5, 7, 9 e 11 dias após emergência. Os insetos (machos e fêmeas) foram mantidos em salas independentes até o início do experimento

Os machos foram liberados 30 minutos antes das fêmeas e as observações foram realizadas no horário entre 9h00 - 13h00. Os insetos mortos e defeituosos foram repostos antes do início do experimento. Uma vez iniciadas as cópulas, os casais foram removidos com auxílio de tubos de vidro (5 mL) (Figura 5.3b) vedados com algodão, sendo registradas, para cada casal, as informações: macho envolvido na cópula, tempo transcorrido para início do acasalamento (período de latência) e duração da cópula.



Figura 5.3 - Gaiola adaptada (3,5L de capacidade) contendo três folhas de goiabeira como superfície para o pouso e cópula dos inseto (a).Tubo de vidro utilizado para a coleta dos casais em cópula (b)

5.2.3. Influência da nutrição na sobrevivência de machos de *C. capitata*, linhagem transgênica OX3864A.

O experimento teve, como objetivo, avaliar diferentes tipos de alimentos, oferecidos aos adultos recém emergidos, na sobrevivência de machos de *C. capitata*, linhagem transgênica OX3864A. O estudo foi conduzido em duas etapas. Na primeira, duas horas após a emergência dos insetos, grupos de 150 machos foram acondicionados em gaiolas de laboratório adaptadas (3,5L de capacidade), de plástico transparente, adaptado com tecido voal na parte lateral (6x10cm) e frontal para facilitar o acondicionamento dos insetos e submetidos a 02 (dois) tipos de dietas: 1) sacarose e 2) sacarose + proteína (3:1), durante 72 horas. Em seguida, os insetos provenientes destes tratamentos foram expostos a 02 (dois) cenários, imitando o que aconteceria em campo: cenário 1) fatias de goiaba (*Psidium guajava* L.) e água *ad libitum*, e cenário 2) apenas água (inanição). Diariamente, avaliou-se o número de insetos mortos em cada tratamento. Para cada tratamento foram utilizadas cinco repetições.

5.2.4. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado nos experimentos foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Os resultados obtidos foram submetidos a análises de variância (ANOVA). Para comparação das medias entre os tratamentos, foi realizado o teste de Tukey (5 % de significância). Previamente às análises supracitadas,

determinou-se a normalidade e homogeneidade, por meio dos testes de Kolmogorov-Smirnov ($P > 0,05$) e Cochran C, Hartley, Bartlett ($P > 0,05$), respectivamente. Todos os dados foram analisados por meio do programa STATISTICA versão 6.0.

5.3. Resultados

Frequência e duração de cópula de machos de *C. capitata*, linhagens: tsl Vienna 8 e transgênica OX3864A.

Os resultados demonstraram que o desempenho sexual do macho foi influenciado pela idade e a linhagem de mosca. Para a linhagem tsl V-8 de *C. capitata*, a maior frequência de cópula foi observado em machos de cinco (5) dias (72,8%) e sete (7) dias de idade (82,4%) e que foram observados diferenças estatísticas em relação as outras idades. Já para a linhagem transgênica OX3864A, o maior índice verificou-se em machos de três (3) dias (64,0%), entretanto, na linhagem transgênica, não houve diferenças estatísticas entre as idades de macho testadas em relação a este parâmetro (Transgênica $F = 0,95$ e $P < 0,0,4535$; tsl/ $F = 12,91$ e $P < 0,05$). (Figura 5.4)

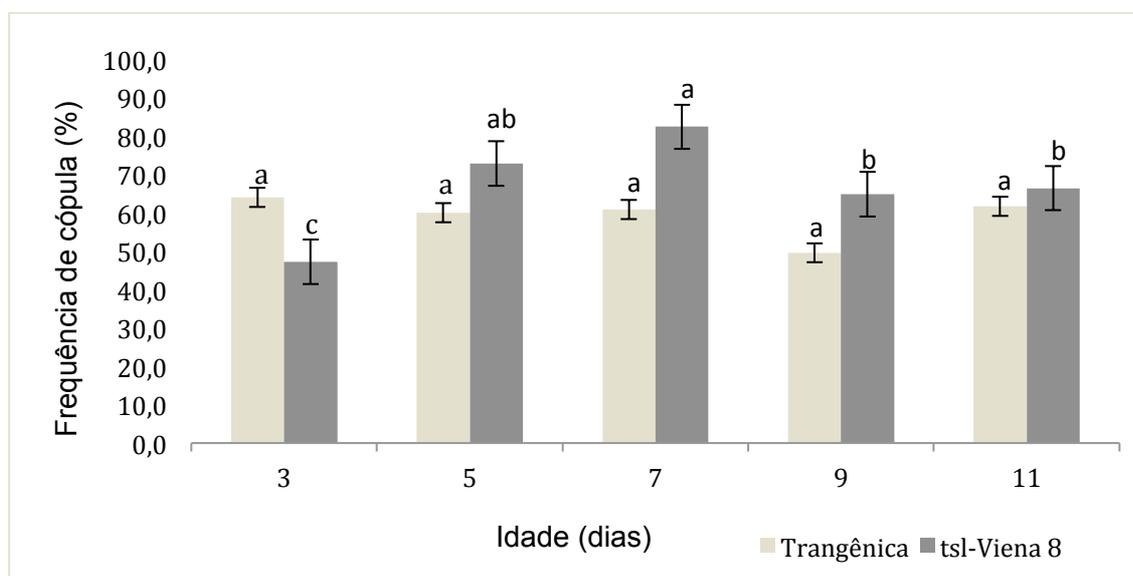


Figura 5.4 - Frequência de cópulas de fêmeas selvagens de *C. capitata* envolvendo dois tipos de machos com diferentes idades. As colunas representam as médias \pm erro padrão dos tratamentos. Colunas com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativas entre elas

Analisando os dados de duração de cópula, observou-se que as cópulas que envolveram a participação de machos estéreis (linhagem tsl V-8), apresentaram a maior duração, para as idades de cinco (5) e sete (7) dias. Para a linhagem transgênica

OX3864A, as cópulas que envolveram a participação de machos de 11 dias foram mais prolongadas (Teste de Tukey, Transgênica $F = 29,24$ e $P < 0,0001$; tsl V-8 $F = 4,89$ e $P < 0,05$). (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Efeito da linhagem e idade do macho de *C. capitata* na duração da cópula com fêmeas selvagens em condições de laboratório

Linhagem de <i>C. capitata</i>	Duração da cópula (min)				
	Idade do Macho (dias)				
	3	5	7	9	11
OX3864A	99,1 ± 3,4 b	90,6 ± 2,2 b	92,3 ± 3,8 b	102,7 ± 4,3 b	143,1 ± 5,2 a
tsl Vienna 8	104,3 ± 6,1 bc	124,7 ± 4,6 a	119,5 ± 4,0 ab	100,4 ± 3,7 c	107,6 ± 4,3 bc

¹Os valores representam a média do tratamento ± erro padrão. Médias com letras desiguais na mesma linha diferem estatisticamente, Teste Tukey ($p < 0,05$)

Influência da nutrição na sobrevivência de machos de *C. capitata*, linhagem transgênica OX3864A.

Analisando os dados de sobrevivência, observou-se que, até às 72h após emergência, não houve um efeito significativo das dietas na sobrevivência dos machos, sendo as taxas médias de sobrevivência para insetos alimentados com as dietas 1 e 2 de $99,3 \pm 0,17$ e $99,2 \pm 0,22$ % ($t = 0,14028$; $P = 0,8899$), respectivamente (Figura 5.5).

A disponibilidade de água apenas, após as 72 h, teve um efeito significativo do tipo de nutrição recebido previamente. A dieta com sacarose nas primeiras 72 h promoveu maior sobrevivência dos insetos nas 24h posteriores, com taxa média de 77,3% comparada a 35,1% com dieta de sacarose + proteína (Figura 5.6). Além disso, os resultados revelaram que a disponibilidade de alimento na natureza, como a goiaba, pode garantir a sobrevivência dos machos em campo, independentemente do tipo de dieta fornecida antes da liberação.

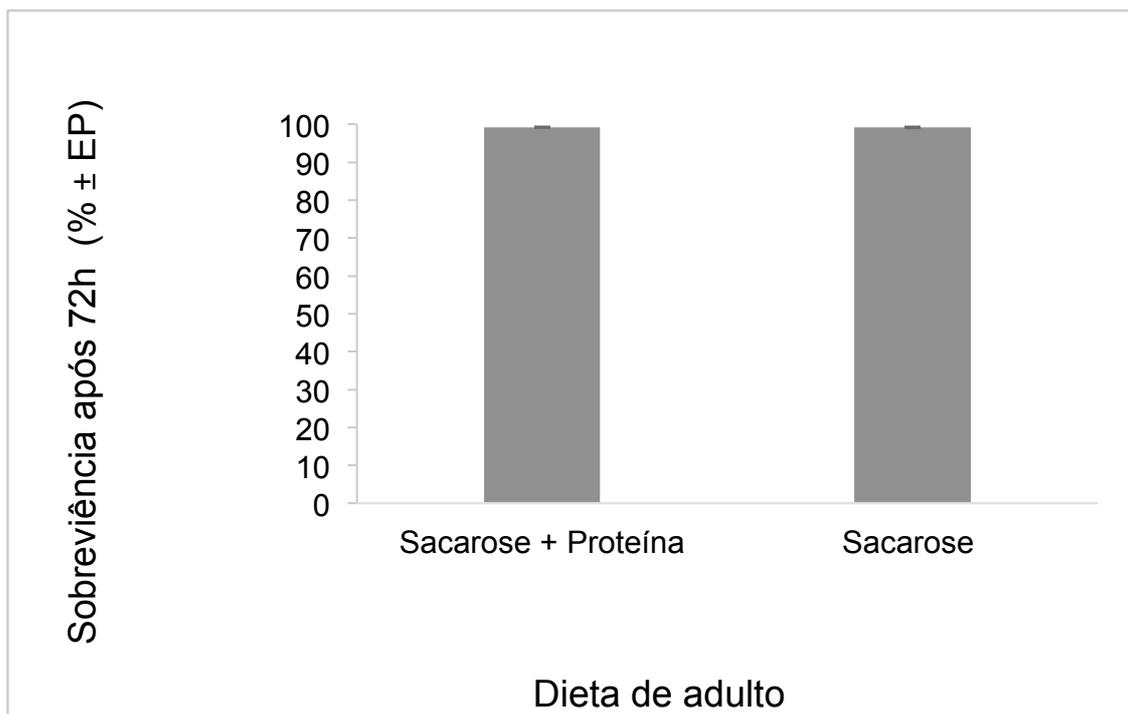


Figura 5.5 - Sobrevivência média de machos de *C. capitata*, linhagem OX3864A, alimentados com diferentes dietas, por 72 horas após a emergência. (Teste T; $t = 0,14028$; $P = 0,8899$)

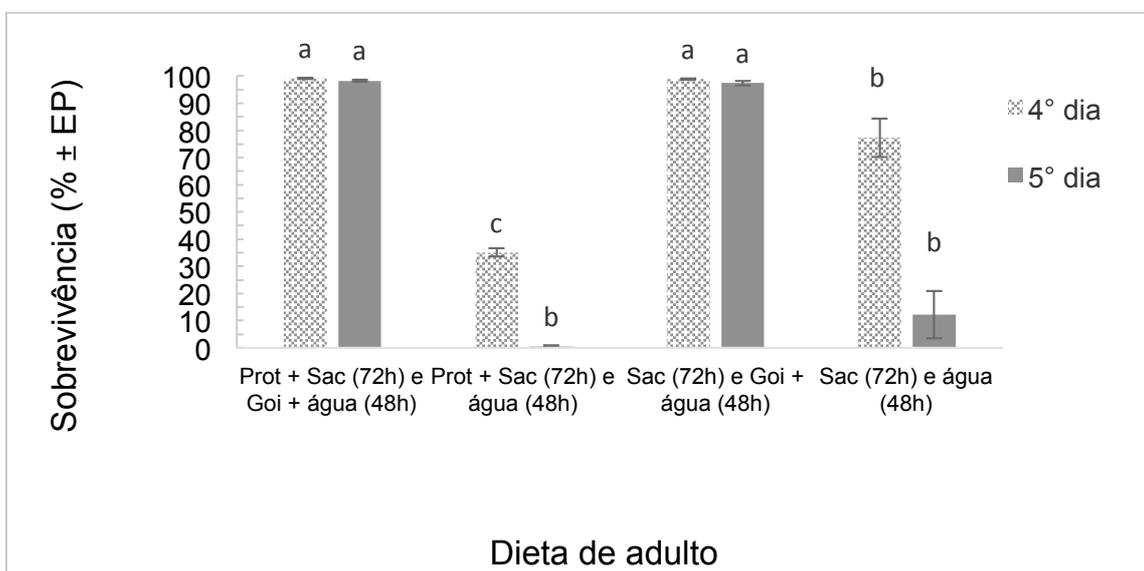


Figura 5.6 - Sobrevivência média de machos de *C. capitata*, linhagem OX3864A, alimentados com diferentes dietas, por 72 h após a emergência e, em seguida, alimentados com goiaba e água ou apenas com água por 48h. Barras da mesma cor, com letras diferentes, apresentam diferenças significativas (Teste de Tukey, 4°d $F_{(3,16)} = 60,23$ e $P < 0,001$; 5°d $F_{(3,16)} = 24,84$ e $P < 0,001$).

5.4. Discussão

Conhecer a biologia e o comportamento das espécies alvos é fundamental para o êxito de qualquer medida de controle adotada para o combate de uma praga.

Com a Técnica do Inseto Estéril não é diferente. Da mesma forma que saber quais os fatores externos que afetam uma população de insetos, conhecer as necessidades dos insetos e suas estratégias na busca de alimento, multiplicação e comunicação são fundamentais na definição de que estratégia de controle adotar, visando a otimização de recursos e meios, com o objetivo de combater a praga alvo, seja através da redução da população alvo ou mesmo de sua erradicação (ARREDONDO et al., 2010).

Sugayama e Malavasi (2000) definem o comportamento como a capacidade que o organismo tem de reagir a estímulos externos e internos. Será esta capacidade de interação, determinada por uma maior ou menor adaptabilidade, que definirá o êxito de uma determinada espécie. Neste particular, conhecer os comportamentos de reprodução, oviposição e domínio de território, entre outros, será de fundamental importância para o sucesso no controle de uma população de insetos.

Notadamente, no caso do uso da TIE, o conhecimento do comportamento sexual das espécies alvo ocupa papel relevante. Segundo Arredondo et al. (2010), há uma necessidade, por parte dos insetos adultos, de um tempo, de 5 a 20 dias, para se atingir a maturidade sexual e esta variação de tempo pode ocorrer entre as espécies e até mesmo entre os sexos de uma mesma espécie.

No caso de moscas-das-frutas, pode-se encontrar duas estratégias de acasalamento, definidas com base na distribuição do sitio de oviposição: Defesa do recurso ou simples e Lek ou complexa (ARREDONDO et al., 2010; SUGAYAMA; MALAVASI, 2000).

A espécie *C. capitata* tem, como estratégia de cópula, a formação do Lek (ARREDONDO et al., 2010), contudo Hendrichs apud Sugayama e Malavasi (2000), descrevem-na como uma estratégia intermediária, onde o local de encontro entre machos e fêmeas pode ocorrer no fruto ou na folhagem, dependendo de fatores como o estágio fenológico da planta, da hora do dia e do ritmo de atividade de oviposição pelas fêmeas.

Na avaliação da frequência e duração de cópulas de machos de *C. capitata*, linhagens OX3864A, comparada com os da tsl V-8, definiu-se pela utilização de fêmeas virgens de uma única linhagem bissexual criada em laboratório, com idade entre 4 e 5 dias, como sugerido por Liedo et al. (2002). A definição de se testar a série das idades

de machos (3, 5, 7, 9 e 11 dias) se deu a partir de observações anteriores e não publicadas e também em função do limitado número de moscas disponíveis, assim como fez Liedo et al., (2002).

O maior índice de cópula, entre as linhagens testadas, ocorreu com os machos de 3 e 7 dias de idade, respectivamente, transgênica OX3864A e tsl V-8. A preferência das fêmeas por parceiros sexuais mais jovens também foi observado por Silva Neto et al., (2009), destacando que os machos jovens de *C. capitata* emitiram feromônio com frequência maior do que os machos velhos. Liedo et al., (2002) encontrou resultados parecidos, relatando maior número de cópula de machos jovens (4 dias de idade), quando comparado aos machos das outras idades.

Silva Neto et al., (2009) refere que a senescência parece ser um fator importante e de caráter negativo no êxito de cópula de machos de *C. capitata*, o que corrobora com os resultados encontrados no presente estudo no que diz respeito à frequência de cópula, que apontou o pico de cópula das linhagens OX3864A e tsl V-8, ocorrendo, respectivamente, nas idades de 3 (três) e 7 (sete) dias.

Por outro lado, a duração de cópula foi maior nos machos mais velhos, contudo, tal fato não significa maior transferência de esperma por parte do macho. Taylor et al. (2001), salienta que a probabilidade de transferência de esperma de machos estéreis de *C. capitata*, decai com o aumento da idade dos machos e as fêmeas copuladas por estes machos são mais propensas à recópula em função de um menor volume de sêmen na espermateca.

Na análise da influência da nutrição na sobrevivência de machos de *C. capitata*, linhagem OX3864A, constatou-se que a alimentação durante a criação massal da forma que é feita, não comprometeu a sobrevivência dos insetos até 72 h após a emergência. Shelly e McInnis (2003), comparando a sobrevivência de machos de *C. capitata* alimentados com proteína, com machos privados de proteína em um intervalo de 2 e 4 dias, em árvores hospedeiras dentro de gaiolas de campo, constataram que não houve um efeito aparente da dieta de adultos sobre a sobrevivência dos machos em qualquer intervalo de prova.

Quando foi oferecido uma fonte de alimento (goiaba), houve um aumento da sobrevivência dos machos independente da linhagem testada, mostrando que encontrar alimento na natureza garante a sobrevivência do macho em campo. Kaspi e Yuval (2000), sugere que os machos que falharam em encontrar alimento na natureza, 24h

após a liberação, embora alguns consigam sobreviver, não vão contribuir com os programas de TIE porque não são capazes de obter uma cópula no lek.

Estudos anteriores realizados com linhagens de *C. capitata* mostram a importância da sacarose na sobrevivência e da proteína no comportamento sexual dos machos (JOACHIM-BRAVO et al., 2009; KASPI; YUVAL 2000; SHELLY; MCINNIS, 2003). O desafio para pesquisa, posto por Kaspi & Yuval 2000, é determinar uma formulação na dieta dos insetos que mantenha um balanço entre a mortalidade e o aumento da competitividade sexual.

5.5. Conclusões

- Considerando a importância da maturidade sexual dos insetos, recomenda-se a liberação do macho da linhagem OX3864A com 3 dias de idade, e da linhagem tsl V-8, com 5 dias de idade.
- Considerando a maior índice de cópula e a maior duração de cópula, a linhagem tsl V-8 é melhor que a linhagem OX3864A, pois a idade de maior índice de cópula coincide com o de maior duração de cópula, indicando sua maturidade sexual.
- Não há um efeito significativo das dietas na sobrevivência dos machos.

Referências

ARREDONDO, J.; DIAZ-FLEISCHER, F.; PÉREZ-STAPLES, D. Biología y comportamiento. In: MONTOYA, P.; TOLEDO, J.; HERNÁNDEZ, E. (Ed.). **Moscas de la fruta**: fundamentos y procedimientos para su manejo. México, DF: SyG Editores, 2010. p. 91-106.

DAMASCENO, I. C. **Influência da composição da dieta larval e da radiação x na qualidade de *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera:Tephritidae) produzida em criação massal**. 2013. 68 f. Dissertação (Mestrado em Defesa Agropecuária) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2013.

FRANZ, G. Genetic sexing strain 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. Vienna: Springer; IAEA, 2005. p. 427-451.

JOACHIM-BRAVO, I. S.; ANJOS, C. S.; COSTA, A. M. The role of protein in the sexual behaviour of males of *Ceratitis capitata* (Diptera:Tephritidae): mating success, copula duration and number of copulations. **Zoologia**, Curitiba, v. 26, n. 3, p. 497-412, 2009.

KASPI, R.; YUVAL, B. Post-teneral protein feeding improves sexual competitiveness but reduces longevity of mass-reared sterile male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 93, n. 4, p. 949-955, 2000.

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.

KNIPLING, E. F. **The basic principles of insect population suppression and management**. Washington, DC: USDA, 1979. 659 p. (Handbook, 512).

LIEDO, P.; DE LEON, E.; BARRIOS, M. I.; VALLE-MORA, J. F.; IBARRA, G. Effect of age on the mating propensity of the mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, n. 1, p. 94-101, 2002.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**. Conhecimento Básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. 327 p.

PEREIRA, R. C. A Técnica do Inseto Estéril. In: MALAVASI, A.; VIRGINIO, J. (Ed.). **Biologia, monitoramento e controle de moscas-das-frutas**. Juazeiro, BA: Moscamed Brasil, 2009.

SILVA NETO, A. M.; DIAS, V. S.; JOAQUIM-BRAVO, I. S. Escolha de parceiro para acasalamento em *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae): Influência do envelhecimento dos machos no sucesso de cópula. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 5, p. 571-577, 2009.

SILVA NETO, A. M.; SANTOS, T. R. O.; DIAS, V. S.; JOAQUIM-BRAVO, I. S.; BENEVIDES, L. J.; BENEVIDES, C. M. J.; SILVA, M. V. L.; SANTOS, D. C. C.; VIRGINIO, J.; OLIVEIRA, G. B.; WALDER, J. M. M.; PARANHOS, B. A. J.; NASCIMENTO, A. S. Mass-rearing of Mediterranean fruit fly using low-cost yeast products produced in Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 69, n. 6, p. 364-369, 2012.

SHELLY, T. E.; McINNIS, D. O. Influence of adult diet on the mating success and survival of male mediterranean fruit flies (Diptera:Tephritidae) from two mass-rearing strains on field caged host trees. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 86, n. 3, p. 340-344, 2003.

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

6. Competitividade sexual de machos de duas linhagens de *Ceratitits capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae): tsl Vienna 8 e transgênica OX3864A, em condições de gaiola de campo

Resumo

O sucesso da Técnica do Inseto Estéril (TIE) depende da capacidade dos machos estéreis competirem de forma eficiente com os machos selvagens pelo acasalamento de fêmeas selvagens. A linhagem de *Ceratitits capitata* utilizada nos programas da TIE está entre os fatores que influenciam no desempenho sexual dos machos estéreis liberados em campo. O presente trabalho teve como objetivo comparar a competitividade sexual, bem como outros parâmetros comportamentais, de machos de duas linhagens de *C. capitata*, tsl Vienna 8 (tsl V-8) desenvolvida pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) e transgênica OX3864A, esta última desenvolvida pela empresa inglesa Oxitec. Para isso, foram usadas duas gaiolas de campo, onde cada tratamento (linhagem) recebeu populações de insetos sexualmente maduros e virgens nas proporções de 50 fêmeas selvagens (10-12 dias de idade), 50 machos selvagens (8-10 dias de idade) e 50 machos tsl V-8 estéreis (5 dias de idade) ou transgênicos (3-4 dias de idade). Foram avaliados o total de cópulas, localização da cópula na planta, duração da cópula e tipo de macho envolvido. Além disso, foi calculada a competitividade sexual dos machos das duas linhagens, mediante o índice de esterilidade relativa (RSI). O RSI atingiu valores médios de $0,31 \pm 0,03$ e $0,34 \pm 0,04$ para as linhagens transgênica OX3864A e tsl V-8, respectivamente. A duração das cópulas variou com a linhagem. As cópulas de fêmeas com machos transgênicos apresentaram a menor duração, cerca de $81,1 \pm 3,54$ minutos, enquanto que, com os machos tsl V-8, a média foi de $94,1 \pm 3,59$ minutos. Nos bioensaios realizados em gaiola de campo, os machos das linhagens transgênica OX3864A e tsl V-8 apresentaram uma boa performance sexual, sendo capazes de competir com machos coespecíficos selvagens pela cópula com fêmeas selvagens virgens. A irradiação não causou efeitos, além da esterilização, no machos estéreis tsl V-8.

Palavras-chave: Moscas-das-frutas. *Ceratitits capitata* transgênica. TIE. Competitividade sexual.

Male sexual competitiveness of two *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera:Tephritidae) strains: tsl Vienna 8 and OX3864A transgenic, in field cage conditions

Abstract: The success of the Sterile Insect Technique (SIT) depends on the capacity of sterile males efficiently competing with wild males for mating with wild females. The *Ceratitis capitata* strain used in SIT programs is between the sexual performance influencing factors of sterile males released in open field. The current research aimed to compare the sexual competitiveness and other behavioral parameters of two *C. capitata* strains, tsl Vienna 8 (tsl V-8) developed by the International Atomic Energy Agency (IAEA) and transgenic OX3864A, developed by the english enterprise Oxitec. To accomplish that, two field cages were used, in which each treatment (strain) received virgin and sexually mature insect populations in the proportion of 50 wild females (10-12 days old), 50 wild males (8-10 days old) and 50 tsl V-8 sterile males (5 days old) or transgenic (3-4 days old). The parameters evaluated were: total of copulation, copula location in the plant, mating length and type of male involved. Besides that, the male sexual competitiveness of both strains has been calculated according to the Relative Sterile Index (RSI). RSI reached average values of $0,31 \pm 0,03$ e $0,34 \pm 0,04$ for transgenic OX3864A and tsl V-8 strains, respectively. The mating length/duration varied according the strain. The copulation lengths between females with transgenic males were shorter, approximately $81,1 \pm 3,54$ minutes, while the tsl V-8 average was $94,1 \pm 3,59$ minutes. In bioassays conducted in the field cage, males of transgenic strains OX3864A and tsl V-8 had a good sexual performance, being able to compete with wild co-specific males for mating with wild virgin females. The irradiation caused no effect in addition to sterilization, in the sterile males tsl V-8.

Keywords: Fruit fly. *Ceratitis capitata* transgenic. SIT. Sexual competitiveness.

6.1. Introdução

Ceratitis capitata (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae), espécie multivoltina e polífaga, é nativa da África Equatorial, entretanto já se encontra presente em todos os continentes. Para a fruticultura mundial, *C. capitata* é considerada a praga mais prejudicial devido a seu caráter polífago, podendo atacar mais de 250 tipos de frutas (LIQUID; SHINODA; CUNNINGHAM, 1991).

No Brasil, esta mosca foi citada, pela primeira vez, no início do século XIX (IHERING, 1901 apud ZUCCHI, 2000) e, atualmente, encontra-se distribuída desde o Rio Grande do Sul até alguns estados do Norte e do Nordeste (BRITO et al., 2009). Este inseto já foi associado, no Brasil, a 58 espécies de frutíferas de 21 famílias botânicas (MALAVASI et al., 1980; ZUCCHI, 2000; ZUCCHI, 2001). Segundo Malavasi (2001), o impacto econômico dessa espécie está precisamente associado, além da sua polifagia, a alta capacidade de dispersão e colonização de novos ambientes, assim como à severidade com a qual ataca seus hospedeiros.

Para o controle eficaz da mosca-do-mediterrâneo, é necessária a adoção de estratégias de manejo integrado que envolvam vários métodos e técnicas de controle, entre elas a Técnica do Inseto Estéril (TIE) (MALAVASI; NASCIMENTO, 2003). Esta técnica foi idealizada e posta em prática pelo entomologista americano E.F.KNIPLING na década de 40 para a erradicação da mosca-da-bicheira, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel).

A Técnica do Inseto Estéril (TIE) é o principal componente de muitos programas de controle integrado de moscas-das-frutas no mundo (DYCK *et al.*, 2005). Entretanto, para garantir sua eficiência, é necessária a liberação de um grande número de insetos nas áreas a serem tratadas. Portanto, os insetos devem ser produzidos em larga escala em biofábricas, esterilizados através de métodos físicos (gama ou X) e logo liberados sistematicamente nas áreas agrícolas. Desta forma, os machos estéreis competirão com coespecíficos selvagens pela cópula com as fêmeas selvagens. Durante a cópula, os machos estéreis transferirão às fêmeas esperma com mutações letais dominantes, interrompendo a reprodução da espécie e diminuindo, conseqüentemente, a população selvagem (KNIPLING, 1955).

Levando em consideração a necessidade de produção de insetos em larga escala para a TIE, bem como liberação somente de machos, pois são eles os responsáveis por introduzir esterilidade na população selvagem, foi necessário o desenvolvimento de

linhagens de Sexagem Genética (*Genetic Sexing Strain* - GSS, pela sua sigla em inglês) para aumentar a eficiência da técnica. Para *C. capitata*, um avanço importante nesta área foi o desenvolvimento da linhagem, feito pela a Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), *temperature sensitive letal* Vienna 8 (*tsl* V-8), atualmente utilizada em todos os programas da TIE para esta espécie no mundo. Esta linhagem carrega, como mutações, a sensibilidade letal à temperatura, *tsl* (FRANZ et al., 1996), e a cor branca do pupário, *wp* (*white pupae*) (ROSSLER, 1979), ambas ligadas exclusivamente ao sexo feminino. A separação dos sexos é realizada mediante a exposição dos ovos a uma temperatura de 34°C por 24h. Após este tratamento, ocorre a morte dos embriões de fêmeas, dando continuidade somente à produção de machos originados a partir de pupas marrons (FISHER; CÁCERES, 2000; CÁCERES et al., 2000). Para tanto, esta linhagem produz embriões de fêmeas sensíveis à temperatura e fêmeas adultas emergindo de pupário de cor branca, e embriões machos, mais resistentes à temperatura, que emergem de pupário de cor marrom e que são esterilizados previamente à liberação em campo, mediante o uso de radiação ionizante (gama ou X).

Mais recentemente, o desenvolvimento de linhagens transgênicas de *C. capitata* tem surgido como uma alternativa viável para sua utilização nos programas da TIE. Demonstrando que, através de manipulação genética (transgenia), é possível causar esterilidade em insetos, mediante a indução de uma mutação letal dominante em um dos sexos, sem comprometer o comportamento e desempenho sexual dos insetos. O uso destas linhagens na TIE pode proporcionar diversas vantagens, sendo uma das mais significativas a eliminação do uso de fontes de radiação (gama ou X) para causar esterilidade nos insetos e, conseqüentemente, um melhor desempenho sexual e performance dos mesmos.

A linhagem OX3864A de *C. capitata*, desenvolvida pela empresa Inglesa Oxitec, carrega um sistema letal repressível específico para fêmeas (RIDL – “**R**elease of Insects carryng a **D**ominant **L**ethal”), onde as fêmeas permanecem viáveis apenas na presença de concentrações adequadas de Tetraciclina® no substrato larval, ou seja, não sobrevivem em ambiente selvagem. Além disto, esta linhagem também carrega um marcador genético, que é a fluorescência (conferida por uma proteína fluorescente DsRed2), que possibilita a fácil identificação dos indivíduos que carregam o transgene. Desta forma, cruzamentos entre machos transgênicos e fêmeas selvagens não gerarão indivíduos fêmeas na prole, e, conseqüentemente, reduzirão o potencial reprodutivo da população selvagem (LEFTWICH et al., 2014).

Para garantir a eficiência da TIE, é necessária uma boa sobrevivência, dispersão e competitividade sexual dos machos liberados (transgênicos ou mutantes). Inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas para estudar o comportamento sexual de machos estéreis de *C. capitata* linhagem tsl V-8. Diversos trabalhos revelam a capacidade destes machos de competir com coespecíficos selvagens por cópulas com fêmeas também selvagens em um determinado ambiente (CAYOL et al., 1999; PARANHOS et al., 2010; MORELLI et al., 2013). Ainda que os machos estéreis desta linhagem sejam capazes de transferir esperma e induzir esterilidade nas fêmeas, o desempenho sexual deles é menor comparado com coespecíficos selvagens (McINNIS et al., 1996; CAYOL 2000; LUX et al., 2002; HENDRICHS et al., 2002; KRAAIJEVELD; CHAPMAN, 2004; KRAAIJEVELD et al., 2005). No caso de linhagens transgênicas de *C. capitata*, pesquisas recentes conduzidas em gaiolas de campo com as linhagens OX3864A e OX3647, também revelaram um baixo desempenho sexual destes machos sob condições de competição com machos selvagens (LEFTWICH et al., 2014). Este comportamento pode influenciar negativamente no nível de esterilidade induzido pelos machos estéreis numa determinada população, comprometendo assim a eficiência da TIE.

Em função da linhagem de *C. capitata*, transgênica OX3864A, ser gerada a partir de material biológico proveniente da cepa TOLIMAN, originária da Guatemala (LEFTWICH et al., 2014), sabidamente compatível com o coespecífico selvagem, não houve necessidade de realizar o teste de compatibilidade sexual. Neste contexto, o presente trabalho teve, como objetivo, comparar a competitividade sexual e outros parâmetros comportamentais de machos de duas linhagens de *C. capitata*, transgênica OX3864A e tsl V-8.

6.2 Material e métodos

6.2.1 Local de Estudo

Os experimentos foram conduzidos na Biofábrica Moscamed Brasil (BMB), localizada no município de Juazeiro/BA, no período compreendido entre abril e novembro de 2014, e sob condições ambientais locais [Temperatura (T) = 24-38,1°C; Umidade Relativa (UR) = 79-32 %].

6.2.2 Insetos utilizados

Os insetos adultos utilizados nos experimentos foram provenientes de três linhagens de *C. capitata*: selvagem, tsl V-8 e transgênica OX3864A. O estabelecimento das colônias de insetos foi conduzido em salas climatizadas sob condições controladas [temperatura de 25 ± 2°C, umidade relativa (UR) de 50 ± 10% e fotofase de 14 horas].

Insetos selvagens

Os insetos selvagens utilizados no estudo foram oriundos de frutos de goiaba (*Psidium guajava* L.) e manga (*Mangifera indica* L.), procedentes de pomares infestados na região do Vale do São Francisco. Os frutos coletados foram acondicionados em bandejas plásticas (38x27x10cm), contendo vermiculita como substrato de formação de pupa (Figura 6.1).



Figura 6.1 - Frutos de goiaba (a) e manga (b) infestados por *C. capitata*

Sete dias após a coleta, foi realizado o peneiramento da vermiculita para recuperação das pupas, as quais se acondicionaram em gaiolas teladas (30x30x30cm) (Figura 6.2). Após 24 horas do início da emergência das moscas, machos e fêmeas foram separados com ajuda de aspirador entomológico e mantidos em salas independentes, com condições controladas ($T= 25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; $\text{UR}= 50 \pm 10\%$; e fotofase de 14 horas), garantindo assim que os insetos se mantivessem virgens até o início dos experimentos, bem como evitando o contato das fêmeas com o feromônio sexual produzido pelos machos. Os insetos foram alimentados com água e dieta artificial *ad libitum*. A dieta foi composta por açúcar refinado e levedura hidrolisada (Biones®) na proporção de 3:1 (SILVA NETO et al., 2012).



Figura 6.2 – Gaiola de laboratório provisionada com água e alimento acondicionando adultos de *C. capitata*

Insetos estéreis

Os machos estéreis utilizados foram provenientes da colônia de *C. capitata* linhagem tsl V-8 (FRANZ, 2005) da BMB, originalmente obtidos do laboratório de Agricultura e Biotecnologia da AIEA, criados em dieta artificial (DAMASCENO, 2013) sob condições ambientais controladas ($T=18-23 \pm 1^{\circ}\text{C}$; $\text{UR}=65 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas), seguindo os protocolos de criação e controle de qualidade estabelecidos pela Agência Internacional de Energia Atômica (FAO/IAEA/USDA, 2003; 2014).

A esterilização das pupas foi conduzida numa máquina de raios X, modelo RadSource RS 2400 (Figura 6.3 a). O irradiador foi operado com voltagem de 125 Kv, corrente de 18 mA, apresentando uma relação dose - energia: 0,0207 Gy/Kw.s (Figura 6.3 b) e com atividade do tubo de raios X de, aproximadamente, 90 horas no início dos experimentos. Os insetos foram irradiados em condições de hipóxia (colocados em bolsas plásticas hermeticamente fechada) na fase de pupa, 24 a 48 horas antes da emergência (10-11 dias idade), com dose de 115 Gy. Finalizado o processo de esterilização, as pupas foram transferidas para gaiolas de laboratório (30x30x30cm) e mantidas em salas com temperatura, umidade e fotofase controladas ($23 \pm 2^\circ\text{C}$, $65 \pm 10\%$; 14 horas de fotofase) para a emergência dos adultos. Após emergência, os machos estéreis tiveram livre acesso à dieta artificial (SILVA NETO et al., 2012) e água até o início dos experimentos.



Figura 6.3 – Máquina de raios X, modelo RadSource (a); Painel de controle para definição e monitoramento das condições de irradiação (b)

Insetos transgênicos

Os machos transgênicos utilizados na pesquisa foram provenientes da colônia de *C. capitata*, linhagem OX3864A desenvolvida pela empresa Oxitec, mantida no Laboratório de Biossegurança Nível 2 da Biofábrica Moscamed sob condições ambientais controladas ($T: 25 \pm 1^\circ\text{C}$, $UR = 65 \pm 10\%$; fotofase de 14 horas). Esta linhagem tem a característica das fêmeas possuírem dependência de Tetraciclina® no substrato larval para completar seu desenvolvimento. O fato de não ser colocado este antibiótico na dieta larval garante somente a recuperação de pupas de machos. Portanto, para a recuperação de apenas machos, ovos foram semeados em bandejas plásticas (57x37x2,7cm), contendo dieta larval na proporção de 1mL de ovos/kg de

dieta. A dieta larval foi composta de: bagaço de cana (13,4%), açúcar (8,4%), farinha de soja (8,4%), levedura de cerveja (8,4%), benzoato de sódio (0,3%), ácido cítrico (1,7%), Nipagin (0,24%) e Tetraciclina (0,01%). As bandejas inoculadas foram cobertas com tecido voal, acondicionadas em carrinhos de produção e mantidas sob condições controladas ($T=25\pm 2^{\circ}\text{C}$, $UR=70\pm 10\%$, fotofase de 14h).

Transcorridos sete dias, após a inoculação dos ovos, as larvas iniciaram o salto fora da dieta à medida que atingiram o 3º estágio de desenvolvimento, em busca de um substrato para formação do pupário. As larvas foram coletadas em calhas com água localizadas nas laterais do carrinho de produção. Em seguida, as larvas foram acondicionadas em novas bandejas (38x27x10cm) contendo vermiculita como substrato para formação da pupa e mantidas durante oito dias em sala escura também sob condições controladas ($T=25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e UR de $70\pm 10\%$). Dois dias antes da emergência dos adultos, a vermiculita foi peneirada para recuperação das pupas. As pupas recuperadas foram acondicionadas em gaiolas de adultos (30X30X30cm) provisionadas com água e dieta artificial *ad libitum*, esta última na proporção de 3:1 (açúcar refinado e levedura hidrolisada Biones®) (SILVA NETO et al., 2012).

6.2.3 Testes de competitividade sexual

Levando em consideração que, para linhagens GSS (tsl V-8 e OX3864A), apenas machos estéreis são liberados em campo, a competitividade sexual foi estimada através de experimentos do tipo unissexual. Os experimentos foram conduzidos em gaiolas de campo (2x3m e 3x3x3m), contendo uma planta de goiabeira (*Psidium guajava*, L.) para sombreamento e superfície de cópula dos insetos (Figura 6.4). Cada gaiola recebeu populações de insetos sexualmente maduros e virgens nas proporções: 50 fêmeas selvagens (10-12 dias de idade), 50 machos selvagens (8-10 dias de idade) e 50 machos tsl V-8 estéreis por irradiação (5 dias de idade) ou transgênicos OX3864A, alimentados com dieta larval sem Tetraciclina® (3-4 dias de idade) (1:1:1). Os machos foram liberados 30 minutos antes das fêmeas, e as observações foram realizadas no horário entre 7h:00 -12h:00. Os insetos mortos e não voadores foram repostos antes do início do experimento. A diferenciação entre os grupos de insetos machos nas gaiolas (estéril, transgênico e selvagem) foi realizada mediante marcação no tórax utilizando tinta atóxica das cores branca e vermelha (Figura 6.5 a), sendo que as cores se

alternaram entre as gaiolas, linhagens e as repetições ao longo do experimento (FAO/IAEA/USDA, 2003; 2014), evitando-se, desta forma, a possível interferência da marcação na escolha do parceiro sexual pela fêmea.



Figura 6.4 – Gaiola de campo utilizada nos experimentos de competitividade sexual de machos *C. capitata* de diferentes linhagens

Uma vez iniciadas as cópulas, foram removidos os casais com auxílio de tubos de vidro (5 mL) vedados com algodão (Figura 6.5 b), sendo registradas, para cada casal, as informações: macho envolvido na cópula, tempo transcorrido para início do acasalamento (período de latência) e duração da cópula. Os acasalamentos foram classificados da seguinte forma: macho selvagem x fêmea selvagem (WW); macho estéril x fêmea selvagem (SW) e macho transgênico x fêmea selvagem (RW). Além disso, registrou-se a distribuição espacial das cópulas na planta. Para tanto, considerou-se a posição da cópula adotando-se os seguintes critérios: altura da planta (inferior, média, alta), profundidade nas folhas da planta (centro ou periferia) e posição na folha (inferior ou superior). Foram realizadas 10 repetições para cada uma das combinações testadas. Os experimentos conduzidos seguiram as metodologias estabelecidas pelos padrões internacionais de controle de qualidade (FAO/IAEA/USDA, 2003; 2014).

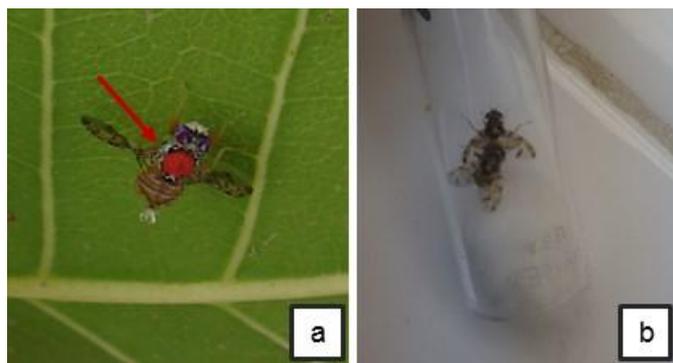


Figura 6.5 – Adulto de *C. capitata* com marcação vermelha no tórax (seta vermelha) (a); Casais em cópula (b)

6.2.4 Análise dos dados

Com base nos resultados obtidos, foi calculada a proporção de cópulas (PM) para todas as repetições conduzidas mediante a fórmula: $PM = \frac{n^\circ \text{ de casais coletados}}{n^\circ \text{ de fêmeas liberadas}}$ (IAEA, 1997). Este parâmetro reflete a aptidão dos insetos, bem como a adequação das condições ambientais para a cópula. A repetição só foi considerada para análise quando PM atingir valores superiores a 0,2 (IAEA, 1997).

A competitividade sexual dos machos das duas linhagens, foi estimada por meio do índice de esterilidade relativa (Relative Sterile Index, RSI) mediante a fórmula: $RSI = \frac{SW}{SW + WW}$ (McInnis et al., 1996). No caso da linhagem transgênica (RIDL), substitui-se o S por R. Este índice permite estimar o nível de esterilidade que poderia ser induzido pelos machos estéreis ou transgênicos numa população selvagem (CAYOL et al., 1999); e seus valores oscilam entre 0 e 1. Valores de RSI iguais a 0,5 significam igual proporção de acasalamentos, ou seja, machos de ambas as populações participando igualmente nos acasalamentos. Valores do RSI superiores a 0,5 indicam maior performance dos machos estéreis quando em competição com machos selvagens pelas cópulas com fêmeas selvagens, e valores inferiores a 0,5 significam melhor desempenho dos machos selvagens.

A duração das cópulas entre fêmeas selvagens e machos das três linhagens testadas foi expressa em minutos, sendo os dados submetidos à análise de variância (ANOVA). Os dados relacionados com a distribuição e localização das cópulas na planta também foram analisados mediante ANOVA. A comparação das médias realizou-se através do teste de Tukey (5 % de significância). Já as médias do RSI foram comparadas através do teste-*t* de Students.

Previamente às análises supracitadas, determinou-se a normalidade e homogeneidade, por meio dos testes de Kolmogorov-Smirnov ($P > 0,05$) e Cochran C, Hartley, Bartlett ($P > 0,05$), respectivamente. Todos os dados foram analisados por meio do programa STATISTICA, versão 6.0.

6.3 Resultados

As condições ambientais durante a execução dos experimentos não afetaram o comportamento sexual das três linhagens de *C. capitata* testadas neste estudo. A proporção de cópulas (PM) atingiu valores médios de $0,65 \pm$ e $0,64 \pm$ para os experimentos de competição conduzidos entre machos selvagens e tsl V-8 e machos selvagens e OX3864A, respectivamente. Em todas as repetições conduzidas, este parâmetro se manteve acima do valor mínimo estabelecido (0,2) (IAEA, 1997).

Os machos de ambas linhagens (tsl V-8 e OX3864A) manifestaram o comportamento de lek (sítios de agregação), característico nesta espécie de moscas-das-frutas. Além disso, em cada situação de competição (selvagens x estéreis ou selvagens x transgênicos), constatou-se a presença de machos das duas linhagens num mesmo lek. Quanto à distribuição das cópulas na planta, a maior parte dos acasalamentos aconteceram na região média da árvore, (tsl $F=14,33$; $p < 0,05$, Ridl $F=2,479$; $P=0,1027$, Wild $F=8,837$; $P > 0,05$) no centro (Tsl $t=6,137$; $P < 0,05$ Ridl $t=2,478$; $P < 0,05$ Wild $t=5,885$ $P < 0,05$) e na face inferior da folha (Tsl $t=7,193$; $P < 0,05$ Ridl $t=4,838$; $P < 0,05$ Wild $t=6,594$ $P < 0,05$), independentemente do tipo de macho envolvido na cópula (Tabela 6.1) Estes resultados sugerem que não houve competição entre machos estéreis e selvagens ou machos transgênicos e selvagens na ocupação de um local específico da planta hospedeira para o estabelecimento dos leks e o cortejo sexual.

Tabela 6.1- Distribuição das cópulas de *C. capitata* na planta em condições de gaiola de campo

Critérios avaliados	Tipo de cópula		
	♀ S X ♂ S	♀ S X ♂ <i>tsl</i>	♀ S X ♂ Ridl
Localização da cópula na planta			
Alta	9,20 ± 2,16 b	11,09 ± 3,32 b	9,63 ± 3,12 b
Media	74,40 ± 1,97 a	72,15 ± 5,35 a	70,59 ± 4,00 a
Inferior	14,86 ± 3,31 b	10,21 ± 3,87 b	19,93 ± 0,56 b
Centro	73,25 ± 3,72 a	75,08 ± 5,09 a	67,58 ± 8,61 a
Periferia	32,05 ± 4,35 b	22,83 ± 4,54 b	32,56 ± 7,51 b
Localização da cópula na folha			
Superior	10,24 ± 2,33 B	12,53 ± 3,62 B	9,21 ± 3,29 B
Inferior	78,35 ± 8,05 A	83,26 ± 3,53 A	87,93 ± 5,55 A

Médias na mesma coluna seguidas por letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, Teste de Tukey, $P < 0,05$). Letras maiúsculas referem-se a comparação da localização da cópula na folha. Letras minúsculas referem-se a diferenças na ocorrência das cópulas em relação à altura da planta. Letras minúsculas em negrito referem-se a diferenças na distribuição das cópulas em função da profundidade nas folhas da planta.

Os valores médios do RSI obtidos nos experimentos com machos transgênicos e estéreis demonstraram que estes machos foram responsáveis por 31 e 34 % das cópulas com fêmeas selvagens, respectivamente (linhagem OX3864A $RSI = 0,31 \pm 0,03$; linhagem *tsl* V-8 $RSI = 0,34 \pm 0,04$; $P = 0,5635$) (Figura 6.6). O RSI permite estimar a competitividade que existe entre uma população selvagem e os machos estéreis (relação: machos selvagens: estéreis). Portanto, estes resultados indicam que os machos de ambas linhagens (*tsl* V-8 e OX3864A) apresentaram uma boa performance sexual, sendo capazes de competir com machos coespecíficos selvagens pela cópula com fêmeas selvagens virgens oriundas de populações do Vale do São Francisco. Entretanto, a proporção de machos transgênicos e estéreis envolvidos nas cópulas foi menor em relação aos machos selvagens em todas as repetições conduzidas.

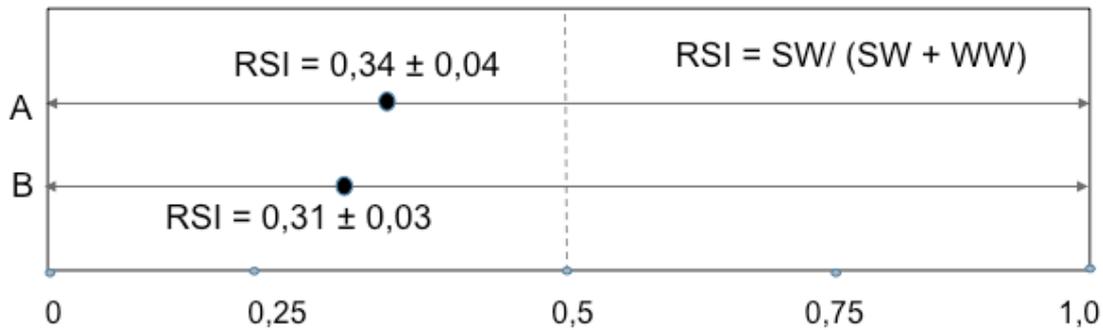


Figura 6.6 - Valores do Índice de Esterilidade Relativa (RSI) obtidos no experimento em gaiola de campo. (A): Competição entre ♂ *tsl* V-8 e ♂ selvagens; (B): Competição entre ♂ transgênico e ♂ selvagens

A duração das cópulas variou conforme o macho envolvido na cópula (Figura 6.7). Observou-se que as cópulas que envolveram a participação de machos transgênicos e estéreis apresentaram menor duração, com cerca de $81,1 \pm 3,54$ e $94,1 \pm 3,59$ min em média, respectivamente, sendo detectadas diferenças estatísticas em relação a este parâmetro comportamental entre a linhagem selvagem e as linhagens de laboratório. ($F_{(2, 641)} = 1,50$; $P = 0 < 0,001$; Figura 6.7).

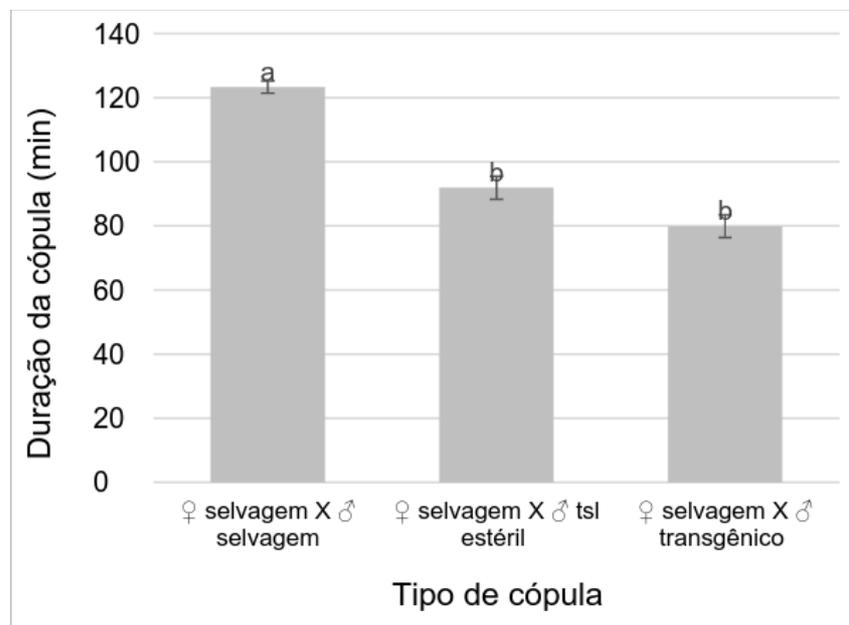


Figura 6.7 - Duração média de cópula entre fêmeas selvagens de *C. capitata* e machos de diferentes linhagens em condições de gaiola de campo. As barras representam as médias \pm erro padrão. Barras com letras diferentes apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Teste de Tukey; $P < 0,001$)

6.4. Discussão

Para o sucesso da TIE é importante que os machos liberados manifestem o comportamento sexual típico desta espécie (CAYOL et al., 1999). Mudanças comportamentais neste sentido podem comprometer a eficiência da TIE. Durante o processo de criação massal, os insetos são expostos a altas densidades nas gaiolas de criação, o que reduz drasticamente o espaço e compromete a formação de leks. Segundo Calcagno et al. (1999), estas condições favorecem a perda ou diminuição de etapas do cortejo nupcial (BRICEÑO; EBERHARD, 1998; BRICEÑO et al., 1999), bem como cópulas de curta duração. A esterilização através de radiação gama também pode prejudicar a qualidade dos machos estéreis liberados (LANCE et al., 2000; LUX et al., 2002; KRAAIJEVELD; CHAPMAN, 2004), tornando-os menos competitivos e reduzindo, portanto, a probabilidade de acasalamento com fêmeas selvagens.

O índice de esterilidade relativa não foi influenciado pelo tipo de linhagem de macho envolvida na cópula. A competitividade dos machos transgênicos e estéreis mostrou-se boa (Figura 6.6), entretanto com valores inferiores aos observados por Leftwich et al. (2014) para esta mesma linhagem transgênica ($RSI 0,46 \pm 0,08$). Para a linhagem *tsl V-8*, o valor médio do RSI observado neste estudo foi inferior ao observado por Mastrangelo (2009) para machos desta mesma linhagem, porém expostos a uma dose menor de raios X (dose=90 Gy; $RSI 0,46 \pm 0,03$). Já Paranhos et al. (2006), em experimentos conduzidos também na região do Vale do São Francisco, verificaram valores inferiores do RSI (em média $RSI=0,22$; $n=7$). As linhagens transgênicas dependem de uma mutação/construção e que, se tal mutação for perdida, a “esterilidade” é revertida e podem ser liberados insetos férteis. No caso dos insetos irradiados, não há esse problema pelo fato de se induzir várias mutações letais dominantes simultaneamente, sem reversão.

Em relação à distribuição das cópulas na planta hospedeira, diversos estudos têm demonstrado um comportamento semelhante entre linhagens selvagens e de laboratório de *C. capitata*. A maioria das cópulas para esta espécie se localiza na região média da árvore, no centro e na face inferior da folha. Vários fatores podem determinar este comportamento. Entre eles, têm sido mencionadas a densidade de folhas neste local da planta, a intensidade de luz e, inclusive, a proteção ao vento (ARITA; KANESHIRO, 1989; HENDRICHS; HENDRICHS, 1990; WHITTIER et al., 1992).

A duração da cópula é um dos fatores responsáveis pela adequada transferência de esperma, assim como pela redução de chances de recópula em fêmeas selvagens depois de terem sido copuladas com esses machos (SEO et al., 1990), fato altamente desejado na TIE. Cópulas de curta duração podem resultar em não transferência de esperma (SEO et al., 1990). Entretanto, tem sido relatado que este fenômeno também pode ocorrer em cópulas com uma duração superior a 120 minutos. No presente estudo, a duração da cópula foi influenciada pelo tipo de macho envolvido. As cópulas de menor duração foram observadas para os machos transgênicos e estéreis.

Sabe-se que machos irradiados transferem menos espermatozoides que machos selvagens, fator crucial na aceitação de uma segunda cópula por parte da fêmea (SEO et al., 1990; TAYLOR et al., 2001). Tais mudanças no comportamento sexual dos machos irradiados aumentam as chances de recópulas, que também podem ocorrer com outro macho estéril, em fêmeas selvagens depois de terem sido copuladas com esses machos. Quando ocorre, este comportamento pode influenciar negativamente no nível de esterilidade induzida pelos machos estéreis numa determinada população, comprometendo assim a eficiência da TIE. Portanto, a identificação de fatores que afetam o desempenho sexual dos machos estéreis, assim como a adoção de medidas que potencializem tal desempenho tem sido o foco de diversas pesquisas ao longo do tempo, visando aumentar a eficiência da TIE. Neste sentido, novas pesquisas com a linhagem transgênica de *C. capitata* OX3864A precisam ser desenvolvidas com a finalidade de estudar a eficiência na transferência de esperma dos machos desta linhagem transgênica durante cópulas com fêmeas selvagens.

6.5. Conclusões

- Em gaiola de campo, os machos das linhagens transgênica OX3864A e tsl V-8 apresentam uma boa performance sexual, sendo capazes de competir com machos coespecíficos selvagens pela cópula com fêmeas selvagens virgens;
- O principal sítio de cópula da espécie *Ceratitidis capitata* é a parte média e central da árvore e na face inferior da folha, independente da linhagem;
- Em termos de competitividade, não há diferença entre os machos tsl V-8 irradiados e os machos transgênicos OX3864A. A irradiação não interferiu no comportamento, além da esterilização desejada, dos machos estéreis tsl V-8;

Referências

ARITA, L. H.; KANESHIRO, Y. Sexual selection and lek behavior in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Pacific Science**, Manoa, v. 43, p. 135-143, 1989.

BRICEÑO, R. D.; EBERHARD, W. G. Medfly courtship duration: a sexually selected reaction norm changed by crowding. **Ethology Ecology & Evolution**, Firenze, v. 10, p. 369-382, 1998.

BRICEÑO, R. D.; RAMOS, D.; EBERHARD, W. G. Aggressive behavior in medflies (*Ceratitis capitata*) and its modification by mass rearing (Diptera: Tephritidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, Manhattan, v. 72, n. 1, p. 17-27, 1999.

BRITO, C. H.; LOPES, E. B.; ALBURQUERQUE, I. C.; BATISTA, J. L.; SILVA, A. B. Uso do tratamento térmico no controle de mosca-das-frutas (*Ceratitis capitata*) **Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 1, p. 29-36, 2009.

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: University Sains Malaysia Press, 2000. p. 543-550.

CALCAGNO, G. E.; VERA, M. T.; MANSO, F.; LUX, S. A.; NORRY, F. M.; MUNYRI, F. N.; VILARDI, J. C. Courtship behavior of wild and mass-reared Mediterranean fruit fly (Diptera:Tephritidae) males from Argentina. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 92:373-379, 1999.

CAYOL, J. P.; VILARDI, J.; RIAL, E.; VERA, M. T. New indices and method to measure the sexual compatibility and mating performance of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) laboratory-reared strains under field cage conditions. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 92, n. 1, p. 140-145, 1999.

CAYOL, J. P. Changes in sexual behavior and life history traits of Tephritid species caused by mass rearing processes. In: ALUJA, M.; NORRIBON, A. (Ed.). **Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior**. Boa Ratom: CRC Press, 2000. p. 843-861.

DAMASCENO, I. C. **Influência da composição da dieta larval e da radiação x na qualidade de *ceratitis capitata* wiedemann, 1824 (diptera: tephritidae) produzida em criação massal**. 2013. 68 f. Dissertação (Mestrado em Defesa Agropecuária) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2013.

DYCK, V. A.; FLORES, J. R.; VREYSEN, M. J. B.; FERNANDEZ, E. E. R.; TERUYA, T.; BARNES, B.; RIERA, P. G.; LINDQUIST, D.; LOOSJES, M. Management of Area-Wide Integrated Pest Management Programmes that Integrate 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. Vienna: Springer; IAEA, 2005. p. 525-542.

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

FAO/IAEA/USDA. **Manual for product quality control for sterile mass-reared and released tephritid fruit flies**. Version 6.0. Vienna, Austria: IAEA, 2014. 162 p.

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.

FRANZ, G.; KERREMANS, P.; RENDON, P.; HENDRICHS, 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. (Ed.). **Fruit fly pests: A world assessment of their biology and management**. Delray Beach, FL: St. Lucie Press, 1996.

FRANZ, G. Genetic sexing strains in Mediterranean fruit fly, an example for other species amenable for large-scale for the rearing sterile insect technique. In: DYCK, V. A.; HENDRICHS, J.; ROBINSON, A. S. (Ed.). **Sterile Insect Technique: principles and practice in area-wide integrated pest management**. Vienna: Springer; IAEA, 2005. p. 427-451.

HENDRICHS, J.; HENDRICHS, M. A. Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in nature: localization and diel pattern of feeding and other activities on fruiting and nonfruiting hosts and nohosts. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 83, p. 632-641, 1990.

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

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Medfly mating behaviour studies under field cage conditions**. Report of the Third Research Co-Ordination Meeting held at Tel Aviv, Israel. Vienna: IAEA, 1997.

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.

KRAAIJEVELD, K.; CHAPMAN, T. Effects of male sterility on female remating in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 271, p. 209-211, 2004.

KRAAIJEVELD, K.; KATSOYANNOS, B. I.; STAVRINIDES, M.; KOULOSSIS, N.; CHAPMAN, T. Remating in wild females of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. **Animal Behavior**, Amsterdam, v. 69, p. 771-776, 2005.

LANCE, D. R.; McINNIS, D. O.; RENDON, P.; JACKSON, C. Courtship among sterile and wild *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) in field cages in Hawaii and Guatemala. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 93, p. 1179-1185, 2000.

LEFTWICH, P. T.; KOUKIDOU, M.; REMPOULAKIS, P.; GONG, H.-F.; ZACHAROPOULOU, A.; FU, G.; CHAPMAN, T.; ECONOMOPOULOS, A.; VONTAS, J.; ALPHE, L. Genetic elimination of field-cage populations of Mediterranean fruit flies. **Proceedings of the Royal Society. Serie B**, London, v. 281, 2014. DOI: 10.1098/rspb.2014.1372.

LIQUID, N. J.; SHINODA, L. A.; CUNNINGHAM, R. T. **Host plants of the Mediterranean fruit fly**: An annotated world review. Annapolis, MD: Entomological Society of America, 1991. 52 p. (Miscellaneous Publications, 77).

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 behaviour of medfly (Diptera: Tephritidae) mass reared for the sterile insect technique. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, p. 102-112, 2002.

McINNIS, D. O.; LANCE, D. R.; JACKSON, G. C. Behavioral resistance to the sterile insect technique by the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 89, p. 739-744, 1996.

MALAVASI, A. Mosca-da-carambola, *Bactrocera carambolae*, (Diptera:Tephritidae). In: VILELA, E. F.; ZUCCHI, R. A.; CANTORE F. (Ed.). **Histórico e impacto de pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 39-41.

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

MALAVASI, A.; NASCIMENTO, A. S. Programa Biofabrica Moscamed Brasil. In: SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., Aguas de São Pedro, 2003. **Resumos...** Aguas de São Pedro: SEB, 2003. p. 52.

MASTRANGELO, T. A. Sterilization of fruit flies (Diptera: Tephritidae) with X-ray for sterile insect technique programmes. 2009. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MORELLI, R.; PARANHOS, B. J.; COELHO, A. M.; CASTRO, R.; GARZIERA, L.; LOPES, F.; BENTO, J. M. Exposure of sterile Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) males to ginger root oil reduces female remating. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v. 137, p. 75-82, 2013.

NATION, J. L. Biology of pheromone released by male Caribbean fruit flies, *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 553-571, 1990.

NASCIMENTO, A. S.; CARVALHO, R. S.; ALVARENGA, C. D.; ARAÚJO, E. L.; HAJI, F. N. P. Status of the *Ceratitidis capitata* (Tephritidae) as a pest in the irrigated fruit crop

project of northeast of Brazil. In: WORKIN GROUP ON FRUIT FLIES OF THE WESTERN HEMISPHERE, 4., 2001, Mendoza, Argentina. p. 56.

PARANHOS, B. J.; McINNIS, D.; URAMOTO, K.; DAMASCENO, I.; GONÇALVES, N.; ALVES, R. M.; COSTA, M. L.; WALDER, J.; MALAVASI, A.; NASCIMENTO, A. Sterily medfly males of the tsl vienna 8 genetic sexing strain display improved mating performance with ginger root oil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FRUIT FLIES OF ECONOMIC IMPORTANCE, 7., 2006, Salvador, BA. **Proceedings...** Salvador, 2006. p. 313-318.

PARANHOS, B.J.; PAPADOPOULUS, N.T.; McINNIS, D.O.; GAVA, C.; LOPES, F.S.C.; MORELLI, R.; MALAVASI, A. Field dispersal and survival of sterile medfly males aromatically treated with ginger root oil. **Environmental Entomology**, College Park, v. 39, p. 570–575, 2010.

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

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

SILVA NETO, A. M.; SANTOS, T. R. O.; DIAS, V. S.; JOAQUIM-BRAVO, I. S.; BENEVIDES, L. J.; BENEVIDES, C. M. J.; SILVA, M. V. L.; SANTOS, D. C. C.; VIRGINIO, J.; OLIVEIRA, G. B.; WALDER, J. M. M.; PARANHOS, B. A. J.; NASCIMENTO, A. S. Mass-rearing of Mediterranean fruit fly using low-cost yeast products produced in Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 69, n. 6, p. 364-369, 2012.

TAYLOR, P. W.; KASPI, R.; MORISSON, S.; YUVAL, B. Agedependent insemination success of sterile Mediterranean fruit flies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 98, p. 27–33, 2001.

WHITTIER, T. S.; KANESHIRO, K. Y.; PRESCOTT, L. D. Mating behavior of Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in a natural environment. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 85, p. 214-218, 1992.

YUVAL, B.; KASPI, R.; FIELD, S. A.; BLAY, S.; TAYLOR, P. Effects of post-teneral nutrition on reproductive success of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, p. 165-170, 2002.

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. p. 13-24.

ZUCCHI, R. A. Mosca-do-Mediterrâneo, *Ceratitis 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.