

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Entomologia



DISSERTAÇÃO

**Potencial de extratos à base de acetogeninas e *Bacillus* sp. no manejo de
Zaprionus indianus (Gupta, 1970) (Diptera: Drosophilidae)**

Fernanda Carla Santos Geisler

Pelotas, 2019

Fernanda Carla Santos Geisler

Potencial de extratos à base de acetogeninas e *Bacillus* sp. no manejo de *Zaprionus indianus* (Gupta, 1970) (Diptera: Drosophilidae)

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Pelotas,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia, para obtenção do
título de Mestre em Ciências (área
de concentração Entomologia).

Orientador: Prof. Dr. Daniel Bernardi

Coorientador: Prof. Dr. Flávio Roberto Mello Garcia

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G313p Geisler, Fernanda Carla Santos

Potencial de extratos à base de acetogeninas e *Bacillus* *sp.* no manejo de *Zaprionus indianus* (Gupta, 1970) (Diptera: Drosophilidae) / Fernanda Carla Santos Geisler ; Daniel Bernardi, orientador ; Flávio Roberto Mello Garcia, coorientador. — Pelotas, 2019.

75 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Mosca do figo. 2. Inimigo natural. 3. Controle biológico. 4. Manejo de praga. 5. Manejo sustentável de pragas. I. Bernardi, Daniel, orient. II. Garcia, Flávio Roberto Mello, coorient. III. Título.

CDD : 595.774

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Fernanda Carla Santos Geisler

Potencial de extratos à base de acetogeninas e *Bacillus* sp. no manejo de *Zaprionus indianus* (Gupta, 1970) (Diptera: Drosophilidae)

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências (área de concentração Entomologia), Programa de Pós- Graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.
Data da Defesa: 08/03/2019

Banca examinadora:

Dr. Daniel Bernardi (orientador)
Doutor em Entomologia pela Universidade de São Paulo.

Dr^a Adrise Medeiros Nunes
Doutora em Fitossanidade pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr. Fábio Pereira Leivas Leite
Doutor em Veterinary Sciences na University of Wisconsin Madison.

Dr. Uemerson Silva da Cunha
Doutor em Entomologia pela Universidade de São Paulo.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas e ao programa de Pós-graduação Entomologia (PPG Entomologia) pela oportunidade de realizar este curso e pelo ambiente oferecido.

Agradeço ao Prof. Dr. Daniel Bernardi por toda orientação, dedicação e ensinamentos que possibilitaram que eu realizasse este trabalho.

Aos professores do PPG Entomologia pela atenção e ensinamentos, em especial ao meu coorientador Prof. Dr. Flávio Roberto Mello Garcia.

À CAPES pela concessão da bolsa do mestrado.

Ao Leandro do Padro Ribeiro, pela preparação dos extratos, tornando possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fábio Leivas Leite, pelo auxílio para a execução deste trabalho.

À Nycole de S. Acunha, pela preparação das bactérias entomopatogênicas, tornando possível a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biologia do Insetos, Alexandra Kruguer, Cristiano Teixeira, Daiana Oliveira, Rute Caroline Treptow, Igor Oliveira, Javier Contreras Miranda, Júlia Aleixo, Márcio Ferreira, Paloma Stupp, Swamy Rocha, pelo companheirismo e ajuda, e pelos momentos de descontração. E em especial a Liliane Nachtigal Martins, que me auxiliou do começo ao fim na execução

dos experimentos, dividindo férias e finais de semana, obrigada ao carinho, paciência, atenção e aos ensinamentos, e além de tudo isso agradeço a amizade de vocês queridas Daniele Schlesener, Jutiane Wollmann e Liliane Nachtigall Martins, pelo carinho, atenção, ensinamentos, é um grande privilégio ter pessoas maravilhosas como vocês ao meu lado.

Aos meus pais Bernardete Santos Geisler e Clovis Geisler, a minha irmã Gabrielly Cecilia Geisler e minha prima Mariane De Freitas, e aos meus pais de coração Zeni Centeno da Rosa e Adão Martins da Rosa e família, por todo o amor e carinho, e por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Ao meu namorado Thiago Fonseca Xavier, companheiro de todas as horas, por me incentivar profissionalmente, muito abrigada pelo amor, carinho e atenção.

Resumo

GEISLER, Fernanda Carla Santos. **Potencial de extratos à base de acetogeninas e *Bacillus* sp. no manejo de *Zaprionus indianus* (Gupta, 1970) (Diptera: Drosophilidae)**. 2019. 74f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Programa de Pós-graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Zaprionus indianus (Gupta, 1970), destaca-se por causar grandes danos a produção de frutos de figo roxo (*Ficus carica*). Os danos relacionados são causados pelas fêmeas, durante o amadurecimento do fruto mediante a oviposição na região ostiolar. Após a eclosão das larvas, as mesmas penetram para o interior dos frutos, tornando-os impróprios. Para a cultura da figueira, não há registros de produtos químicos ou biológicos para o manejo da mosca-do-figo. Assim, objetivou-se avaliar as toxicidades letais, subletais e deterrência a oviposição de bioinseticidas à base de acetogenina de espécies de *Annona* (*Annona mucosa* Jacq., *Annona muricata* L. e *Annona sylvatica* A. St.-Hil) (concentração discriminatória de 2.000 mg. L⁻¹) sobre *Z. indianus* comparado com inseticida comercial de origem natural [limonóides derivados de *Azadirachta indica* (Azamax™ 1,2 g/L – 3,6 mL de ingrediente ativo (i.a) mL por litro)] e um inseticida sintético a base de espinosina (Spinetoram - Delegate™ 250 WG – 7,5 mg i.a. L⁻¹)., verificar a toxicidade de isolados bacterianos *Bacillus thuringiensis* var. *oswaldocruzi* (Bto), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), *Bacillus kurstaki* (Btk) e *Bacillus circulans* (Bc) *oswaldocruzi* (Bto) e *Bacillus circulans* (Bc) quando em misturas com atrativos alimentares, suco de uva 50%, melão de cana de açúcar 7% e proteína hidrolisada 7%, sobre adultos de *Z. indianus* e a toxicidade do isolado Bto sobre os parasitoides *Trichopria anastrephae* Lima, 1940 e *Pachycrepoideus vindemmiae* (Rondani, 1875) em bioensaios de ingestão. *A. mucosa* ocasionou mortalidade superior a 95% em bioensaio de ingestão e aplicação tópica, equivalendo-se ao inseticida sintético espinoteram. Em bioensaio de repelência, *A. mucosa*, Azamax™ 1,2 EC e Delegate™ 250 WG proporcionaram redução significativa (83, 88 e 95%, respectivamente) na quantidade de ovos por fruto artificial. Assim como, juntamente com os extratos *A. sylvatica*, *A. muricata* e Azamax™ resultaram em uma redução de 50% na viabilidade dos ovos. No campo, *A. mucosa* e Azamax™ 1,2 EC influenciaram negativamente a infestação de *Z. indianus* em frutos de figo, proporcionando uma redução significativa no número de larvas/fruto (3,6 e 2,3 larvas/fruto, respectivamente) em relação ao tratamento controle (somente água) (11 larvas/fruto), porém, foram estatisticamente inferiores ao inseticida Delegate™ 250 WG (0,71 larvas/fruto). Em bioensaio de ingestão, adultos de *Z. indianus* apresentaram elevada suscetibilidade aos isolados

de *Bt* quando em mistura (formulação) com os atrativos suco de uva 50%, melaço de cana-de-açúcar 7% e proteína hidrolisada 7%, contudo, somente o isolado *Bto* independente do atrativo ocasionou 100% de mortalidade, 72 Horas Após a Exposição (HAE). Na utilização das concentrações letais (CL₅₀) do isolado *Bto* com os atrativos alimentares, houve uma redução significativa na fecundidade total (entre 40 a 50%) e na viabilidade dos ovos (entre de 35 a 57%) de fêmeas de *Z. indianus* que se alimentaram das formulações contendo *Bto* + atrativos alimentares em bioensaio de ingestão. Entretanto, o isolado *Bto* representou baixa toxicidade sobre adultos de *T. anastrephae* e *P. vindemmiae* (mortalidade < 20%). Conclui-se que *A. mucosa*, *A. indica* (Azamax™ 1,2 EC) e spinetoram (Delegate™ 250 WG), e os isolados *Bti*, *Bto*, *Btk* e *Bc* em formulações com os atrativos alimentares suco de uva 50%, melaço de cana-de-açúcar 7% e proteína hidrolisada 7% demonstraram ser alternativas promissoras para o manejo de *Z. indianus*.

Palavra-chave: mosca do figo; inimigo natural; controle biológico; manejo de praga, manejo sustentável de pragas

Abstract

GEISLER, Fernanda Carla Santos. Potential of extracts based on acetogenins and *Bacillus* Sp. **In the management os *Zaprionus indianus* (Gupta, 1970) (Diptera: Drosophilidae)**. 2019. 75f. Dissertention (Entomology Master) - Programa de Pós-graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Zaprionus indianus (Gupta, 1970), Is notable for causing great damages in the production of fig purple's fruits (*ficus carica*). The damages are caused by the females in the processo of fruit ripening through oviposition in the ostiolar region, that after the hatching of the larvae, they penetrate into the fruits, making them improper. For the fig tree crop, there is no records about the chemical or biological products for the management of the fig fruit fly. So, the objective of this study was to evaluate the lethal, sublethal and oviposition toxicity of acetogenin-based bio- insecticides based on *Annona* (*Annona mucosa* Jacq., *Annona muricata* L. e *Annona sylvatica* A. St.-Hil) (discriminant concentration of 2,000 mg L⁻¹) on *Z. indianus* compared to commercial insecticide of natural origin [lemonade derived from *Azadirachta indica* (Azamax™ 1,2g/L – 3,6 mL of active ingrediente (i.a) mL per liter)] and a synthetic insecticide based on spinosyn (Spinetoram - Delegate™ 250 WG - 7.5 mg i.a. L⁻¹). In addition, to verify the toxicity of bacterial isolates *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), *Bacillus thuringiensis* *Kurstaki* (Btk), *Bacillus thuringiensis* *oswaldocruzi* (Bto) and *Bacillus circulans* (Bc) when in mixtures with food attractions on adults of *Z. indianus* and toxicity on the parasitoids *Trichopria anastrephae* Lima, 1940 and *Pachycrepoideus vindemniae* (Rondani, 1875) in ingestion bioassays. *A. mucosa* caused mortality higher than 95% in ingestion bioassay and topical application, being equivalent to the synthetic insecticide espinoteram. In repellency bioassay, *A. mucosa*, Azamax™ 1,2 EC and Delegate™ 250WG doing a significant reduction (83, 88 and 95%, respectively) in the quantity of eggs by artificial fruit. As well as, together with extracts *A. sylvatica*, *A. auricata* and Azamax™ results in a reduction of 50% egg viability. In the fields, *A. Mucosa* and Azamax™ 1,2 EC influenced negatively the infestation of *Z. indianus* in the fig fruit, doing this a significant reduction of the larvae/fruit numbers (3,6 and 2,29 larvae/fruit, respectively) about the tratament control (only water) (11 larvae/fruit), but, were statistically lower than the insecticide Delegate™ 250 WG (0.71 larvae / fruit). In the ingestion bioessay, *Z. indianus* 's adults mixed (formulation) showed high susceptibility to *Bt* isolates when in mixture (formulation) with the attractive 50% grape juice, 7% sugar cane molasses and 7% hydrolyzed protein, however, only the *Bto* isolate caused 100% mortality, 72 hours after exposure (HAE). In the use of the lethal concentrations (CLs90) of the *Bto* isolate with the food attractions, there was a significant reduction in total fecundity (between 40 to 50%) and viability of eggs

(between 35 and 57%) of *Z. indianus* females were fed the formulations containing Bto + food attractions in ingestion bioassay. However, did not showed toxicity about adults of *T. anastrephae* and *P. vindemmiae* (mortality < 20%). In conclusion that *A. mucosa*, *A. indica* (Azamax™ 1,2 EC) and espinoteram (Delegate™ 250 WG) and the isolates *Bti*, *Bto*, *Btk* and *Bc* in formulation with food atractives grape juice 50%, sugarcane molasses and 7% hydrolyzed protein 7% proved to be promising alternatives for the management of *Z. indianus*.

Key-words: fig fruit fly; natural enemy; biological control; pest management; sustainable pest management

Lista de Figuras Artigo 1

Figure 1.	Percentage mortality ($\pm$ SE) of <i>Zaprionus indianus</i> at 120 h after exposure to different treatments in laboratory bioassays.....	40
Figure 2.	Average number of eggs laid by <i>Zaprionus indianus</i> females in artificial fruit with different treatments in a laboratory bioassay: (A) Sexually mature <i>Z. indianus</i> females were confined in cages containing one artificial fruit treated in a no-choice bioassay (no-choice bioassay); (B) Sexually mature <i>Z. indianus</i> females were confined in cages containing one treated artificial fruit and one untreated fruit (choice bioassay).	41
Figure 3.	Egg viability of <i>Zaprionus indianus</i> in a dipping bioassay with artificial fruit in the laboratory	42
Figure 4.	Means ($\pm$ SE) of percentage infested fruits and number of larvae per fruit after applying an aqueous emulsion of ethanolic extract from <i>Annona mucosa</i> seeds, a commercial limonoid-based bioinsecticide (Azamax™ 1.2 EC) and the spinosyn-based synthetic insecticide (Delegate™ 250 WG) in a test conducted in a commercial fig orchard.	43

Lista de figuras Artigo 2

Figura 1.	Mortalidade de adultos de <i>Zaprionus indianus</i> ($\pm$ Erro padrão) expostos a diferentes isolados bacterianos em misturas com atrativos alimentares em diferentes tempos de exposição (horas).....	66
Figura 2.	(A) Fecundidade total e (B) viabilidade de ovos de <i>Zaprionus indianus</i> em bioensaios de ingestão.....	67
Figura 3.	Mortalidade (%) ($\pm$ Erro padrão) de <i>Trichopria anastrephae</i> e <i>Pachycrepoideus vindemmiae</i> até 168 horas após a exposição dos tratamentos em bioensaio de ingestão.....	68

Lista de Tabelas Artigo1

Table 1.	Treatments evaluated for the management of <i>Zaprionus indianus</i>	37
Table 2.	Estimate of the LC ₅₀ and LC ₉₀ (in mg L ⁻¹) and the confidence interval for a formulated ethanolic extract from <i>Annona mucosa</i> seeds and a spinosyn-based synthetic insecticide (espinetoram) in <i>Zaprionus indianus</i> adults with different exposure times in an ingestion bioassay.....	38
Table 3.	Estimate of the LC ₅₀ and LC ₉₀ (in mg L ⁻¹) as well as the confidence interval of a formulated ethanolic extract from <i>Annona mucosa</i> seeds and a spinosyn-based synthetic insecticide (espinetoram) on <i>Zaprionus indianus</i> adults with different exposure times in a topical application bioassay.....	39

Lista de Tabelas Artigo 2

Tabela 1.	Estimativa (CL ₅₀ e CL ₉₀ – UFC.ml ⁻¹) de isolados bacterianos em adultos de <i>Zaprionus indianus</i> quando em misturas com diferentes atrativos alimentares até 168 horas após a exposição.....	64
Table 2.	Estimativa do tempo letal mediano (TL ₅₀ , em horas) e do intervalo de confiança (IC) dos isolados bacterianos para adultos de <i>Z. indianus</i> utilizando a máxima concentração testada 10 ⁻¹⁰ e 10 ⁻¹¹ de cada isolado bacteriano.....	65

Sumário

CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA	15
Artigo 1 - Laboratorial and field assessments of lethal and sublethal toxicities of acetogenin-based formulated bioinsecticides against <i>Zaprionus indianus</i> (Diptera: Drosophilidae).....	19
Abstract.....	20
Introduction.....	21
Materials and Methods	23
Annonaceous derivatives: sources, crude extract preparation and formulation procedures.....	23
Tested insects.....	24
Laboratorial bioassays.....	24
Discriminatory tests (initial screening).....	24
Concentration-response curves.....	26
Oviposition deterrence assessment.. ..	26
Ovicidal effects.....	27
Efficacy under field conditions (commercial fig orchard).....	27
Data analyses.....	28
Results.....	28
Toxicities and concentration-response curves of the active treatments	28
Oviposition deterrent effects.....	29
Ovicidal effect (embryonic effects) of treatments on fertility.	30
Field experiment.....	30
Discussion	31
References	33

Artigo 2 - Toxicidade de isolados bacterianos sobre adultos de <i>Zaprionus indianus</i> e aos parasitoides <i>Trichopria anastrephae</i> e <i>Pachycrepoideus vindemmiae</i>.....	46
Resumo	47
Introdução	48
Materiais e Métodos	50
Multiplicação e manutenção dos isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>.....	50
Criação e manutenção de <i>Z. indianus</i>, <i>T. anastrephae</i> e <i>P. vindemmiae</i> e em laboratório.....	51
Toxicidade de isolados bacterianos sobre adultos de <i>Z. indianus</i>.....	51
Determinação da Concentração Letal (CL) e Tempo letal médio (TL) sobre adultos de <i>Z. indianus</i>.....	52
Efeito subletal de isolados bacterianos sobre <i>Z. indianus</i>.....	53
Toxicidade dos tratamentos ativos em <i>T. anastrephae</i> e <i>P. vindemmiae</i>	54
Dados analisados	55
Resultados	55
Discussão.....	57
Referências	60
Conclusões gerais.....	69
Referências	71

CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

O Brasil ocupa o terceiro lugar em produção de frutas a nível mundial, com elevado consumo interno sendo que a estimativa para 2018 é de aproximadamente 44 milhões de toneladas (IBGE, 2016). Os principais pólos produtores de frutíferas estão localizados nas regiões tropical, subtropical e de clima temperado (NUNES, 2017). Dentre as regiões de clima temperado, destacam-se os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. (FACHINELLO, 2011). Dentro do setor de fruticultura a nível nacional, a cultura da figueira (*Ficus carica* L.) se destaca principalmente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (SILVA et al., 2011). No Estado de São Paulo, principalmente, o município de Valinhos são colhidos em média 2,7 milhões de caixas de figo por ano, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor (SILVA et al., 2011; GUEDES, 2016).

Um dos fatores que está prejudicando a expansão da cultura e a produtividade e a qualidade final do produto, principalmente, durante o período de frutificação é a ocorrência da mosca-do-figo *Zaprionus indianus* (Gupta, 1970) (Diptera: Drosophilidae), registrada pela primeira vez no Brasil em 1999 (VILELA, 2001; VILELA et al., 2015). Contudo, fatores ligados a elevada adaptabilidade, curto período de desenvolvimento e alto potencial biótico, fez com que a espécie proporcionasse elevada distribuição populacional em todo o território brasileiro (VILELA et al., 2001; PIRES et al., 2008; MATA et al., 2010; COMMAR et al., 2012; BERNARDI et al., 2017), Em outros países, como Uruguai (GOÑI et al., 2001), América Central (VAN DER LINDE et al., 2006), Europa (COMMAR et al., 2012), Ásia (FARTYAL et al., 2014) e América do Norte (JOSHI et al., 2014; LASA et al., 2015).

Na cultura da figueira, os danos são causados aos frutos, principalmente, durante a fase de amadurecimento, principalmente, pelas fêmeas durante a oviposição na região ostiolar que, após a eclosão das larvas, ocorre à penetração

para o interior dos frutos, tornando-os impróprios para o consumo e comercialização (STEIN et al., 2003; PASINI et al., 2011). Esses danos são aumentados mediante a capacidade de ocorrer à associação com o fungo *Candida tropicalis* após a infestação, processo que acelera a depreciação dos frutos durante a comercialização, além de atrair outros drosophilídeos para a alimentação e postura, levando muitos produtores a abandonarem o cultivo em altas infestações (Raga 2002).

Devido a capacidade de infestar frutos em decomposição, a mosca-do-figo é considerada praga secundária. Na Florida (EUA), foi relatada em diferentes plantas hospedeiras e criadas em frutas subtropicais e tropicais, como: nêspera, uva, goiaba, caju e romã (JOSHI et al., 2014; Steck 2005). Este aspecto foi relacionado com a incapacidade das fêmeas ovipositarem em frutos integros sem lesões prévias ou danos mecânicos ocasionados por outros insetos-pragas (SINGH et al., 2014). Entretanto, estudos evidenciaram que as fêmeas apresentam capacidade de ovipositar em frutos danificados mecanicamente (FARTYAL et al., 2014), assim como, observados em frutos maduros íntegros de morango (BERNARDI et al., 2017). Em associação com *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Díptera:Drosophilidae), causa sérios danos a cultura do morango (BERNARDI et al., 2017).

Para a cultura da figueira, não temos produtos químicos ou biológicos registrados junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle da mosca-do-figo. Contudo, estudos demonstraram que a utilização de protetores ostíolares em frutos de figo pode ser uma alternativa viável para diminuir a incidência e perdas de produção ocasionada por *Z. indianus* (RAGA et al., 2003). Frente a baixa disponibilidade de estratégias de manejo, estudos são necessários para desenvolver novas alternativas de manejo desta praga nos cultivos frutíferos.

Para a disponibilidade de encontrar alternativas ambientalmente seguras e sustentáveis para o manejo de artrópodes-pragas nos cultivos agrícolas, foi caracterizado recentemente que inseticidas botânicos podem desempenhar um papel importante em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), sendo uma alternativa aos inseticidas sintéticos convencionais (ISMAN & GRIENEISEN, 2014). Estudos de triagem com espécies da diversificada flora tropical têm sido conduzidos visando identificar novos compostos e novas fontes de inseticidas botânicos passíveis de serem utilizados na proteção de cultivos (RIBEIRO et al., 2016) e com

elevada toxicidade letal sobre várias espécies de artrópodes-pragas (RIBEIRO et al., 2014; SOUZA et al., 2017).

Da mesma forma, o uso microorganismos entomopatogênicos *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Berliner 1911, 1915) podem ser promissores como agentes biocontroladores de insetos-pragas e tornar-se uma nova alternativa de manejo de *Z. indianus*, assim como, demonstrado para várias espécies de insetos-pragas quando avaliado sobre larvas e adultos de espécies de moscas (SHISHIR et al., 2015; COSSENTINE et al., 2016).

Da mesma forma, ambas as estratégias de manejo (extratos à base de acetogeninas e a base de *B. thuringiensis*) quando usados de forma isolada em formulações de iscas tóxicas demonstraram que podem afetar o comportamento alimentar e de oviposição em diferentes espécies de insetos-pragas (RIBEIRO et al., 2014; COSSENTINE et al., 2016; MARTINS et al., 2018). Estes aspectos são benéficos nos programas de MIP por afetar negativamente a dinâmica populacional da praga ao longo das gerações e, principalmente, diminuir a incidência de posturas nas frutas e, consequentemente, a entrada de patógenos que podem acelerar os processos de deteriorização (BERNARDI et al., 2017). Diante do exposto e das evidências da elevada bioatividade de extratos de annonaceas ou acetogeninas e da elevada patogenicidade de *B. thuringiensis* em espécies da ordem diptera, o objetivo desse estudo foi desenvolver estratégias para o manejo sustentável de *Z. indianus*, com o intuito de fornecer subsídios para o controle da mosca-do-figo em sistemas convencionais e orgânicos da fruta.

Manuscrito 1- Environmental Entomology

(Versão em Inglês)

**Laboratorial and field assessments of lethal and sublethal toxicities of
acetogenin-based formulated bioinsecticides against *Zaprionus indianus*
(Diptera: Drosophilidae)**

Fernanda Carla Santos Geisler¹, Liliane Nachtigall Martins², Rute Caroline Becker
Treptow², Cléber Antonio Baronio², Paloma Stupp², Leandro do Prado Ribeiro³,
Flávio Roberto Mello Garcia^{1,2}, Daniel Bernardi^{1,2*}

Manuscrito 1 -

Daniel Bernardi
Federal University of Pelotas
Pelotas, RS, Brazil
Zip code 96010900
E-mail: dbernardi2004@yahoo.com.br

Laboratorial and field assessments of lethal and sublethal toxicities of acetogenin-based formulated bioinsecticides against *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae)

Fernanda Carla Santos Geisler¹, Liliane Nachtigall Martins², Rute Caroline Becker Treptow²,
Cléber Antonio Baronio², Paloma Stupp², Leandro do Prado Ribeiro³, Flávio Roberto Mello
Garcia^{1,2}, Daniel Bernardi^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS 96010900, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS 96010900, Brazil

³Embrapa Clima Temperado, BR 392, KM 78, Caixa Postal 403, CEP 96010-970, Pelotas, RS. Brasil.

*Correspondence to: Daniel Bernardi, E-mail: dbernardi2004@yahoo.com.br

Abstract - Neotropical Annonaceae-derived bioinsecticides have shown promising control of insect pest species. In order to develop an alternative tool for control of *Zaprionus indianus* (Gupta, 1970), an important invasive pest of Brazilian orchards, this study investigated the insecticidal activity of a formulation prepared from ethanolic seed extract of different *Annona* species (*Annona mucosa* Jacq., *Annona muricata* L. and *Annona sylvatica* A. St.-Hil) at discriminatory concentration of 2,000 mg L⁻¹ in comparison with alimonoid-based bioinsecticide Azamax[®] 1.2 EC and synthetic insecticide Delegate[®] 250 WG (spinetoram) as positive controls. In an ingestion and topical application bioassay, the formulation based on *A. mucosa* caused more than 95% mortality, which was equivalent to the mortality caused by the synthetic insecticide spinetoram. In a free-choice bioassay, *A. mucosa* (83%), Azamax[®] 1.2 EC (88%) and Delegate[®] 250 WG (98%) produced a significant reduction in the number of eggs/fruit. In addition, formulations based on *A. mucosa*, *A. sylvatica*, *A. muricata* and Azamax[®] 1.2 EC resulted in a 50% reduction in egg viability. In the field, *A. mucosa* and Azamax[®] 1.2 EC negatively influenced the infestation by *Z. indianus* in figs, producing a significant reduction in the number of larvae per fruit (3.6 and 2.29 larvae per fruit, respectively) in relation to the control treatment (11 larvae per fruit). However, they were statistically inferior to the insecticide Delegate[®] 250 WG (0.71 larvae per fruit). Thus, *A. mucosa*, Azamax[®] 1.2 EC and spinetoram have the potential to be used in the framework of *Z. indianus* management.

KEYWORDS: Fig fly, *Annonaceae*, rolliniastatin-1, sustainable pest management.

56

57 **Introduction**

58 The fig fly, *Zaprionus indianus* (Gupta, 1970), has high adaptability and a short
59 developmental period. The high biotic potential of *Z. indianus* has resulted in a fast
60 distribution and adaptation of the pest in Brazil and several fig-producing regions, including
61 Uruguay, Central America, Europe (Commar et al. 2012), and North America (Joshi et al.
62 2014, Lasa et al. 2015). *Z. indianus* females cause damage by oviposition in the ostiolar
63 region of the fruit and, after hatching, the larvae penetrate the fruit, making it unfit for
64 consumption and commercialization (Joshi et al. 2014, Lasa et al. 2015).

65 Fig (*Ficus carica* L., Moraceae) is a widely cultivated species, especially in regions
66 with a semi-arid climate where there is irrigation, with an annual world production of
67 approximately one million tons, and is mainly concentrated in the Mediterranean (Veberic et
68 al. 2008). In Brazil, fig crops are widely grown on small farms, especially in the South and
69 Southeast regions, and there is a high demand from import markets, especially Holland,
70 France and Germany (Commar et al. 2012). However, one of the leading technological
71 limitations of the crop, which has made it difficult to obtain higher yields and profitability, is
72 the occurrence of the fig fly, *Zaprionus indianus* (Gupta, 1970) (Diptera: Drosophilidae), an
73 invasive exotic pest recorded for the first time in Brazil in 1999 (Vilela 1999).

74 One of the main strategies adopted for the management of *Z. indianus* in Brazilian
75 orchards is the application of styrofoam protectors (Raga et al. 2003). Although efficient in
76 reducing infestation and fruit damage, this technique demands a large workforce and time
77 (Raga et al. 2003).

78 Therefore, farmers resort to using synthetic insecticides in an emergency when
79 conditions of high pest infestations occur, even though there are no registered products for the
80 crop in Brazil. Efficient and environmentally appropriate strategies have been one of the

81 targets of tropical and temperate fruit production systems and Integrated Pest Management
82 (IPM) programs in general. In this context, the use of botanical insecticides has been an
83 essential alternative to synthetic pesticides in integrated production programs (Isman et al.
84 2014). Given this potential and the great diversity of botanical species with a potential
85 insecticide present in the tropical flora, screening studies have been carried out in Brazil
86 aiming to identify new compounds and new sources of botanical insecticides that can be used
87 to protect crops (Ribeiro et al. 2016).

88 Among the derivatives of tropical plant species with insecticidal potential, crude and
89 semipurified extracts of Annonaceae have demonstrated great potential in the management of
90 different pest arthropods in different production systems (Ribeiro et al. 2013, Ansante et al.
91 2015, Gonçalves et al. 2015, Bernardi et al. 2017a). The insecticidal/insectistatic activity of
92 Annonaceae derivatives is attributed in particular to the presence of structurally diverse
93 acetogenins in their composition, a class of natural compounds found exclusively in some
94 genera of this botanical family (Alali et al. 1999). In addition to the lethal effects, the
95 deterrent effects of the feeding and oviposition can be caused by derivatives rich in
96 acetogenins or isolated compounds (Ribeiro et al. 2015, Bernardi et al. 2017a), which is
97 compatible with IPM (Hikal et al. 2017) and biological control (Ribeiro et al. 2014a; Bernardi
98 et al. 2017a).

99 To date, no study has been conducted to evaluate the effect of botanical extracts on *Z.*
100 *indianus*. However, botanical insecticides based on acetogenins have demonstrated high
101 toxicity on *Drosophila* species such as *Drosophila suzukii* (Diptera Drosophilidae) (Bernardi
102 et al. 2017a), as well as azadirachtin-based formulations on *Drosophila melanogaster*
103 (Diptera Drosophilidae) (Oulhaci et al. 2018). Due to that potential, which has been
104 demonstrated in laboratory and field trials, the present study aimed to evaluate the lethal
105 toxicity of formulations of ethanolic extracts obtained from seeds of pre-selected species of

neotropical *Annona* (*Annona mucosa* Jacq., *Annona muricata* L. and *Annona sylvatica* A. St.-Hil), compared to a commercial insecticide of natural origin [limonoids derived from *Azadirachta indica* (neem)] and a synthetic insecticide (spinosyn) in the management of *Z. indianus*. Also, tests were carried out to evaluate the effect of these treatments on oviposition and embryonic development (ovicidal effect) of *Z. indianus* in artificial fruits.

Materials and Methods

Annonaceous derivatives: sources, crude extract preparation and formulation procedures. Detailed information on the origin of *Annona* species used in this study (Table 1) is found in. Voucher specimens, previously identified by Prof. Dr. Renato Mello-Silva [Department of Botany, Biosciences Institute/University of São Paulo (IB/USP)], were deposited in the herbarium of the Department of Biological Sciences at “Luiz de Queiroz” College of Agriculture/University of São Paulo, Piracicaba Municipality, São Paulo State, Brazil under the registered numbers 120985 (*A. mucosa*), 121205 (*A. sylvatica*) and 121892 (*A. muricata*). For crude extract preparation, seeds collected from ripe fruits were oven-dried at 38 °C for 48 h and then milled to a powder in a knife mill. Powders were stored in sealed glass containers and stored at approximately -10 °C until use. Organic extracts were obtained by cold maceration using analytical grade ethanol as a solvent (5:1 v/v – volume per volume), with the seed powder stored in ethanol for three days, followed by filtering through filter paper. This process was repeated three times. The remaining solvent was removed *in vacuo* at 50 °C. After complete evaporation of the solvent in an airflow chamber, the extraction yield for each species was determined. For preparation of aqueous emulsified formulations, the ethanolic seed-extracts were solubilized in the organic solvents acetone:methanol (1:1 v/v) at 100 g L⁻¹, with subsequent addition of Tween[®] 80 emulsifier at a concentration of 10 g L⁻¹.

Tested insects. *Z. indianus* used in the bioassays were obtained from a colony established from specimens collected from a strawberry crop (*Fragaria × ananassa*) in April 2017, located in Pelotas (31°38'20"S and 52°30'43"W), Rio Grande do Sul State, Brazil and kept in the laboratory for approximately the 15th generation without pressure of selection by insecticides. For insect rearing, infested strawberry fruits were placed in a thermal box and sent to the laboratory where they were weighed and individually placed in plastic pots (150 mL) with a perforated lid (2 cm in diameter) and covered with voile fabric containing a thin layer of vermiculite (1 cm). The fruits were kept in an air-conditioned room at 23 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ relative humidity (RH) and a 12:12 h (light:dark) photoperiod until adult emergence. Subsequently, the flies (male and female) were transferred to a flat-bottomed glass container (8.5 cm high by 2.5 cm in diameter) containing artificial diet (8 mL), consisting of corn flour, sugar and yeast (Schlesener et al. 2017).

Laboratorial bioassays. All laboratorial bioassays were performed under controlled conditions (25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ RH and a 12-h photoperiod) using a completely randomized design. The treatments and discriminatory concentrations used are detailed in Table 1. The formulation based on spinetoram (Delegate[®] 250WG, 7.5 mg of active ingredient (a.i). L⁻¹) (Dow AgroSciences, Santo Amaro, São Paulo State, Brazil) and the limonoid-based bioinsecticide (Azamax[®] 1.2 EC azadirachtin + 3-tigloil-azadiractol, 1.2 mL of a.i. L⁻¹) (UPL Brasil (UPL Brasil - Campinas, SP, Brazil) were used as positive controls (Table 1).

Discriminatory tests (initial screening). In order to assess the lethal toxicity of the formulated annonaceous derivatives, initial tests were performed using the discriminatory concentration of 2000 mg L⁻¹ on *Z. indianus* adults (Table 1). For this purpose, we used

ingestion and topical application bioassays. For the ingestion bioassays, insects were separated into groups (sample units) of 20 adults of *Z. indianus* (eight-day-old) and placed inside cages made from clear plastic cups (1 L) and flipped upside-down on a plastic petri dish (25 cm in diameter) and sealed on top (cup bottom) with a *voile* mesh for ventilation. After preparation of appropriate dilutions, the products were offered to the insects by capillarity in cotton wool rolls inside 10-mL glass vials for 24 h. After this period, food and distilled water replaced the glass tubes with treated cotton until the end of the evaluation period, according to the method described by Schlesener et al. (2017). Mortality was evaluated for up to 120 h after the beginning of treatment. In both experiments, flies were considered to be dead when no movement occurred after touching with a fine brush. For each treatment, we used four replicates each composed of 20 flies ($n = 80$).

In the topical application bioassay, the insects were divided into groups of 10 *Z. indianus* adults (eight-day-old) inside clear glass test tubes (2.5 cm in diameter $\times$ 8 cm in length) sealed with a cotton plug. Spraying was carried out by, firstly, sedating insects by placing the glass test tubes in the freezer for 30 to 40 s and then placing the insects in a glass Petri dish (9 cm in diameter) lined with filter paper. The insects were then sprayed using a Precision Laboratory Spray Tower (Burkard Scientific, Uxbridge, UK), applying 1 mL of spray solution per sample unit at a working pressure of 7 lb in⁻², resulting in an average residue deposition of 3 mg cm⁻². After spraying, the insects were carefully placed inside clear plastic cup cages (100 mL) sealed with a venting lid (a *voile* mesh-sealed opening in the cup lid). Inside these cages, flies were provided with liquid food and water until the end of the evaluation period, according to the method described by. Mortality was evaluated for up to 120 h after the beginning of the treatment as described previously. For each treatment, we used 10 replicates with 10 flies in each ($n = 100$).

Concentration-response curves. Based on initial screening, the most promising

treatments were selected and submitted to a new bioassay in order to estimate the concentration required to kill 50% and 90% of exposed flies (LC₅₀ and LC₉₀, respectively).

For this purpose, seven concentrations (125–4000 mg L⁻¹ for the *A. mucosa* formulated extract, and 10-100 mg L⁻¹ for spinetoram) were defined for each insecticide and the mode of exposure based on the procedure proposed by (Finney 1971). The exposure and evaluation procedures, as well the mortality criteria, were the same as those used in the initial tests. In the ingestion bioassays, four replicates each comprising 20 flies ($n = 80$) for each concentration of each insecticide were used. In the topical application bioassays, 10 replicates each comprising 10 flies ($n = 100$) were used for each concentration of each insecticide tested.

Oviposition deterrence assessment. To assess the effect of treatments on female

oviposition behavior, flies were submitted to choice and no-choice oviposition bioassays. For this purpose, artificial fruit were prepared with agar (19 g), raspberry gelatin (10 g), methyl paraben (Nipagin®; 8 mL; 0.8 g dissolved in 8 mL of 99.9% absolute ethyl alcohol) and distilled water (refluxed; 850 mL), in accordance with the adapted method proposed by (modified from Salles 1992). For the no-choice oviposition bioassay, artificial fruits were dipped in the treatment solutions (Table 1) for 5 s. Later, they were dried on filter paper for 3 h and then each artificial fruit (sample unit) was placed inside a cage (clear 1000-mL plastic cups inverted on a Petri dish, 8 cm in diameter) containing 10 eight-day-old *Z. indianus* flies (five pairs) for oviposition.

In the free-choice oviposition bioassay, the experiment was conducted in semi-transparent plastic cages under the same conditions described for the no-choice bioassay. Later, two artificial fruits (untreated and treated) were placed inside each cage containing two five-day-old pairs of *Z. indianus* flies for oviposition, as described above. The artificial fruits were

placed equidistant from each other. In both types of oviposition bioassays, after artificial fruits exposed for 24 h, the adults were removed and the eggs in the artificial fruit were counted with the aid of a stereoscopic microscope (40×). In each type of bioassay, we used 30 replicates per treatment.

Ovicidal effects. To obtain *Z. indianus* eggs, an artificial fruit was placed inside the cage [clear plastic 200-mL cups inverted on a Petri dish (8 cm in diameter)] containing ten eight-day-old flies (five pairs) of *Z. indianus* to serve as an oviposition substrate. After 24 h of oviposition, the artificial fruits contained *Z. indianus* eggs were dipped in the treatments (Table 1) for 5 s and then were left to dry on filter paper for 3 h. After this period, the artificial fruits were individually packed inside 200-mL plastic cups on a sheet of filter paper (3 cm in diameter), which were closed at the top with its respective lid and kept in an air-conditioned room as previously described. The number of larvae hatching was counted using a stereoscopic microscope (40×) after three days, the time required for larvae to hatch. For each treatment, 30 replicates were used.

Efficacy under field conditions (commercial fig orchard). The efficacy of the formulated *A. mucosa* at 2000 ml L⁻¹ compared with a limonoid-based bioinsecticide (Azamax[®] 1.2 EC) and a spinetoram-based synthetic insecticide (Delegate 250 WG[®]) were also evaluated in a commercial fig orchard (var. ‘Roxo de Valinhos’; approximately 5-year-old trees) with plants grown with 2.5 × 5 m spacing (between plants and between rows, respectively), located in Pelotas, RS, Brazil (31°42'20"S and 52°27'31"W). No pesticide spraying took place in this orchard before the start of the experiment. The treatments were applied at weekly intervals over a four-week period, with the first application of treatment at the beginning of fruit formation. The applications were carried out using a 5-liter capacity

spray (PJH model), equipped with an empty cone-type nozzle (model JA-1,5; Máquinas Agrícolas Jacto S.A, Pompéia, SP). The treatments were sprayed to saturation (volume of syrup was approximately 500 L ha⁻¹), with the jets directed toward the fruits. The experimental design was completely randomized with five replicates per treatment, and each replicate was composed of one plant. The evaluation of the natural infestation of *Z. indianus* was carried out in the fruit harvesting period using the random selection of 10 ripe fig fruits per plant, totaling 50 fruits per treatment. The variables analyzed were: 1) % of fruits infested by *Z. indianus* larvae; and 2) the average number of *Z. indianus* larvae per fruit.

Data analyses. For the analyses of studied variables, we used generalized linear models (GLM) of the exponential family of distributions (Nelder et al. 1972). The verification of quality adjustment was performed through the half-regular graph odds with simulation envelope (Hinde et al. 1998). When significant differences were detected between treatments, multiple comparisons (Tukey's test, $P < 0.05$) were performed using the *glht* function of the Multicomp package, with adjustment of P-values. For comparisons of the average of two treatments in the oviposition bioassay (choice test), we used the Student's t-test. All analyses were performed using "R" statistical software (R Development Core Team 2012). A binomial model with a complementary log-log link function (gompit model) was used to estimate the lethal concentrations (LC₅₀ and LC₉₀) using the *Probit Procedure* in the SAS statistical software package version 9.2 (SAS Institute 2011).

Results

Toxicities and concentration-response curves of the active treatments. After 120 h of exposure, the *A. mucosa* formulation (2000 mg L⁻¹) and spinetoram (75 mg L⁻¹) showed

high toxicity, with levels of fig fly mortality greater than 90% via ingestion and/or by topical application (Fig. 1). These values were significantly higher [topical application ($F_{6, 21} = 60.101$; $P < 0.0001$); ingestion ($F_{6, 21} = 55.517$; $P < 0.0001$)] than those of formulations prepared from *A. sylvatica* and *A. muricata* seeds or the limonoid-based bioinsecticide, which caused mortalities of between 40 and 60%, both in the ingestion bioassay and with topical application (Fig. 1). Based on concentration-response curves for the ingestion bioassay, the toxicity of the *A. mucosa* formulation was lower ($LC_{50} = 454.45 \text{ mg L}^{-1}$) than spinetoram ($LC_{50} = 15.12 \text{ mg L}^{-1}$) at 120 h (Table 2). Likewise, in relation to LC_{90} values, the toxicity of *A. mucosa* was lower than spinetoram; LC_{90} values were 1553.4 mg L^{-1} and 68.67 mg L^{-1} , respectively, at 120 h after exposure to toxic baits (Table 2). Regardless of treatments, the levels of mortality were concentration-dependent with significantly increased mortality throughout the exposure period. In the topical application bioassays, the estimated LC_{50} at 120 h for spinetoram-based insecticide was significantly lower ($LC_{50} = 16.06 \text{ mg L}^{-1}$) than observed with *A. mucosa* ($LC_{50} = 389.13 \text{ mg L}^{-1}$) (Table 3). In relation to LC_{90} values, the toxicity of spinetoram ($LC_{90} = 45.78 \text{ mg L}^{-1}$) was higher than *A. mucosa* ($LC_{90} = 1457.7 \text{ mg L}^{-1}$) at 120 h after application (Table 3). Again, the mortality levels increased significantly throughout the exposure period.

Oviposition deterrent effects. In a no-choice oviposition bioassay, the dried residues of all treatments significantly reduced ($F_{5, 29} = 55.721$; $P < 0.0001$) the oviposition of *Z. indianus* on the artificial fruits when compared to the negative controls (Fig. 2A), with exception of *A. sylvatica* formulated extract. Similarly, in the choice bioassay, there were a significantly reduced number of deposited eggs per artificial fruit containing the dried residues of *A. mucosa* formulation (1.3 eggs per fruit; $t = 8.36$, d.f. = 46.02; $P < 0.0001$), limonoid-based bioinsecticide (1.0 eggs per fruit; $t = 8.0748$, d.f. = 32.60; $P < 0.0001$) and

spinetoram (0.2 eggs per fruit; $t = 12.99$, d.f. = 30.276; $P < 0.0001$) when compared with untreated artificial fruit (Fig. 2B). In contrast, formulated *A. sylvatica* extract (7.8 eggs per fruit; $t = 1.66$, d.f. = 50.89; $P = 0.1015$) and formulated *A. muricata* extract (5.7 eggs per fruit; $t = 0.72$, d.f. = 55.79; $P = 0.4698$) did not differ significantly from untreated artificial fruits (Fig. 2B).

Ovicidal effect (embryonic effects) of treatments on fertility. In the dipping bioassay with artificial fruit, spinetoram caused the greatest reduction in egg viability of the treatments (2.33%; Fig. 3). However, the *A. mucosa* formulation (48.8% egg viability), formulated *A. muricata* seed-extract (52.2%), formulated *A. sylvatica* seed-extract (45.5%) and limonoid-based bioinsecticide (43.3%) resulted in a significant reduction in egg viability ($F = 60.88$; d.f. = 6, 20; $P < 0.0001$) compared with the negative controls of water and tween + methanol + water (81.3 and 80.7%, respectively; Fig. 3).

Field experiment. In the test conducted in a fig orchard with cv. Roxo de Valinhos, the formulated *A. mucosa* at 2000 mg L⁻¹ and insecticide-based limonoids caused a significant reduction ($F = 69.33$; d.f. = 3, 26; $P < 0.0001$) in fruit infestation by *Z. indianus* compared to the negative control (Fig. 4). However, the activity level of these treatments was lower than the positive control (spinetoram), in which only 1.43% of infested fruits were observed (Fig. 4). This aspect reflected significantly ($F = 35.62$; d.f. = 3, 26; $P < 0.0001$) in a reduction in the number of *Z. indianus* larvae in fruits at the harvest time, with the extract formulated from seeds of *A. mucosa* (3.6 larvae per fruit), the limonoid-based bioinsecticide (2.3 larvae per fruit) and spinetoram (0.71 larvae per fruit) being the most promising treatments (Fig. 4). Again, the positive control represented by the insecticide spinetoram was the treatment that resulted in the most significant reduction in the number of larvae per fruit.

Discussion

Our results, obtained under laboratory and field conditions, indicated the promising action of the *A. mucosa* formulation on *Z. indianus*, with a higher level of activity than that observed from the application of a commercial formulation based on limonoids (Azamax[®] 1.2 EC) and, in some cases, similar to the spinosyn-based insecticide (Delegate[®] 250 WG), both used as positive controls. Several studies have demonstrated the toxicity of *A. mucosa* formulation to other pest species, including *D. suzukii* (Bernardi et al. 2017b), *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1855) (Coleoptera: Curculionidae) (Ribeiro et al. 2013), *Panonychus citri* (McGregor, 1916) (Prostigmata: Tetranychidae) (Ribeiro et al. 2014b), *Trichoplusia ni* (Hübner, 1803) (Lepidoptera: Noctuidae) and *Myzus persicae* Sulzer, 1776 (Aphidomorpha: Aphididae) (Ribeiro et al. 2014c), *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) (Ansante et al. 2015). Thus, our results extend the spectrum of activity of the pre-commercial *A. mucosa* bioinsecticide and indicate the possibility of its application in a fig production system lacking registered insecticides and efficient management alternatives.

Our previous studies demonstrated that the bioactivity of *A. mucosa* is due to the synergy of compounds from different chemical classes (especially acetogenins, alkaloids and triglycerides) and/or of different polarities (Ribeiro et al. 2013), where bis-tetrahydrofuranic acetogenin rolliniastatin-1 is the major active component (Ansante et al. 2015). These molecules are inhibitors of complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase) in the mitochondrial electron transport system, with inhibition inducing cellular death (Audsley et al. 2015). As most insecticides used in the control of *Z. indianus* act on acetylcholine receptors or on sodium channels (Casida et al. 2013), the search for products with a different mode of action (e.g., acetogenins) may contribute to the management of resistant populations (Audsley et al. 2015). Currently, no populations of *Z. indianus* resistant to insecticides have been reported. However, with high polyphagy, a short generation time and rapid dispersion

(Joshi et al. 2014), associated with the continued use of insecticides, the selection pressure is high for the appearance of resistant populations (Haye et al. 2016).

In addition to the lethal toxicity of *A. mucosa* formulation on *Z. indianus* in ingestion bioassays and topical application, promising oviposition effects have also been found, as well as for the bioinsecticides based on limonoids and spinosyn. These sublethal effects may affect the population density of *Z. indianus* and this was observed in the field experiments, where fig fruits were sprayed with such treatments and showed a significant reduction in the percentage of infested fruits and, consequently, the number of larvae per fruit. Thus, its combining effects on oviposition combined with adult mortality could be an important part of an IPM program, where the deterrence of oviposition is beneficial because of the negative effect on the population dynamics in future generations (Kogan 1998).

The extracts prepared from *A. muricata* and *A. sylvatica* seeds, as well as the formulation based on limonoids purified from neem, showed low toxicity to *Z. indianus*. However, they caused a repellency effect by reducing the capacity of female oviposition by up to 50%, corroborating the field results for Azamax™ 1.2 EC and results observed with other pest species (Ribeiro et al. 2015, Bernardi et al. 2017a). Furthermore, products that decrease oviposition in *Z. indianus* reduce the incidence of epidermis rupture by oviposition, which consequently reduces infestation by pathogens that increase the processes of fruit decay (Van Timmeren et al. 2013).

Although some synthetic insecticides, including organophosphates and pyrethroids, are highly toxic to *Z. indianus* (Andreazza et al. 2017a), the use of such products can leave chemical residues on fruits and are not registered for use in the management of this pest species in Brazil. There is a particular concern about these residues when the insecticides are applied during the pre-harvest and fruit-ripening periods, which are the periods most preferred for infestation by *Z. indianus* (Bernardi et al. 2017a). Thus, given the ease of production and rapid

degradation and low residual effect (Ribeiro et al. 2015), formulations based on *A. mucosa* seed extracts can be an additional tool for use in the management of *Z. indianus*, as observed with *D. suzukii* by Bernardi et al. (2017b). In addition, the formulation based on the extract of *A. mucosa* caused low toxicity in the *T. anastrephae* parasitoid, which is considered the most common pupal parasitoid in the main fruit production areas in Brazil (Bernardi et al. 2017a), and entomopathogenic species of fungi with wide natural occurrence in orchards or even used in microbial pest control programs (Ribeiro et al. 2014a).

Despite the commercial availability of Annonaceae-derived products in Eastern countries (Anosom[®], AnonaCin[®] and Bio-Rakshak[®]), the greatest species diversity is found in Brazil, many of which are widely grown on commercial scales and seeds considered an agroindustrial residue (Isman et al. 2014, Ribeiro et al. 2014). The use of these residues in the preparation of new bio-insecticides can transform problems into more environmentally-suitable solutions for agriculture. In the light of our findings, the formulation prepared from ethanolic seed-extract of *A. mucosa* and can be a useful and a promising component for the management of *Z. indianus*, particularly in organic or low residue production systems.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) for financial support and scholarships conceived - Financing Code 001.

References

- Andreazza, F., D. Bernardi, C. A. Baronio, J. Pasinato, D. E. Nava, and M. Botton. 2017a.** Toxicities and effects of insecticidal toxic baits to control *Drosophila suzukii* and *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). Pest. Manag. Sci. 73: 146-152.

- 382 **Ansante, T. F., L. P. Ribeiro, K. U. Bicalho, J. B. Fernandes, P. C. Vieira, and J. D.**
 383 **Vendramim. 2015.** Secondary metabolites from Neotropical Annonaceae: screening,
 384 bioguided fractionation, and toxicity to *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera:
 385 Noctuidae). Ind. Crop. Prod. 74: 969-976.
- 386 **Audsley, N., and R. E. Down. 2015.** G protein coupled receptors as targets for next
 387 generation pesticides. Insect. Biochem. Mol. Biol. 67: 27–37.
- 388 **Alali, F. Q., X. X. Liu, and J. L. McLaughlin. 1999.** Annonaceous acetogenins: recent
 389 progress. J. Nat. Prod. 62: 504-540.
- 390 **Bernardi, D., F. Andreazza, M. Botton, C. A. Baronio, and D. E. Nava. 2017a.**
 391 Susceptibility and interactions of *Drosophila suzukii* and *Zaprionus indianus* (Diptera:
 392 Drosophilidae) in damaging strawberry. Neotrop. Entomol. 46: 1-7.
- 393 **Bernardi, D., L. P. Ribeiro, F. Andreazza, C. Neitzke, E. E. Oliveira, M. Botton, D. E.**
 394 **Nava, and J. D. Vendramim. 2017b.** Potential use of *Annona* by products to control
 395 *Drosophila suzukii* and toxicity to its parasitoid *Trichopria anastrephae*. Ind. Crop. Prod.
 396 110: 30-35.
- 397 **Casida, J. E., and K. A. Durkin. 2013.** Neuroactive insecticides: targets, selectivity,
 398 resistance, and secondary effects. Annu. Ver. Entomol. 58: 99-117.
- 399 **Commar, L. S., L. G. D. Galego, C. R. Ceron, and C. M. A. Carareto. 2012.** Taxonomic
 400 and evolutionary analysis of *Zaprionus indianus* and its colonization of Palearctic and
 401 Neotropical regions. Genet. Mol. Biol. 35: 395-406.
- 402 **Finney, D. J. 1971.** Probit Analysis, 3rd ed Cambridge University Press.
- 403 **Gonçalves, G. L. P., L. P. R. Ribeiro, L. Gimenes, P. C. Vieira, M. F. G. F. Silva, M. R.**
 404 **Forim, J. B. Fernandes, and J. D. Vendramim. 2015.** Lethal and sublethal toxicities of
 405 *Annona sylvatica* (Magnoliales: Annonaceae) extracts to *Zabrotes subfasciatus*
 406 (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). Fla. Entomol. 98: 921-928.

- 407 **Haye, T., P. Girod, A. G. S. Cuthbertson, X. G. Wang, K. M. Daane, K. A. Hoelmer, C.**
 408 **Baroffio, J. P. Zhang, and N. Desneux. 2016.** Current SWD IPM tactics and their
 409 practical implementation in fruit crops across different regions around the world. *J. Pest.*
 410 *Sci.* 89: 643-651.
- 411 **Hikal, W. M., R. S. Baeshen, and H. A. H. Said-Al Ahl. 2017.** Botanical insecticide as
 412 simple extractives for pest control. *Cogent Biology* 3: 1404274.
- 413 **Hinde, J., and C. G. Demétrio. 1998.** Overdispersion: models and estimation. *Comput. Stat.*
 414 *Data. Anal.* 27: 151–170.
- 415 **Isman, M. B., and M. L. Grieneisen. 2014.** Botanical insecticide research: many
 416 publications, limited useful data. *Trends. Plant. Sci.* 19: 140–145.
- 417 **Joshi, N. K., D. J. Biddinger, K. Demchak, and A. Deppen. 2014.** First report of *Zaprionus*
 418 *indianus* (Diptera: Drosophilidae) in commercial fruits and vegetables in Pennsylvania. *J.*
 419 *Pest. Sci.* 14: 259-263.
- 420 **Kogan, M. 1998.** Integrated pest management: historical perspectives and contemporary
 421 developments. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 243-270.
- 422 **Lasa, R., and E. Tadeo. 2015.** Invasive Drosophilid Pests *Drosophila suzukii* and *Zaprionus*
 423 *indianus* (Diptera:Drosophilidae) in Veracruz, Mexico. *Fla. Entomologist.* 98: 987- 988.
- 424 **Nelder, J. A., and R. W. M. Wedderburn. 1972.** Generalized linear models. *J R Stat Soc Ser*
 425 *A (Gen)* 135: 370-384.
- 426 **Oulhaci, C. M., B. Denis, S. Kilani-Morakchi, J. C. Sandoz, L. Kaiser, D. Joly, and N.**
 427 **Aribi. 2018.** Azadirachtin effects on mating success, gametic abnormalities and progeny
 428 survival in *Drosophila melanogaster* (Diptera). *Pest. Manag. Sci.* 74: 174-180.
- 429 **R DCT. 2012.** R: A Language and Environment for Statistical Computing R Foundation for
 430 Statistical Computing, Vienna (Online:) <https://http://www.r-project.org/>.

- 431 **Raga, A., M. F. Souza Filho, and M. E. Sato. 2003.** Eficiência de protetores de ostíolo do
 432 figo sobre a infestação da mosca *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: Drosophilidae) no
 433 campo. Arq. Inst. Biol. 70: 287-289.
- 434 **Ribeiro, L. P., J. D. Vendramim, K. U. Bicalho, M. S. Andrade, J. B. Fernandes, R. A.**
 435 **Moral, and C. G. B. Demétrio. 2013.** *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): a promising
 436 source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots (Coleoptera:
 437 Curculionidae). J. Stored. Prod. Res. 55: 6-14.
- 438 **Ribeiro, L. P., L. H. C. Mota, C. P. D'Alessandro, J. D. Vendramim, and I. Delalibera**
 439 **Júnior. 2014a.** In vitro compatibility of an acetogenin-based bioinsecticide with three
 440 species of entomopathogenic fungi. Fla. Entomol. 97: 1395-1403.
- 441 **Ribeiro, L. P., O. Z. Zanardi, J. D. Vendramim, and P. T. Yamamoto. 2014b.**
 442 Comparative toxicity of an acetogenin-based extract and commercial pesticides against
 443 citrus red mite. Exp. Appl. Acarol. 64: 87-98.
- 444 **Ribeiro, L. P., Y. Akhtar, J. D. Vendramim, and M. B. Isman, 2014c.** Comparative
 445 bioactivity of selected seed extracts from Brazilian *Annona* species and an acetogenin-
 446 based commercial bioinsecticide against *Trichoplusia ni* and *Myzus persicae*. Crop. Prot.
 447 62: 100-106.
- 448 **Ribeiro, L. P., M. S. Santos, G. L. P. Gonçalves, and J. D. Vendramim. 2015.** Toxicity of
 449 an acetogenin-based bioinsecticide against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and its
 450 parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). Fla. Entomol. 98: 835-842.
- 451 **Ribeiro, L. P., J. D. Vendramim, G. P. Gonçalves, T. F. Ansante, E. M. Gloria, J. C.**
 452 **Lopes, R. Mello-Silva, and J. B. Fernandes. 2016.** Searching for promising sources of
 453 grain protectors in extracts from Neotropical Annonaceae. Bol. Latinoam. Caribe. Plantas
 454 Med. Aromát 15: 215–232.

- 455 **SAS Institute. 2011.** Statistical Analysis System: Getting Started with the SAS Learning, 92
456 ed. SAS Institute, Carry, NC.
- 457 **Schlesener, D. C. H., J. Wollann, A. P. Kruger, L. N. Martins, F. C. Geisler, and F. R.**
458 **M. Garcia. 2017.** Rearing method for *Drosophila suzukii* and *Zaprionus indianus*
459 (Diptera: Drosophilidae) on artificial culture media. Dros. Inf. Serv. 100: 185-189.
- 460 **Salles, L. A. B. 1992.** Metodologia de criação de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830)
461 (Diptera: Tephritidae) em dieta artificial em laboratório. An. Soc. Entomol. Bras 21: 479-
462 486.
- 463 **Van Timmeren, S., and R. Isaacs. 2013.** Control of spotted wing drosophila, *Drosophila*
464 *suzukii*, by specific insecticides and by conventional and organic crop protection programs.
465 Crop. Prot. 54: 126–133.
- 466 **Veberic, R., C. Mateja, and F. Stampar. 2008.** Phenolic acids and flavonoids of fig fruit
467 (*Ficus carica* L.) in the northern Mediterranean region. Food Chemistry 106: 153-157.
- 468 **Vilela, C. R. 1999.** Is *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) currently
469 colonizing the Neotropical region? Dros. Inf. Serv. 82: 37-39.
- 470
- 471
- 472

473 **Table 1.** Treatments evaluated for the management of *Zaprionus indianus*.

Treatments	Description	Concentration tested ^a	Origin/ manufacturer
<i>EES Annona mucosa</i>	Aqueous emulsion of ethanolic seed extract of <i>Annona mucosa</i> (pre-commercial)	2000 ml L ^{-1*}	--
<i>EES Annona muricata</i>	Aqueous emulsion of ethanolic seed extract of <i>Annona muricata</i> (pre-commercial)	2000 ml L ^{-1*}	--
<i>EES Annona sylvatica</i>	Aqueous emulsion of ethanolic seed extract of <i>Annona sylvatica</i> (pre-commercial)	2000 ml L ^{-1*}	--
Azamax [®] 12 EC	Limonoid-based biopesticide [azadirachtin (6,220.15 mg L ⁻¹) + 3-tigloylazadirachtol (2,596 mg L ⁻¹)] extracted and purified from <i>Azadirachta indica</i> L seeds ^a	3.0 ml L ⁻¹ (recommended by the manufacturer)	UPL Brasil (Campinas, SP, Brazil)
Delegate 250WG [™]	Espinetoram ^a	75 g of a.i. 100 L ⁻¹ (recommended by the manufacturer)	Dow AgroSciences Industrial Ltda, São Paulo, SP, Brazil

474 ^aConcentration: g or mL of commercial product (pc) per 100 L of water.

475 *The concentration of 2000 ml L⁻¹ was used for each extract formulated according to the type of bioassay (oviposition deterrence effect, ovicidal
476 action or field effectiveness).

477

478

479

480

481

Table 2. Estimate of the LC₅₀ and LC₉₀ (in mg L⁻¹) and the confidence interval for a formulated ethanolic extract from *Annona mucosa* seeds and a spinosyn-based synthetic insecticide (espinetoram) in *Zaprionus indianus* adults with different exposure times in an ingestion bioassay.

Exposure time (h)	Treatments	<i>n</i>	<i>Slope</i> ± SE	LC ₅₀ (CI 95%) ^a	LC ₉₀ (CI 95%) ^b	χ ^{2c}	d.f. ^d
12	<i>A. mucosa</i>	560	2.61 ± 0.51	1206.0 (996.4 – 2278.4)	3479.8 (1884.6 – 4434.6)	17.10	4
	Espinetoram	700	3.56 ± 0.40	53.26 (30.76 – 65.61)	150.50 (143.07 – 161.73)	3.57	5
24	<i>A. mucosa</i>	560	2.77 ± 0.31	932.3 (718.32 – 1,126.4)	2528 (2160.4 – 3601.5)	7.23	4
	Espinetoram	640	2.64 ± 0.28	46.99 (39.09 – 54.24)	133.90 (113.68 – 167.49)	3.18	5
48	<i>A. mucosa</i>	560	1.36 ± 0.36	539.39 (147.8 – 2085.1)	3092.3 (1996.4 – 4361.6)	11.54	5
	Espinetoram	640	2.18 ± 0.21	29.96 (24.04 – 35.58)	106.45 (89.92 – 131.93)	6.63	5
72	<i>A. mucosa</i>	480	2.49 ± 0.25	278.6 (270.79 – 285.75)	2026.8 (1856.5 – 2338.07)	3.97	4
	Espinetoram	640	2.19 ± 0.19	21.37 (16.92 – 25.63)	75.46 (64.60 – 90.92)	7.85	5
96	<i>A. mucosa</i>	480	2.33 ± 0.22	523.14 (431.00 – 616.42)	1708.3 (1405.0 – 2207.0)	4.96	4
	Espinetoram	640	2.75 ± 0.21	18.37 (16.95 – 21.32)	75.46 (64.60 – 90.92)	7.15	5
120	<i>A. mucosa</i>	480	2.33 ± 0.23	454.45 (365.44 – 542.56)	1553.4 (1273.0 – 2016.5)	3.26	4
	Espinetoram	480	1.82 ± 0.22	15.12 (11.13 – 18.93)	68.67 (53.31 – 98.92)	2.81	4

^{a,b}LC₅₀ and LC₉₀: Insecticide concentrations (mg L⁻¹) required to kill 50% or 90% of *Z. indianus* adults, respectively (CI: confidence interval at 95% error probability); ^cχ²: Pearson's chi-square value; ^dd.f.: degrees of freedom

491 **Table 3.** Estimate of the LC₅₀ and LC₉₀ (in mg L⁻¹) as well as the confidence interval of a formulated ethanolic extract from *Annona mucosa*
 492 seeds and a spinosyn-based synthetic insecticide (espinetoram) on *Zaprionus indianus* adults with different exposure times in a topical
 493 application bioassay.

Exposure time (hours)	Treatments	<i>n</i>	<i>Slope</i> ± SE	LC ₅₀ (CI 95%) ^a	LC ₉₀ (CI 95%) ^b	χ ^{2c}	d.f. ^d
12	<i>A. mucosa</i>	700	3.56 ± 0.40	2326.4 (2076.0 – 2561.4)	5050.4 (4393.7 – 6173.5)	3.57	4
	Espinetoram	567	2.72 ± 0.21	25.16 (21.54 – 28.43)	69.31 (62.93 – 77.68)	6.51	7
24	<i>A. mucosa</i>	700	3.46 ± 0.32	1654.0 (1443.4 – 1840.5)	3672.6 (3305.8 – 4196.1)	6.16	4
	Espinetoram	525	2.76 ± 0.23	21.00 (17.59 – 24.09)	57.00 (51.43 – 64.12)	8.17	6
48	<i>A. mucosa</i>	700	2.36 ± 0.42	1083.6 (446.65 – 1552.8)	3480.2 (2593.5 – 6048.1)	9.96	4
	Espinetoram	638	2.67 ± 0.21	18.90 (15.19 – 22.15)	53.15 (48.18 – 59.41)	7.57	7
72	<i>A. mucosa</i>	600	2.05 ± 0.40	688.57 (554.69 – 818.08)	2642.0 (2209.8 – 3318.4)	1.83	4
	Espinetoram	641	2.83 ± 0.23	17.83 (14.36 – 20.82)	47.29 (42.24 – 54.27)	6.15	6
96	<i>A. mucosa</i>	600	1.77 ± 0.50	516.34 (398.14 – 633.20)	2451.5 (1897.5 – 3524.8)	1.37	4
	Espinetoram	575	2.79 ± 0.48	16.54 (13.11 – 19.50)	44.48 (40.12 – 50.03)	5.25	6
120	<i>A. mucosa</i>	600	2.09 ± 0.19	389.13 (298.96 – 476.33)	1457.7 (1,236.4 – 1767.1)	5.62	4
	Espinetoram	472	4.06 ± 1.14	16.06 (11.86 – 19.42)	45.78 (39.87 – 55.53)	7.03	5

494 ^{a,b}LC₅₀ and LC₉₀: Insecticide concentrations (mg L⁻¹) required to kill 50% or 90% of *Z. indianus* adults, respectively (CI: confidence interval at
 495 95% error probability); ^cχ²: Pearson's chi-square value; ^dd.f.: degrees of freedom

496
 497
 498

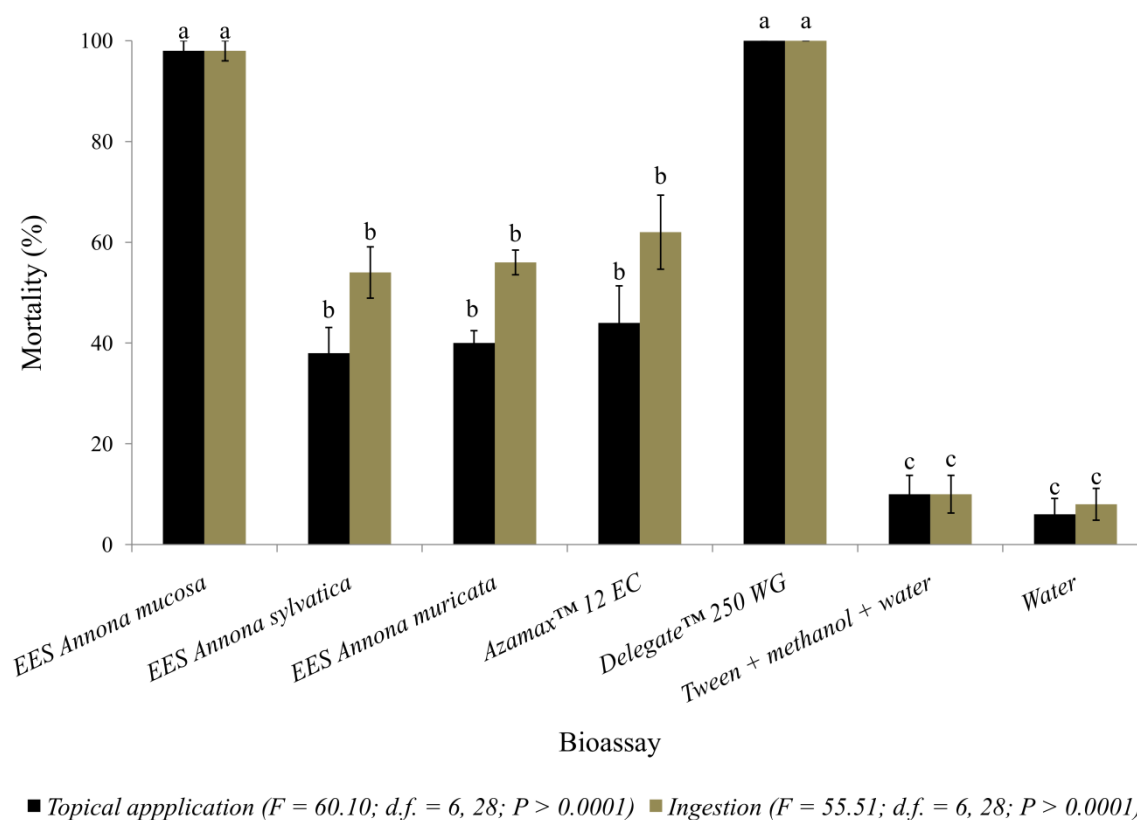


Figure 1. Percentage mortality ($\pm$ SE) of *Zaprionus indianus* at 120 h after exposure to different treatments in laboratory bioassays.

Means followed by distinct letters in columns (with the same exposure method) indicate significant differences between treatments (GLM with quasi-binomial distribution followed by Tukey's post hoc test; $P < 0.05$)

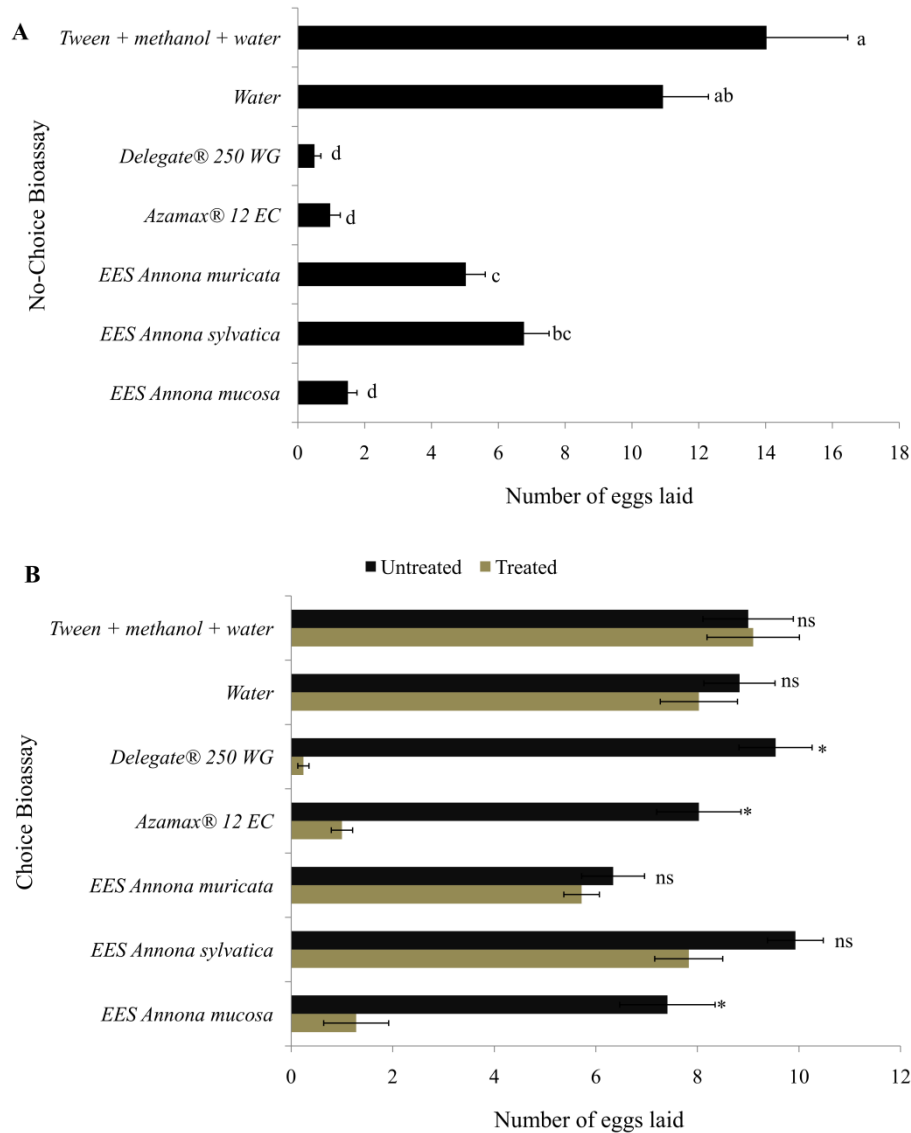


Figure 2. Average number of eggs laid by *Zaprionus indianus* females in artificial fruit with different treatments in a laboratory bioassay: (A) Sexually mature *Z. indianus* females were confined in cages containing one artificial fruit treated in a no-choice bioassay (no-choice bioassay); (B) Sexually mature *Z. indianus* females were confined in cages containing one treated artificial fruit and one untreated fruit (choice bioassay).

Means followed by the same letters in the columns did not differ significantly (GLM with quasipoisson distribution followed by Tukey's post hoc test; $P < 0.05$); Asterisks indicate significant differences between treatments according to Student's t-test ($P < 0.05$) and ns indicates not significant according to Student's t-test ($P < 0.05$).

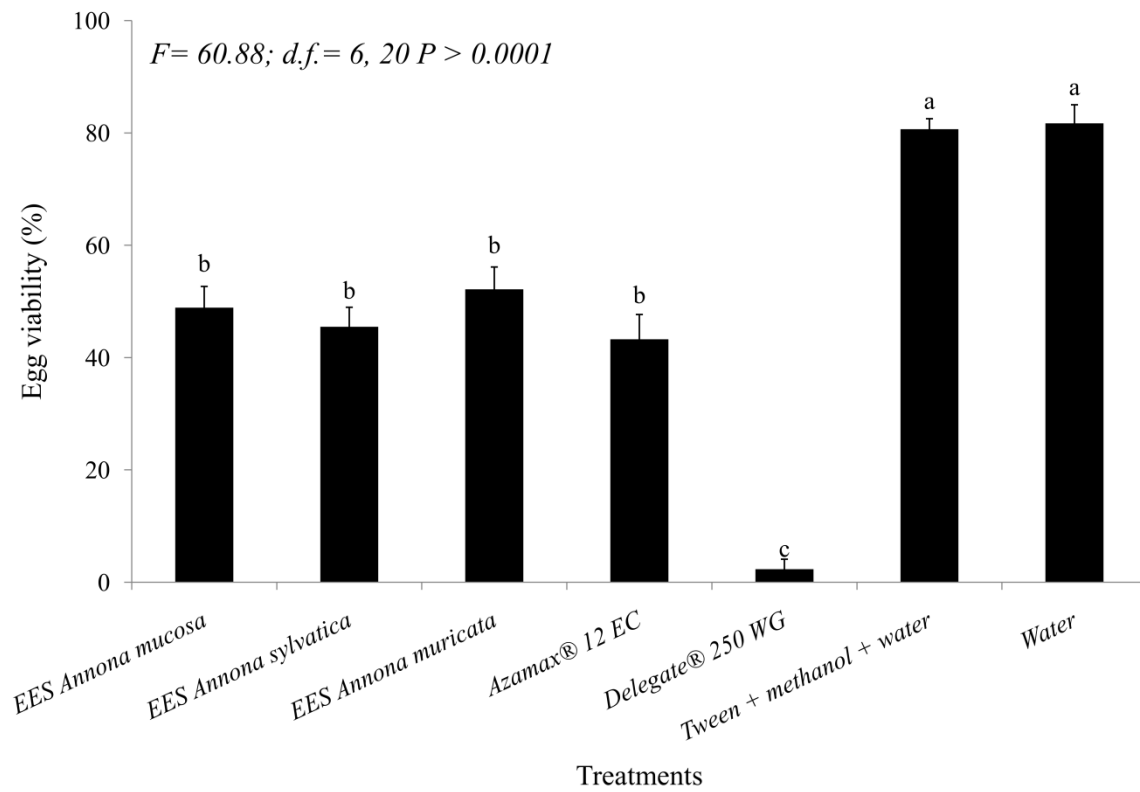


Figure 3. Egg viability of *Zaprionus indianus* in a dipping bioassay with artificial fruit in the laboratory

*Bars ($\pm$ SE) with the same letter are not significantly different (GLM with quasi-binomial distribution followed by Tukey's post hoc test; $P < 0.05$).

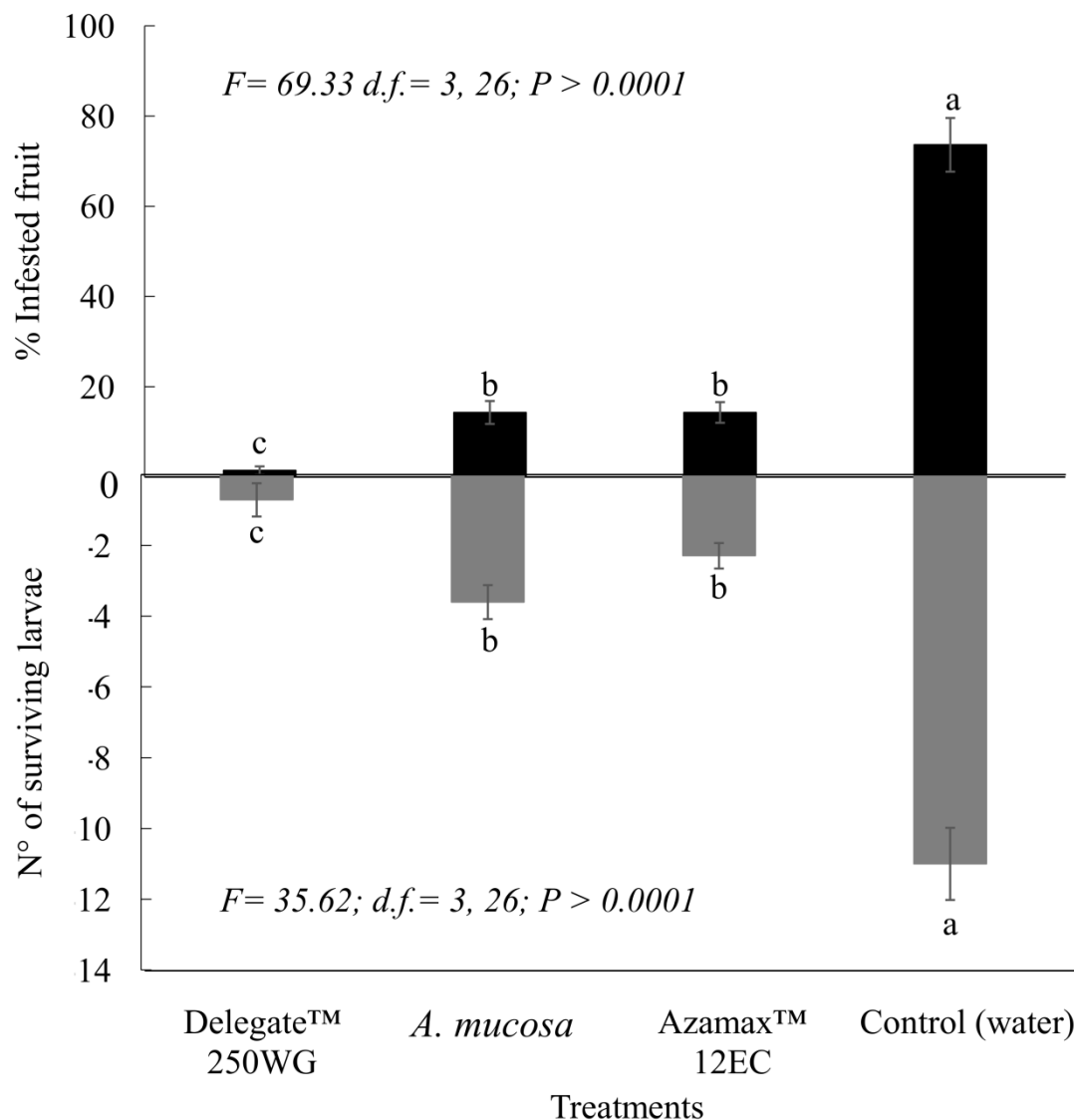


Figure 4. Means ($\pm$ SE) of percentage infested fruits and number of larvae per fruit after applying an aqueous emulsion of ethanolic extract from *Annona mucosa* seeds, a commercial limonoid-based bioinsecticide (Azamax™ 1.2 EC) and the spinosyn-based synthetic insecticide (Delegate™ 250 WG) in a test conducted in a commercial fig orchard.

Means followed by the same letters in the columns did not differ significantly (GLM with quasi-binomial distribution followed by Tukey's post hoc test; $P < 0.05$).

Artigo 2 - Neotropical Entomology

(Versão em Português).

**Toxicidade de isolados bacterianos sobre adultos de *Zaprionus indianus*
e aos parasitoides *Trichopria anastrephae* e *Pachycrepoideus
vindemmiae***

F C S GEISLER¹, N DE S ACUNHA², L N MARTINS³, D DA C OLIVEIRA⁴, I G DE
OLIVEIRA³, F P L LEITE², F R M GARCIA^{1,3}, D BERNARDI^{1,3*},

Artigo 2 -

Geisler et al.: Toxicidade de
isolados bacterianos a *Z. indianus*
e aos parasitoides *T. anastrephae*
e *P. vindemmia*

Daniel Bernardi
Universidade Federal de Pelotas
Dept. de Fitossanidade – Entomologia
96010900, Capão do Leão-RS, Brazil
E-mail: dbernardi2004@yahoo.com.br

Neotropical Entomology
Pest Management

Toxicidade de isolados bacterianos sobre adultos de *Zaprionus indianus* e aos
parasitoides *Trichopria anastrephae* e *Pachycrepoideus vindemmia*

F C S GEISLER¹, N DE S ACUNHA², L N MARTINS³, D DA C OLIVEIRA⁴, I G DE
OLIVEIRA³, F P L LEITE², F R M GARCIA^{1,3}, D BERNARDI^{1,3*},

¹Programa de pós graduação em Entomologia, Universidade Federal de Pelotas,
Pelotas, RS 96010900, Brazil

²Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec. Universidade Federal de Pelotas
(UFPEL), 96160-000 Campus Capão do Leão, RS, Brasil.

³Programa de pós graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas,
Pelotas, RS 96010900, Brazil.

⁴Programa de pós graduação em Biologia Animal, Universidade Federal de Pelotas,
Pelotas, RS 96010900, Brazil.

*corresponding author

29

30 **Resumo** - *Bacillus thuringiensis* Berliner tem demonstrado potencial de uso no manejo
31 de insetos-pragas. Objetivou-se avaliar a toxicidade dos isolados bacterianos (*Bt*) *B.*
32 *thuringiensis* var. *oswaldo cruzi* (*Bto*), *B. thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*), *B.*
33 *thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) e *B. circulans* (*Bc*) em mistura com os atrativos
34 alimentares suco de uva 50%, melaço de cana-de-açúcar 7% e proteína hidrolisada 7%
35 sobre adultos de *Zaprionus indianus* (Gupta, 1970), principal praga de frutos de figo
36 (*Ficus carica*) no Brasil, assim como, a toxicidade aos parasitoides *Trichopria*
37 *anastrephae* Lima, 1940 e *Pachycrepoideus vindemmiae* (Rondani, 1875) em bioensaio
38 de ingestão. Adultos de *Z. indianus* apresentaram elevada suscetibilidade aos isolados
39 de *Bt*, contudo, somente o isolado *Bto* ocasionou mortalidade de 100% dos adultos, 72
40 horas após a exposição dos tratamentos. Mediante a utilização das concentrações letais
41 ($CL_{S_{90}}$) do isolado *Bto*, determinadas nas curvas de concentração-resposta com os
42 atrativos, foi verificado uma redução significativa (40 a 50%) na fecundidade total das
43 fêmeas quando alimentadas nas formulações atrativo alimentar + *Bto*. Em adição, ovos
44 provenientes de fêmeas expostas nessas formulações apresentaram redução significativa
45 (35 a 57%) na viabilidade embrionária. Os atrativos alimentares + *Bto* não apresentaram
46 toxicidade sobre adultos de *T. anastrephae* e *P. vindemmiae* (mortalidade < 20%). Com
47 base nesses resultados, os isolados bacterianos *Bti*, *Btk*, *Bc* e *Bto*, são considerados
48 promissores para a formulação de iscas tóxicas para o manejo de *Z. indianus*, com
49 destaque ao isolado *Bto*, o qual apresentou maior toxicidade no mesmo período de
50 avaliação. E causaram baixa toxicidade aos inimigos naturais *T. anastrephae* e *P.*
51 *vindemmiae*.

52 **Keywords:** mosca do figo, inimigos naturais, *Bacillus thuringiensis*, parasitoide pupal,
53 controle biológico, drosophilidae.

54

55 **Introdução**

56 *Bacillus thuringiensis* (Berliner) é uma bactéria do solo que produz proteínas
57 cristalogênicas (Cry) e citolíticas (Cyt), que possui tipos de toxinas, específicas contra
58 várias espécies de insetos-pragas. (Kongswan *et al* 2005, Frankenhuyzen 2009,). As
59 proteínas cristalinas presente nessas bactérias podem apresentar atividade
60 entomopatogênica e especificidade para várias ordens de insetos (Lepidoptera; Diptera;
61 Coleoptera; Hymenoptera e Orthoptera) (Cossentine *et al* 2016). A bactéria é um Gram-
62 positivo, aeróbico, que quando insetos susceptíveis ingerem um corpo de inclusão, são
63 liberadas as protoxinas Cry, que são digeridas por proteases intestinais específicas que,
64 quando ativadas, ligam-se a receptores presentes na membrana peritrófica, ocasionando
65 a formação de poros, lise celular e a morte dos insetos (Federici *et al* 2006). A espécie
66 não cristalogênica *Bacillus circulans*, evidencia que os seus esporos precisam ser
67 ingeridos por larvas para a sua atividade larvívora. Observou-se que a toxicidade de *B.*
68 *circulans*, em larvas de mosquitos foi associada a esporos e não com exotoxina
69 (Darriet *et al.* 2002)

70 Estudos demonstraram que várias espécies de dípteros são suscetíveis a *B.*
71 *thuringiensis*, como *Anastrepha ludens* (Loew) (Toledo *et al* 1999, Buentello-Wong *et*
72 *al* 2015), *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Alberola *et al* 1999), *Drosophila melanogaster*
73 (Meig.) (Obeidat 2008), *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Aboussaid *et al* 2010),
74 *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) (Shishir *et al* 2015),
75 *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Cossentine *et al* 2016) e *Anastrepha fraterculus*
76 (Wiedemann, 1830) (Martins *et al* 2018). O potencial toxicológico sobre espécies de
77 moscas pode ser uma alternativa viável para o manejo da mosca-do-figo, *Zaprionus*
78 *indianus* (Gupta, 1970) (Diptera: Drosophilidae), considerado o principal inseto-praga

de frutos de figo (*Ficus carica*) no Brasil (Vilela *et al* 2015) Uruguai (Goñi *et al* 2001), América Central (Van Der Linde *et al* 2006), Europa (Commar *et al* 2012) e América do Norte (Van Der Linde 2013; Joshi *et al* 2014; Lasa *et al* 2015). Em avaliação, recentemente, foi verificado o potencial da praga em ocasionar danos em frutos de morango inteiro (*Fragaria* × *ananassa*) no sul do Brasil (Bernardi *et al* 2017).

Embora, vários estudos demonstrarem atividade biológica sobre a fase larval de espécies de dípteros (Aboussaid *et al* 2010, Shishir *et al* 2015, Cossentine *et al* 2016, Martins *et al* 2018), pesquisas tem demonstrado que toxinas de *B. thuringiensis* que apresentam toxicidade ou atividade biológica sobre a fase adulta são mais consistentes, visto que as larvas das espécies de moscas ficam embaixo do tegumento dos frutos (Shishir *et al* 2015, Cossentine *et al* 2016). Porém, a ingestão de *B. thuringiensis* por fêmeas podem afetar negativamente a taxa de oviposição, fato verificado com a espécie *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae), o que é benéfico para suprimir a densidade populacional de *C. quinquefasciatus* (Zahiri *et al* 2005).

Devido a baixa disponibilidade de ferramentas de manejo de *Z. indianus*, formulação de inseticidas ou de iscas tóxicas com a presença de *B. thuringiensis* que visam o manejo de adultos podem desempenhar um papel importante nos programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Kumar *et al* 2009), visto que, na cultura da figueira os principais danos são ocasionados pelas fêmeas através da oviposição na região ostiolar dos frutos, que após a eclosão das larvas torna-os impróprios para o consumo (Stein *et al* 2003).

Sendo assim, o objetivo do estudo foi avaliar a toxicidade letal de isolados bacterianos *Bti*, *Btk*, *Bto* e *Bc* e em mistura aos atrativos alimentares suco de uva 50%, melaço de cana de açúcar 7% e proteína hidrolisada 7% sobre adultos de *Z. indianus* em bioensaio de ingestão. Adicionalmente, foi verificado os efeitos subletais dos isolados

mais promissores no comportamento de oviposição e na viabilidade embrionária de ovos de *Z. indianus* e a toxicidade sobre os parasitoides pupais *Trichopria anastrephae* Lima (Hymenoptera: Diapriidae) e *Pachycrepoideus vindemmiae* (Rondani, 1875) (Hymenoptera: Pteromalidae). Espécies encontradas parasitando as pupas de *D. sukuzii* e *Z. indianus* no Brasil (Wollmann *et al* 2016, Andreazza *et al* 2017b).

Materiais e Métodos

Multiplicação e manutenção dos isolados de Bacillus thuringiensis

Os isolados de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk), *B. thuringiensis* var. *oswaldo cruzi* (Bto) e *B. thuringiensis* var. *circulans* (Bc) foram provenientes da Coleção de Microrganismos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da UFPel, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. A recuperação e a multiplicação de cada isolado bacteriano foi em meio de cultura do tipo BHI (Brain Heart Infusion - Acumedia) e incubados a 28 °C e subcultivados em balões de vidro com capacidade volumétrica de 1000 mL, contendo 200 mL de meio plaqueado em ágar NYSM e, posteriormente, incubados em agitador orbital Shaker a 28 °C a 150 rpm de velocidade por um período de 72 h. A viabilidade e esporulação do conteúdo bacteriano foi verificada por meio de microscopia ótica (Microscope at 100 x magnification - Olympus, Cx 21 model). Posteriormente, após aproximadamente 90% do meio de cultura apresentar esporulação foram aquecidas em banho maria a temperatura de 80 °C durante 15 minutos para eliminar as formas vegetativas. Para todos os meios de culturas contendo os diferentes isolados bacterianos, foi realizado a técnica de coloração de Gram (Gram 1884) e a concentração de esporos foi determinada por Unidades Formadoras de Colonia (UFC)/mL em ágar BHI. Feito isso, as culturas

foram armazenadas sob refrigeração a uma temperatura média de 4°C, até a utilização nos bioensaios.

Criação e manutenção de Z. indianus, T. anastrephae e P. vindemmiae e em laboratório
Z. indianus (15ª geração), *T. anastrephae* e *P. vindemmiae* (10ª geração) utilizados em todos os bioensaios foram em salas climatizadas a 25 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12 horas. As moscas foram criadas e alimentadas com dieta artificial seguindo a metodologia descrita por Schlesener *et al* (2017). Os parasitóides de *T. anastrephae* e *P. vindemmiae* foram criados em pupas de *D. suzukii* e alimentados com mel/água (80%, v/v). Antes de cada bioensaio, adultos de *Z. indianus* com oito dias de idade e os parasitóides com 24 horas de idade das espécies foram privados da alimentação por 8 horas, alimentados somente com água.

Toxicidade de isolados bacterianos sobre adultos de Z. indianus

Os tratamentos foram constituídos por *B. thuringiensis* isolados *Bti*, *Btk*, *Bto* e *Bc* em mistura com os atrativos alimentares suco de uva 50%, melaço de cana-de-açúcar 7% e proteína hidrolisada 7%. Antes de proceder as misturas e as confecções das formulações (*B. thuringiensis* + atrativo alimentar), foi realizado o ajuste dos valores dos pHs para cada atrativo alimentar (pH ajustado para 7,0) com o auxílio de ácidos e bases (HCl 1M – NaOH 1M). Feito isso, adultos com 8 dias de idade provenientes da criação de manutenção, foram acondicionados em gaiolas plásticas confeccionadas com recipientes plásticos transparentes (100 mL) (2 casais por gaiolas) colocadas invertidas sobre placas de acrílico (12 cm de diâmetro). Posteriormente, os tratamentos (formulações) (atrativo alimentar + isolado *Bti*, *Btk*, *Bto* ou *Bc*) foram fornecidos via capilaridade mediante auxílio de tubos tipo *eppendorf* estéril perfurado na sua

extremidade e acoplando na parte superior das gaiolas de modo que os insetos tivessem a possibilidade de alimentar-se dos atrativos sem haver o contato com os tratamentos. Como controle negativo (testemunha) os insetos foram alimentados somente com o atrativo alimentar (suco de uva 50%, melaço de cana-de-açúcar 7% ou proteína hidrolisada 7%), 24h respectivamente, para cada formulação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 20 repetições por tratamento, com cada repetição composta por dois casais, totalizando 80 insetos por tratamento. A mortalidade dos insetos foram registradas as 24, 48, 72, 96 120, 144 e 168 Horas Após a Exposição dos tratamentos (HAE). Foram considerados mortos, os insetos que não apresentam reação ao toque de um pincel de ponta fina. A mortalidade de cada tratamento (atrativo alimentar + isolado *Bti*, *Btk*, *Bto* ou *Bc*) foram corrigidos com o respectivo atrativo alimentar (controle negativo) de cada formulação, com auxílio da fórmula de Hederson *et al* (1955).

Determinação da Concentração Letal (CL) e Tempo letal médio (TL) sobre adultos de Z. indianus

Para a estimativa das concentrações Letais (CL) (CL_{50} e CL_{90}) necessária para matar 50% e 90% das moscas, foram testadas (seis concentrações) variando de $[1 \times 10^3 \text{ UFC.mL}^{-1}]$ a $[1 \times 10^{13} \text{ UFC.mL}^{-1}]$ de cada isolado *Bti*, *Btk*, *Bto* e *Bc*, as quais foram misturadas nos atrativos alimentares suco de uva 50%, melaço de cana-de-açúcar 7% e proteína hidrolisada 7%. Os procedimentos e critérios de exposição foram idênticos nos bioensaios de toxicidade, no entanto, o tempo de avaliação utilizado para as estimativas dos valores de CLs foi de 168 HAE dos tratamentos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições de 20 moscas ($n = 80$) para cada concentração testada ($n = 480$). Para a determinação dos valores de TL_{50} (tempo

necessário para matar 50% da população testada) foram utilizados os dados de 12, 24, 48, 72, 96 120, 144 e 168 HAE dos tratamentos.

Efeito subletal de isolados bacterianos sobre Z. indianus

Foram utilizados os valores de CL₉₀ do isolado *Bto*, considerado o isolado bacteriano com maior atividade tóxica sobre adultos de *Z. indianus* até 168 HAE dos tratamentos, determinadas nos bioensaios de curva de concentração resposta. Adultos de *Z. indianus* com 8 dias, privados da alimentação por 8 horas, foram acondicionados em gaiolas plásticas (um casal por gaiola) conforme descrito anteriormente. Posteriormente, os insetos foram alimentados com formulações (tratamentos) compostas pelos atrativos alimentares suco de uva 50%, melaço de cana-de-açúcar 7% ou proteína hidrolisada 7% em mistura com o isolado *Bto* (CL₉₀) no período de 24 horas. Como controle negativo foram utilizados atrativos alimentares sem a presença de *Bto*. Os tratamentos foram fornecidos via capilaridade com auxílio de tubos tipo *ependorf* estéril, conforme descrito anteriormente. Decorrido esse tempo, os tratamentos foram removidas e os insetos foram alimentados com dieta artificial composta por açúcar cristal, levedura de cerveja (Bionis® BIONIS® YE MF e NS) e germe de trigo na proporção de 3:1:1, fornecida em placas de acrílico (3 cm de diâmetro) conforme descrito por Nunes *et al* (2013). Como substrato de oviposição, frutos artificiais, preparados a partir de ágar bacteriológico (Dinâmica) (19 g), gelatina de framboesa (Neilar ®) (10 g), metil parabeno (Nipagin®; 8 mL; 0,8 g dissolvido em 8 mL de álcool etílico absoluto a 99,9%) e água destilada (850 mL), conforme proposto por Schlesener *et al* (2017), foram colocados no interior da gaiola e trocados diariamente até a morte da fêmea. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 20 casais por tratamento (concentração), sendo cada repetição composta por 1 casal de *Z. indianus*. Os

parâmetros biológicos avaliados foram: fecundidade total (número total de ovos ovipositados pelas fêmeas de *Z. indianus* ao longo da vida) e viabilidade (%) embrionária. A fecundidade total foi determinada mediante a contagem do número de ovos colocados nos frutos artificiais por dia com auxílio de microscópio estereoscópico (40 ×). Para cálculo da viabilidade embrionária (%), ovos obtidos da segunda postura de cada casal foram contados e armazenados em placas de Petri (8 cm de diâmetro) sobre uma mistura de ágar-água a 2% e fechados na parte superior com a respectiva tampa e acondicionados em sala climatizada (Temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $70 \pm 10\%$ e fotofase 12h). Decorrido três dias, período necessário para ocorrer a eclosão, as larvas foram contabilizadas com auxílio microscópio estereoscópico (40 ×).

Toxicidade dos tratamentos ativos em T. anastrephae e P. vindemmiae

Para avaliar a seletividade dos tratamentos mais ativos sobre os parasitóides *T. anastrephae* e *P. vindemmiae*, os insetos foram submetidos à bioensaio de ingestão conforme descrito anteriormente por um período de 24 horas. Os tratamentos foram compostos pelas formulações dos atrativos alimentares suco de uva 50%, melaço de cana-de-açúcar 7% e proteína hidrolisada 7% + isolado *Bto* (valores de CL_{90} determinadas no bioensaio de curvas de concentração resposta). Como controle negativo foi utilizado os respectivos atrativos alimentares sem a presença de *Bto*. Adultos de *T. anastrephae* e *P. vindemmiae* com até 24 horas de idade, provenientes da criação de manutenção e privados de alimentação por 8 horas, foram acondicionados no interior de gaiolas plásticas (100 mL) (10 casais por gaiola) conforme descrito acima. Após 24 horas de alimentação, os tratamentos foram removidos e os insetos alimentados com mel puro. A mortalidade dos insetos foi avaliada até 168 HAE dos tratamentos, utilizando os mesmos critérios de avaliação usados para adultos de *Z. indianus*. O

delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 repetições, sendo cada repetição composta por 10 casais de *T. anastrephae* ou *P. vindemmiae* ($n = 60$).

Dados analisados

Modelos lineares generalizados (glm) de distribuições foram utilizados para as análises das variáveis estudadas (Nelder *et al* 1972). A verificação do ajuste de qualidade foi realizada através das probabilidades do gráfico semi-regular com envelope de simulação (Hinde *et al* 1998). Quando foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos, comparações múltiplas (teste de Tukey, $P < 0,05$) foram realizadas utilizando a função glht Multicomp, com ajuste dos valores de p. Nos bioensaios para avaliar o efeito subletal sobre adultos de *Z. indianus* (fecundidade total e viabilidade embrionária) os dados foram submetidos ao teste t a 5% de significância. Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico "R" versão 2.15.1 (R Development Core Team 2012).

Um modelo binomial com uma função de ligação log-log complementar (modelo gompit) foi usado para estimar as concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}) usando o Procedimento de Probit no pacote de software estatístico SAS versão 9.2 (SAS Institute 2011). Finalmente, o tempo letal médio (TL_{50}) foi estimado pelo método proposto por Throne *et al* (1995).

Resultados

Adultos de *Z. indianus* apresentaram alta suscetibilidade aos isolados *Bti*, *Btk*, *Bc* e *Bto* em bioensaio de ingestão quando em misturas com os atrativos alimentares suco de uva 50%, melaço de cana-açúcar 7% e proteína hidrolisada 7% (Figura 1 A, B e C).

Contudo, para todos os tratamentos (atrativos alimentares + isolados *Bti*, *Btk*, *Bc* ou *Bto*) houve um acréscimo significativo ($P > 0,05$) na mortalidade dos insetos ao longo do tempo. Entretanto, apenas o isolado *Bto* quando em mistura com ambos os atrativos estudados (suco de uva 50%, melão de cana-de-açúcar 7% e proteína hidrolisada 7%) proporcionou 100% da mortalidade dos adultos de *Z. indianus*, as 168 horas após a exposição aos tratamentos (Figura 1A, B e C), sendo superior estatisticamente ($P > 0,05$) dos isolados *Bti*, *Btk* e *Bc* que proporcionaram mortalidade entre 70 e 80% no mesmo período de avaliação quando em mistura com os mesmos atrativos alimentares (Figura 1A, B e C).

Com base nas estimativas das curvas concentração-resposta, a toxicidade dos isolados bacterianos *Bti*, *Btk*, *Bc* e *Bto* proporcionaram valores de CL_{50} similares em $UFC.ml^{-1}$ quando comparados isoladamente dentro de cada atrativo alimentar (suco de uva 50%, melão de cana-de-açúcar 7% e proteína hidrolisada 7%) as 168 HAE dos tratamentos (Tabela 1). Para os valores de CL_{90} , foi verificado que todos os isolados bacterianos testados apresentaram acréscimo nas $UFC.ml^{-1}$ quando em mistura com os atrativos alimentares (Tabela 1). Em relação ao tempo letal médio (TL_{50}) e com base na sobreposição dos intervalos de confiança (IC), os isolados *Bti*, *Btk*, *Bc* e *Bto* em formulação com os atrativos suco de uva 50%, melão de cana-de-açúcar 7% e proteína hidrolisada 7% não diferiram entre si, sendo os valores de TL variando de 32,63 a 73,31 horas (Tabela 2).

Ao avaliar o efeito subletal utilizando valores de CL_{90} (8×10^8 , 4×10^{11} e 8×10^8 $UFC ml^{-1}$), determinadas no bioensaio de curva de concentração resposta, em mistura com os atrativos suco de uva 50%, melão de cana-de-açúcar 7% e proteína hidrolisada 7%, respectivamente, foi verificado que ocorreu uma redução significativa de 47% ($F = 3,31$; $t \geq 0,05$), 51% ($F = 6,54$; $t \geq 0,05$) e 40% ($F = 7,11$; $t \geq 0,05$) no número total de

278 ovos por fêmeas de *Z. indianus* em frutos artificiais ao longo do período de oviposição
279 quando comparado com fêmeas expostas a alimentação nos respectivos atrativos
280 alimentares sem a presença de *Bto* (Figura 2A). Da mesma forma, a viabilidade
281 embrionária foi significativamente menor (35% - $F = 3,31$; $t \geq 0,05$; 56% - $F = 6,54$; $t \geq$
282 $0,05$ e 57% - $F = 7,11$; $t \geq 0,05$) em ovos provenientes de fêmeas de *Z. indianus*
283 expostas a alimentação nas formulações contendo suco de uva 50%, melaço de cana-de-
284 açúcar 7% e proteína hidrolisada 7% + *Bto*, respectivamente, quando comparado com
285 fêmeas alimentadas somente com o respectivo atrativo alimentar (Figura 2B).

286 Em relação ao efeito sobre adultos de *T. anastrephae* e *P. vindemmiae*, em bioensaio
287 de ingestão, utilizando valores de CL_{90} do isolado *Bto* em misturas com suco de uva
288 50%, melaço de cana-de-açúcar e proteína hidrolisada 7%, foi verificado que ambas as
289 misturas proporcionaram mortalidade inferior a 20% até 168 HAE, sendo similares
290 estatisticamente ($t = 0.05$) aos tratamentos contendo somente os atrativos alimentares
291 (Figura 3).

292 **Discussão**

294 Nosso objetivo foi determinar se *B. thuringiensis* poderia causar mortalidade de
295 adultos de *Z. indianus* quando em mistura com diferentes atrativos alimentares em
296 bioensaio de ingestão. Frente os resultados, foi verificado que a mortalidade dos insetos
297 expostos a alimentação por 24 horas nos isolados *Bti*, *Btk*, *Bc* e *Bto* foi dependente da
298 concentração e do tempo de avaliação, contudo, apresentando uma mortalidade
299 expressiva a partir das 72 HAE (Figura 1).

300 Os isolados bacterianos utilizados no presente estudo, que resultaram na maior
301 mortalidade de adultos de *Z. indianus*, também apresentaram elevada toxicidade sobre
302 adultos de *A. fraterculus* em mistura com os atrativos BioAnastrepha™ 3% e

CeraTrap™ 1,5% (Martins *et al* 2018). Os demais isolados *Bti*, *Bc* e *Btk* apresentaram uma mortalidade de adultos (mortalidade de aproximadamente 80%) considerada satisfatória, mesmo sendo inferior significativamente quando comparado com o isolado mais ativo (*Bto*). Estas diferenças dentro dos diferentes isolados de *Bt* quando em misturas com os mesmos atrativos alimentares (suco de uva 50%, melaço de cana-de-açúcar 7% e proteína hidrolisada 7%) podem estar relacionadas à variabilidade genética presente nos isolados de *B. thuringiensis*, uma vez com os isolados de *Bt* podem abrigar diferentes toxinas Cry que podem ser ativas sobre o alvo de controle, conforme verificado no isolado de *Btk* (toxinas cry1Aa, Ab, Ac, cry2Aa e 2Ab) (Crickmore *et al* 2015). Frente a isso, estudos moleculares devem ser realizados para identificar quais toxinas são expressas pelos isolados com base nos modelos propostos por Sauka *et al* (2014).

Além de proporcionar elevada toxicidade sobre adultos de *Z. indianus*, o isolado *Bto*, considerado em nosso estudo o mais ativo em um menor período de tempo, também afetou negativamente a fecundidade das fêmeas e a viabilidade embrionária de ovos ovipositados por fêmeas que ingeriram as misturas contendo atrativo alimentar + *Bto*, utilizando os valores de CL₉₀ (8×10^8 , 4×10^{11} e 8×10^8 UFC.ml⁻¹, suco de uva 50%, melaço de cana-de-açúcar 7% e proteína hidrolisada 7%, respectivamente). Dentro de um programa de MIP a redução da fecundidade é considerada benéfica devido ao efeito negativo sobre a dinâmica populacional dos insetos nas gerações futuras (Kogan, 1998, Zahiri *et al* 2005).

Além disso, produtos que diminuem a oviposição, podem reduzir a procura das fêmeas pela oviposição e desta maneira reduzir a incidência de rupturas dos tecidos dos frutos. Este fato pode reduzir a infestação de patógenos (fungos e bactérias) que aumentam os processos de deterioração dos frutos como observado em morango

(Bernardi *et al* 2017). Apesar de poucos estudos avaliarem o efeito subletal da ingestão de *Bt* por adultos de espécies de dípteros *Musca domestica* (Zimmer *et al* 2013), o resultado encontrado em nosso trabalho serve de modelo para avaliar os efeitos sobre outras espécies de moscas de importância agrícola para a fruticultura do país como *A. fraterculus*, *C. capitata* e *D. suzukii*.

Em adição, o isolado *Bto* nos valores de CL_{90} (8×10^8 , 4×10^{11} e 8×10^8 UFC.ml⁻¹, suco de uva 50%, melaço de cana-de-açúcar 7% e proteína hidrolisada 7%, respectivamente, causaram baixa mortalidade aos parasitoides pupais *T. anastrephae* e *P. vindemniae*, constituindo uma ferramenta promissora e compatível com futuros programas de controle biológico de *Z. indianus* e *D. suzukii*, uma vez com que as duas espécies de parasitoides foram encontradas parasitando pupários desses insetos-pragas no Brasil (Wollmann *et al* 2016, Andreazza *et al* 2017).

Frente a falta de alternativas para o manejo de *Z. indianus* no Brasil, nossos resultados demonstraram a potencialidade de uso de *B. thuringiensis* em misturas com atrativos alimentares, principalmente, para a formulações de iscas tóxicas, assim como, preconizado para a supressão populacional de *A. fraterculus* e *C. capitata* (Botton *et al* 2016, Baronio *et al* 2018). Embora os resultados verificados foram obtidos em condições ambientais controladas, novos estudos devem ser realizados a campo para verificar a toxicidade dessas formulações ao longo do tempo sob diferentes condições térmicas e de luminosidade, fatores esses que podem acelerar a degradação dos isolados bacterianos e perder a toxicidade (Navrozidis *et al* 2000, Zimmer *et al* 2005, Molina *et al* 2010). Da mesma forma, determinar o tipo de endotoxina produzida pelos isolados de *B. thuringiensis*, para verificar qual toxina promove maior efeito tóxico sobre o alvo de controle e, com ajuda das técnicas de clonagem, multiplicar somente a toxina de

interesse para a formulações de produtos biológicos eficientes para o manejo de *Z. indianus* que podem contribuir para reduzir as perdas nos campos de produção.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e bolsas de estudo concebidas - Código de Financiamento 001.

Referências

- Alberola TM, Aptosoglou S, Arsenakis M, Bel YM, Delrio G, Ellar DJ, Ferré J, Granero F, Guttmann DM, Koliais S, Martínez-Sebastián MJ, Prota R, Rubino S, Satta A, Scarpellini G, Sivropoulou A, Vasara E (1999) Insecticidal activity of strains of *Bacillus thuringiensis* on larvae and adults of *Bactrocera oleae* Gmelin (Dipt. Tephritidae). J. Invertebr. Pathol. 74:127–136.
- Aboussaid H, El-aouame L, El-messoussi S, Oufdou K (2010) Biological activity of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) strains on larvae and adults of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera:Tephritidae). J. Environ. Prot. 1:337–345.
- Andreazza F, Bernardi D, Nava DE, Botton M, Costa VA (2017b) Inimiga parasitada. Cultivar HF. 102:20–23.
- Buentello-Wong S, Galán-Wong L, Arévalo-Niño K, Almaguer-Cantú V, Rojas-Verde G (2015) Characterization of cry proteins in native strains of *Bacillus thuringiensis* and activity against *Anastrepha ludens*. Southwest. Entomol. 40:15–23.

- 377 Botton M, Arioli CJ, Machota JRR, Nunes MZ, Rosa JM (2016) Moscas-das-frutas na
378 fruticultura de clima temperado: situação atual e perspectivas de controle através do
379 emprego de novas formulações de iscas tóxicas e da captura massal. *Agropecuária*
380 *Catarinense*. 29:103-108.
- 381 Bernardi D, Andreazza F, , Botton M, Baronio CA, Nava DE (2017) Susceptibility and
382 Interactions of *Drosophila suzukii* and *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) in
383 Damaging Strawberry. *Neotropical Entomology*. 1:1-7.
- 384 Baronio CA, Bernardi D, Paranhos BAJ, Garcia FRM, Botton M (2018) Population
385 suppression of Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) on table grapes
386 using toxic baits. *Annals of the Brazilian Academy of Science*.
- 387 Commar LS, Galego LGD, Ceron CR, Carareto CMA (2012) Taxonomic and
388 evolutionary analysis of *Zaprionus indianus* and its colonization of Palearctic and
389 Neotropical regions. *Genet Mol Biol*. 35:395–406.
- 390 Crickmore N, Zeigler DR, Schnepf E, Rie J van, Lereclus D, Baum J, Bravo A, Dean
391 DH (2015) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature.
392 (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/).
- 393 Cossentine J, Robertson M, Xu D (2016) Biological activity of *Bacillus thuringiensis* in
394 *Drosophila Suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *J. Econ. Entomol*. 109:1071–1078.
- 395 Darriet F, Hourgard J, M. (2002) An isolate of *Bacillus circulans* toxic to mosquito
396 larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 18:65– 67.
- 397 Federici BA, Park HW, Sakan Y (2006) Insecticidal Protein Crystals of *Bacillus*
398 *thuringiensis*. pp. 195–293. In J. M. Shively (ed.), *Microbiology monographs*,
399 inclusions in prokaryotes, Vol. 1. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- 400 Frankenhuyzen VK, (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal
401 proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*. 101:1–16.

- 402 Goñi B, Fresia P, Calviño M, Ferreiro MJ, Valente VLS, Basso Da Silva L (2001) First
 403 record of *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae) in southern
 404 localities of Uruguay. Dros Inf Serv. 84: 61-64.
- 405 Hederson CF, Tilton EW (1955) Tests with acaricides against the brow wheat mite. J.
 406 Econ. Entomol. 48:157-161.
- 407 Hinde J, Demétrio CGB (1998) Overdispersion: Models and estimation. Computational
 408 Statistics & Data Analysis 27:151-170
- 409 Joshi NK, Biddinger DJ, Demchak K, Deppen A (2014) First report of *Zaprionus*
 410 *indianus* (Diptera: Drosophilidae) in commercial fruits and vegetables in Pennsylvania.
 411 J Pest Sci. 14:259–263.
- 412 Kogan M. (1998) Integrated pest management: historical perspectives and contemporary
 413 developments. Annu. Rev. Entomol. 43: 243-270.
- 414 Kongsuwan, K. et al., 2005. Characterization of a new *Bacillus thuringiensis*
 415 endotoxin, Cry47Aa, from strains that are toxic to the Australian sheep
 416 blowfly, *Lucilia cuprina*. FEMS Microbiol Lett. 252 (1), 127–136.
- 417 Kumar AS, Moorthi M, Ramakrishnan N, Dhanapakiam P, Ramasamy VK, Rajeswari
 418 AR (2009) Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in the control of two
 419 mosquito species (*Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*). J. Environ. Biol.
 420 30: 433–435.
- 421 Lasa R, Tadeo E (2015) Invasive Drosophilid Pests *Drosophila suzukii* and *Zaprionus*
 422 *indianus* (Diptera:Drosophilidae) in Veracruz, Mexico. Fla. Entomologist 98: 987- 988.
- 423 Molina CA, Caña-Roca JF, Osuna A, Vilchez S (2010) Selection of a *Bacillus pumilus*
 424 strain highly active against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) larvae. Appl. Environ.
 425 Microbiol. 76: 1320–1327.

- 426 Martins NL, De Lara SSPAP, Ferreira SM, Nunes MA, Bernardi D, Leite LPF, Garcia
 427 MRF (2018) Biological Activity of *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae)
 428 in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). Journal of Economic Entomology. 111:
 429 1486–1489.
- 430 Nelder JÁ, Wedderburn RWM (1972) Generalized Linear Models. Journal of the Royal
 431 Statistical Society. 135:370-384.
- 432 Navrozidis EI, Vasara E, Karamanlidou G, Salpiggidis GK, Koliais SI (2000)
 433 Biological control of *Bactocera oleae* (Diptera: Tephritidae) using a Greek *Bacillus*
 434 *thuringiensis* isolate. J.Econ. Entomol. 93: 1657–1661.
- 435 Nunes AP, Costa KZ, Faggioni KM, Costa MLZ, Gonçalves RS, Walder JMM, Garcia
 436 MS, Nava DE (2013) Dietas artificiais para a criação de larvas e adultos da mosca-das-
 437 frutas sul-americana. Pesqui. Agropecu. Bras. 48:1309-1314.
- 438 Obeidat M (2008) Toxicity of local *Bacillus thuringiensis* isolates against *Drosophila*
 439 *melanogaster*. World J. Agric. Sci. 4:161–167.
- 440 Throne JE, Weaver DK, Chew VB, James E (1995) Probit analysis of correlated data:
 441 multiple observations over time at one concentration. Journal of Economic Entomology,
 442 Lanham. 88:1510-1512.
- 443 Toledo J, Liedo P, Williams T, Ibarra J (1999) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* beta-
 444 exotoxin to three species of fruit flies (Diptera: Tephritidae). J.Econ. Entomol. 92:
 445 1052–1056.
- 446 RDCT. 2012. R: A Language and Environment for Statistical Computing R Foundation
 447 for Statistical Computing, Vienna (Online:) <https://http://www.r-project.org/>.
- 448 Stein CP, Teixeira EP, Novo JPS (2003) Aspectos biológicos da mosca do figo,
 449 *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae). Entomotropica. 18:219-221.

450 SAS Institute. 2011. Statistical Analysis System: Getting Started with the SAS
 451 Learning, 92 ed. SAS Institute, Carry, NC.

452 Sauka DH, Pérez MP, López NN, Onco MI, Berretta MF, Benintende GB (2014) PCR-
 453 based prediction of type I β -exotoxin production in *Bacillus thuringiensis* strains.
 454 Journal of invertebrate pathology. 122:28-31.

455 Shishir, MA, Akter A, Bodiuzzaman M, Hossain MA, Alam MM, Khan SA, Khan SN,
 456 M. Hoq MM (2015) Novel toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains against the melon
 457 fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). Biocontrol Sci. 20:115–123.

458 Schlesener DCH, Wollann J, Kruger AP, Martins LN, Geisler FCS, Garcia FRM (2017)
 459 Rearing method for *Drosophila suzukii* and *Zaprionus indianus* (Diptera:
 460 Drosophilidae) on artificial culture media. Dros. Inf. Serv. 100:185-189.

461 Van Der Linde K, Steck GJ, Hibbard K, Birdsley JS, Alonso LM, Houle D (2006) First
 462 records of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae), a pest species on commercial
 463 fruits from Panama and the United States of America. Fla. Entomologist. 89:402-404.

464 Van Der Linde K (2013) *Zaprionus indianus* distribution in the United States.
 465 <<http://www.kimvdlinde.com/professional/Zaprionus%20distribution%20US.php>>
 466 Acesso em: 20 Set. 2018.

467 Vilela CR, Goñi B. Mosca-africana-do-figo, *Zaprionus indianus* Gupta (2015) In:
 468 Evaldo Ferreira Vilela; Roberto Antonio Zucchi. (Org.). Pragas Introduzidas no Brasil:
 469 insetos e ácaros. 1 ed. Piracicaba: FEALQ. 11:191-214.

470 Wollmann J, Schlesener DCH, Ferreira MS, Garia MS, Costa VA, GARCIA FRM
 471 (2016) Parasitoids of Drosophilidae with potential for parasitism on *Drosophila suzukii*
 472 in Brazil. Dros. Inf. Serv. 99: 38-42.

- 473 Zahiri NS , Mulla MS (2005) Non-larvicidal effects of *Bacillus thuringiensis israelensis*
474 and *Bacillus sphaericus* on oviposition and adult mortality of *Culex quinquefasciatus*
475 Say (Diptera: Culicidae). J. Vector Ecol. 30:155–162.
- 476 Zimmer CR, Dias de Castro LL, Pires SM, Delgado Menezes AM, Ribeiro PB, Leivas
477 Leite FP(2013) Efficacy of entomopathogenic bacteria for control of *Musca domestica*.
478 J.Invertebr.Pathol.114:241–244

Tabela 1. Estimativa (CL_{50} e CL_{90} – UFC.ml⁻¹) de isolados bacterianos em adultos de *Zaprionus indianus* quando em misturas com diferentes atrativos alimentares até 168 horas após a exposição.

Tempo de Exposição (h)	Atrativo	Isolado	Coefficiente Angular $\pm$ EP	CL_{50}^a	CL_{90}^b	χ^2c	g.l. ^d
168	Suco de uva a 50%	<i>Bti</i>	3.11 ± 0.22	40×10^{-8}	$15,6 \times 10^{-10}$	3.2	5
		<i>Btk</i>	2.04 ± 0.47	4×10^{-9}	12×10^{-10}	9.9	5
		<i>Bc</i>	1.17 ± 0.16	320×10^{-8}	4×10^{-11}	6.5	5
		<i>Bto</i>	2.11 ± 0.14	80×10^{-8}	8×10^{-10}	9.3	5
168	Melaço de cana a 7%	<i>Bti</i>	2.11 ± 0.15	40×10^{-8}	4×10^{-10}	7.2	5
		<i>Btk</i>	3.04 ± 0.11	4×10^{-9}	320×10^{-10}	8.2	5
		<i>Bc</i>	2.17 ± 0.14	240×10^{-7}	4×10^{-9}	4.6	5
		<i>Bto</i>	2.36 ± 0.21	80×10^{-8}	4×10^{-11}	7.3	5
168	Proteína hidrolisada 7%	<i>Bti</i>	2.75 ± 0.12	40×10^{-8}	$15,6 \times 10^{-10}$	8.2	5
		<i>Btk</i>	2.04 ± 0.47	4×10^{-9}	12×10^{-10}	6.1	5
		<i>Bc</i>	2.17 ± 0.35	240×10^{-7}	4×10^{-11}	6.7	5
		<i>Bto</i>	2.03 ± 0.22	80×10^{-8}	8×10^{-10}	7.3	5

^{a,b}LC₅₀ e LC₉₀: concentração de isolados bacterianos (UFC⁻¹) necessário para matar 50% ou 90% de adultos *Z. indianus*, ^c χ^2 : valor qui-quadrado;

^dg.l.: graus de liberdade.

489

490 **Tabela 2.** Estimativa do tempo letal mediano (TL₅₀, em horas) e do intervalo de confiança (IC) dos isolados bacterianos para adultos de *Z.*491 *indianus* utilizando a máxima concentração testada 10⁻¹⁰ e 10⁻¹¹ de cada isolado bacteriano.

Tretamentos	Isolado	<i>n</i>	Coefficiente Angular ± EP	TL ₅₀ (IC 95%) ^a	χ ^{2c}	g.l.. ^d
Suco de uva a 50%	<i>Bti</i>	475	3.74 ± 0.12	58.42 (35.44 – 67.84)	4.80	4
	<i>Btk</i>	510	2.55 ± 0.44	73.31 (55.17 – 97.84)	8.52	4
	<i>Bc</i>	485	2.76 ± 0.30	56.27 (46.32 – 63.11)	5.02	4
	<i>Bto</i>	480	2.07 ± 0.41	34.36 (29.12 – 51.18)	7.59	4
Melaço de cana-de-açúcar a 7%	<i>Bti</i>	475	2.89 ± 0.15	69.15 (55.28 – 87.14)	7.97	4
	<i>Btk</i>	500	3.11 ± 0.33	72.20 (65.28 – 82.89)	8.30	4
	<i>Bc</i>	485	2.44 ± 0.12	61.10 (50.17 – 53.07)	10.14	4
	<i>Bto</i>	480	2.68 ± 0.41	39.74 (21.20 – 59.21)	5.23	4
Proteína hidrolisada 7%	<i>Bti</i>	500	3.46 ± 0.33	55.44 (49.20 – 61.20)	8.08	4
	<i>Btk</i>	490	3.80 ± 0.33	52.31 (28.32 – 62.14)	9.67	4
	<i>Bc</i>	480	3.66 ± 0.32	60.12 (55.17 – 62.32)	7.1	4
	<i>Bto</i>	500	3.13 ± 0.24	32.63 (25.88 – 59.09)	8.2	4

492 *n* = Número de insetos testados;493 ^aTL₅₀: tempo requerido para 50% de mortalidade para adultos de *Z. indianus* depois da exposição ao tratamento; IC: intervalo de confiança494 para 95% erro de probabilidade; ^cχ²: valor de qui-quadrado; ^dg.l.: graus de liberdade.

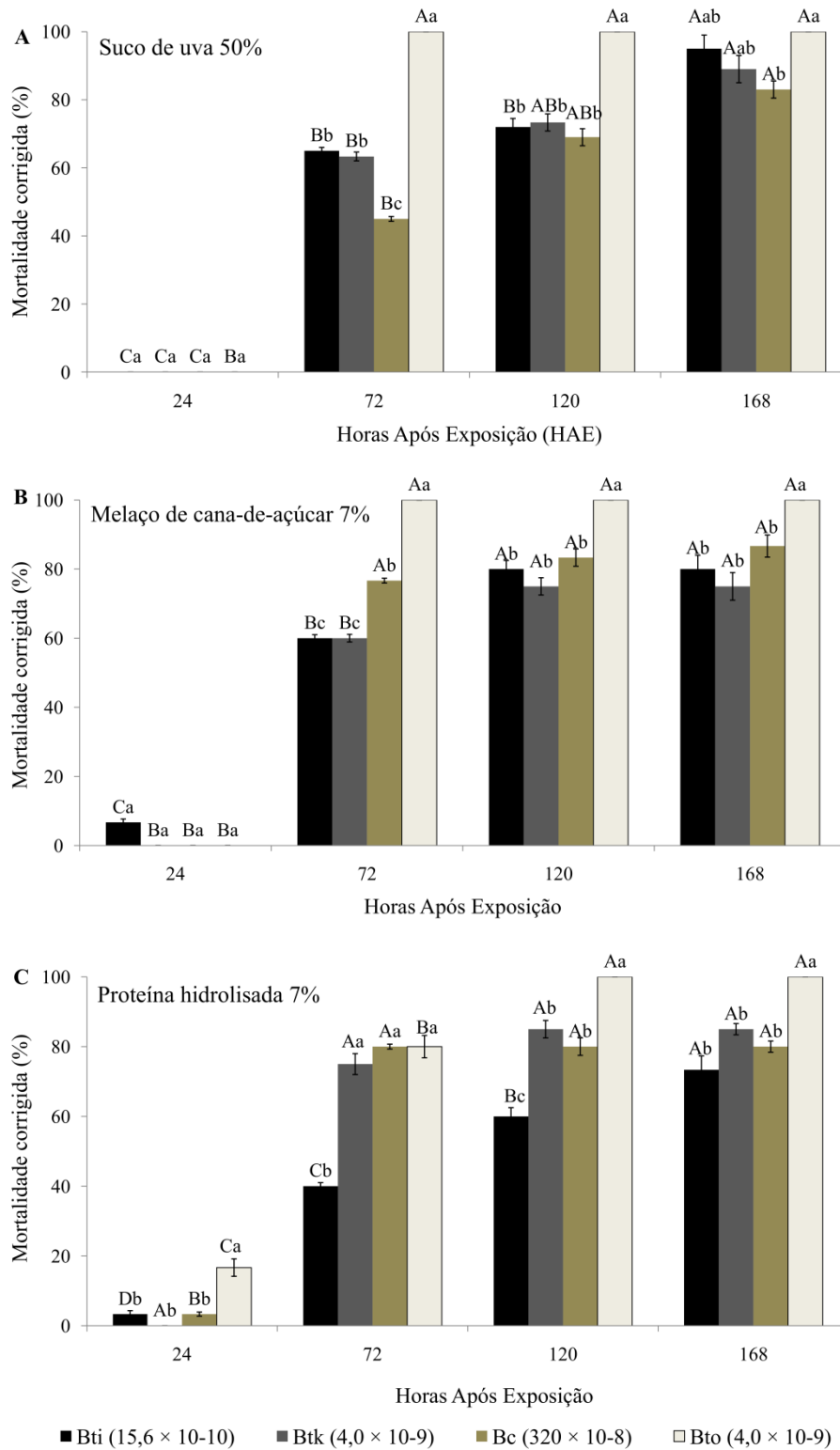


Figura 1. Mortalidade de adultos de *Zaprionus indianus* ($\pm$ Erro padrão) expostos a diferentes isolados bacterianos em misturas com atrativos alimentares em diferentes tempos de exposição (horas).

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas (dentro do mesmo isolado bacteriano e tempo de avaliação e) e maiúscula (para o mesmo isolado bacteriano no decorrer do tempo) indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Tukey, $p < 0,05$).

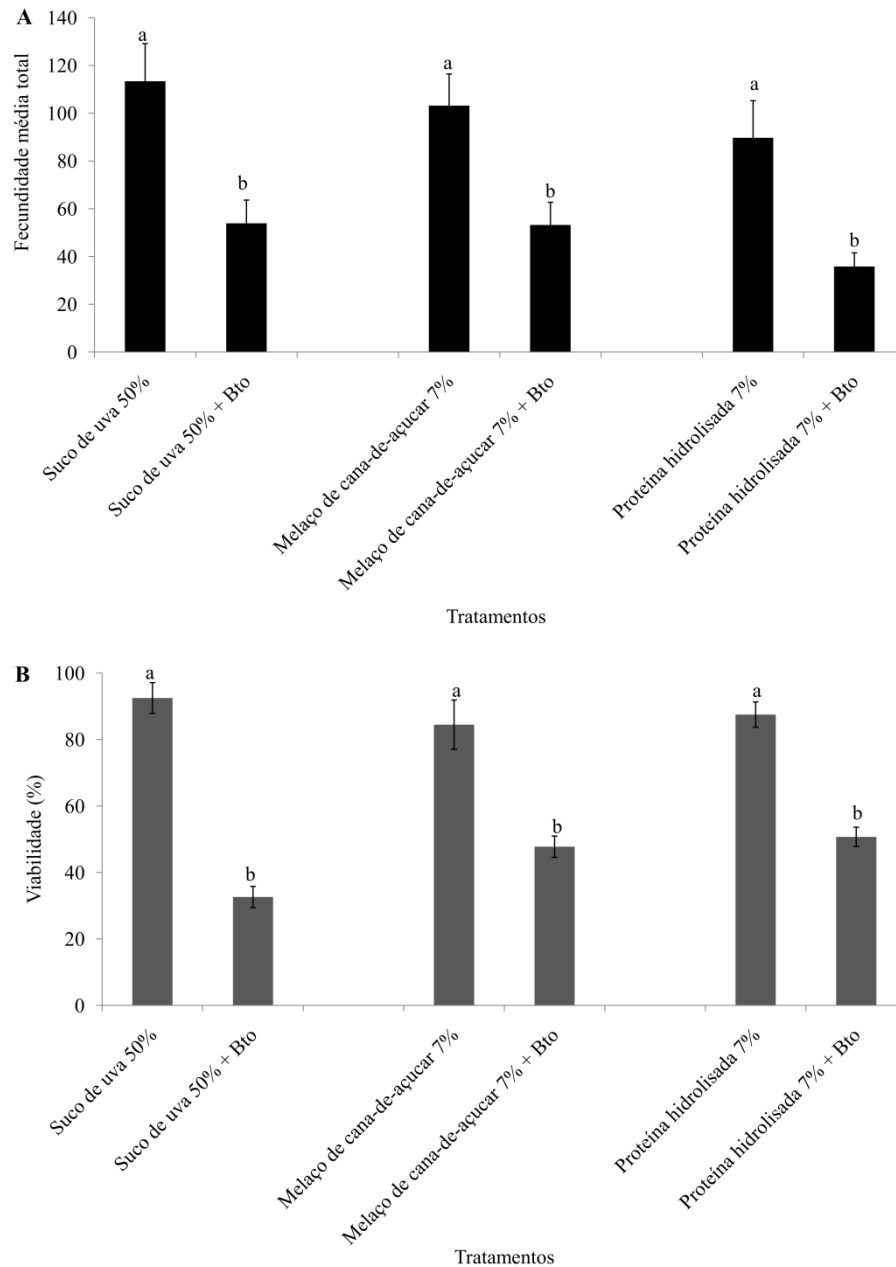


Figura 2. (A) Fecundidade total e (B) viabilidade de ovos de *Zaprionus indianus* em bioensaios de ingestão.

Médias seguidas por letras minúsculas distintas nas colunas (grupos) diferiram significativamente entre si pelo teste t ($P < 0,05$).

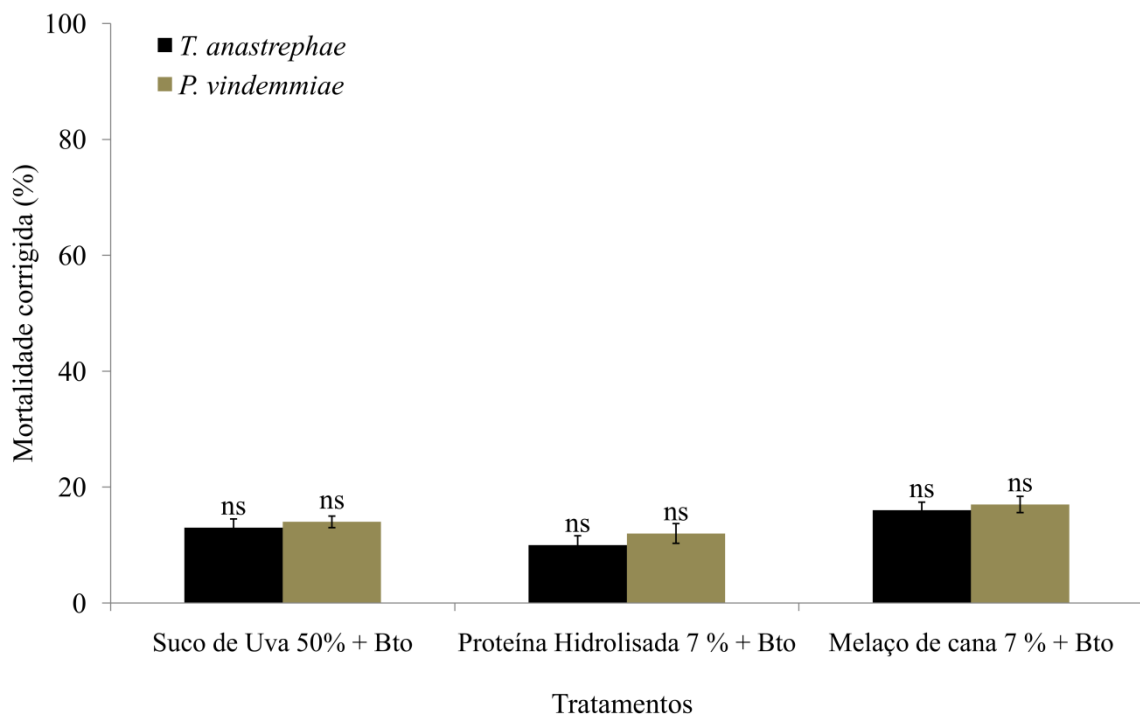


Figura 3. Mortalidade (%) ($\pm$ Erro padrão) de *Trichopria anastrephae* e *Pachycrepoideus vindemmiae* até 168 horas após a exposição dos tratamentos em bioensaio de ingestão.

^{ns}: não significativo pelo teste t ($P < 0,05$).

Conclusões gerais

O extrato etanólico a base de sementes de *A. mucosa* proporciona alta mortalidade em *Z. indanus* em bioensaio de ingestão e aplicação tópica;

A. mucosa, *A. muricata* e *A. sylvatica* e o inseticida a base de *Azadiractina indica* (Azamax™ 1,2 EC) apresentam efeito de repelência na oviposição de fêmeas de *Z. indianus*, assim como, elevado efeito ovicida;

A. mucosa, Azamax™ 1,2 EC e Delegate 250™ WG afetam negativamente a infestação de *Z. indianus* a campo;

O inseticida Delegate™ 250 WG apresenta elevada toxicidade sobre adultos de *Z. indanus* em bioensaio de ingestão e aplicação tópica;

Os isolados bacterianos *Bto*, *Bti*, *Btk* e *Bc* em mistura com os atrativos alimentares suco de uva 50%, melaço de cana-de-açúcar 7% e proteína hidrolisada 7% apresentam elevada toxicidade sobre adultos de *Z. indianus* em bioensaio de ingestão.

O isolado bacteriano *Bto* em mistura com os atrativos alimentares suco de uva 50%, melaço de cana-de-açúcar 7% e proteína hidrolisada 7% proporciona uma maior toxicidade em um menor período de tempo quando comparado com os demais isolados bacterianos;

O isolado bacteriano *Bto* em mistura com os atrativos alimentares suco de uva 50%, melaço de cana-de-açúcar 7% e proteína hidrolisada 7% não apresentam toxicidade sobre adultos de *T. anastrephae* e *P. vindemmiae* em bioensaio de ingestão;

Fêmeas de *Z. indianus* apresentam menor fecundidade e viabilidade embrionária após a ingestão de *Bto* + atrativos alimentares.

Referências

- BERNARDI, D.; ANDREAZZA, F.; BOTTON, M.; BARONIO, C. A.; NAVA, D. E. Susceptibility and Interactions of *Drosophila suzukii* and *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) in Damaging Strawberry. **Neotropical Entomology**, v. 1, p. 1-7, 2017.
- COMMAR, L. S.; GALEGO, L. G. D.; CERON, C. R.; CARARETO, C. M. A. Taxonomic and evolutionary analysis of *Zaprionus indianus* and its colonization of Palearctic and Neotropical regions. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 2, p. 395–406, 2012.
- COSENTINE, J.; ROBERTSON, M.; XU, D. Biological activity of *Bacillus thuringiensis* in *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Journal Economic Entomology**, v. 109, p. 1071-1078, 2016.
- FACHINELLO, J. C.; PASA, M. S.; SCHMTIZ, J. D.; BETEMPS, D. L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 1, p.109-120, 2011.
- FARTYAL, R. S.; SARSWAT, M.; LHAMO, N.; SATI, P. C.; ASHA, L. Records of *Zaprionus indianus* and *Drosophila suzuki* indicus as invasive fruit pests from mid valley region of Garhwal Uttarakhand, India. **Drosophila Informe Service**, v. 97, p. 119-123, 2014.
- GOÑI, B.; FRESIA, P.; CALVIÑO, M.; FERREIRO, M. J.; VALENTE, V. L. S.; BASSO DA SILVA, L. First record of *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae) in southern localities of Uruguay. **Drosophila Informe Service**, v.84, p.61-64, 2001.
- GUEDES, M. **São Paulo se destaca na produção de frutas**, 2016.
<<http://www.mda.gov.br/sitemda/noticias/s%C3%A3o-paulo-se-destaca-na-produ%C3%A7%C3%A3o-de-frutas>>. Acesso em: 25 de Mar. 2017.

<http://www.cnabrazil.org.br/sites/default/files/sites/default/files/uploads/10_fruticultura.pdf> . Acesso em: 23 Mar. 2018.

ILIAS, F.; GAOUAR, N.; MEDJDOUB, K.; KALLASSY A. M. Isecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* on Larvae and Adults of *Bactrocera oleae* Gmelin (Diptera:Tephritidae). **Journal of Environmental Protection**, n. 4, p. 480-485, 2013.

ISMAN, M.B.; GRIENEISEN, M.L. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. **Trends in plant science**, v. 19, p. 140-145, 2014.

JOSHI, N. K.; BIDDINGER, D. J.; DEMCHAK, K. DEPPEN, A. First report of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) in commercial fruits and vegetables in Pennsylvania. **Journal of Pest Science**, v. 14, p. 259–263. 2014.

LASA, R.; TADEO, E. Invasive Drosophilid Pests *Drosophila suzukii* and *Zaprionus indianus* (Diptera:Drosophilidae) in Veracruz, Mexico. **Florida Entomologist**, v. 98, n 3, p. 987- 988, 2015.

MATA, R. A. da M.; TIDON, R.; CÔRTEZ, G. L.; Jr. MARCO De P. Invasive and flexible: niche shift in the drosophilid *Zaprionus indianus* (Insecta, Diptera). **Biological Invasions**, v. 12, n. 5, p.1231-1249, 2010.

Martins, N. L.; De Lara, S. S. P. A. P.; Ferreira, S. M.; Nunes, M.A.; Bernardi, D.; Leite, L. P. F.; Garcia, M. R. F. Biological Activity of *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) in *Anastrepha fraterculus*(Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 111, p. 1486–1489, 2018.

NUNES, J. L. S. Perspectiva da Fruticultura Brasileira. (2017). <<http://www.agrolink.com.br/biotecnologia/NoticiaDetalhe.aspx?CodNoticia=86922>>. Acesso em: 25 Março de 2018.

PASINI, M. P. B.; LINK, D.; FRONZA, D. Eficácia de atrativos alimentares na captura de *Zaprionus indianus* (Gupta) em pomar de figo em Santa Maria - RS. **Entomo Brasilis**, v. 4, n. 2, p. 56-60, 2011.

PIRES, D. J.; BELO, M.; BARBOSA, J. C. Life history estimatives in two geographic strains of *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae). **Biodiversidade**, v. 7, n. 1, p. 42-55, 2008.

RAGA, A. **Mosca-do-figo**. In: Anais do VII Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico, Indaiatuba, São Paulo, Frutas, p. 54-57, 2002.

RAGA, A., SOUZA FILHO, M. F.; SATO, M. E. Eficiência de protetores de ostíolar do figo sobre a infestação da mosca *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: Drosophilidae) no campo. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 70, p. 287–289, 2003.

RIBEIRO, L.P.; VENDRAMIM, J.D.; ANDRADE, M.S.; BICALHO, K.U.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B. Tropical plant extracts as sources of grain-protectant compounds against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 43, p. 470-482, 2014.

RIBEIRO, L.D.P.; VENDRAMIM, J.D.; GONÇALVES, G.P.; ANSANTE, T.F.; GLORIA, E.M.D.; LOPES, J.D.C.; MELLO-SILVA, R.; FERNANDES, J.B. Searching for promising sources of grain protectors in extracts from Neotropical Annonaceae. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 15, p. 215-232, 2016.

Steck, G. J.; *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae), a genus and species new to Florida and North America, 2005 <http://www.freshfromflorida.com/pi/pest-alerts/zaprionus-indianus.html> (acessado 20 Março de 2019).

SHISHIR, M. A.; AKTER, A.; BODIUZZAMAN, M. A.; HOSSAIN, M. M.; ALAM, S. A.; KHAN, S.; HOG M. M. Novel toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains against the melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). **Biocontrol Science**, n. 20, p. 115-123, 2015.

SILVA, A. C.; LEONEL, S.; DE SOUZA, A. P.; DE SOUZA, M. E.; TANAKA, A. A. Crescimento de figueira sob diferentes condições de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 4, p. 539-551, 2011.

SINGH, F. R.; SARSWAT, M.; LHAMO, N.; SATI, P. C. Records of *Zaprionus indianus* and *Drosophila suzukii indicus* as invasive fruit pests from mid valley region of Garwhal Uttarakhand, India. **Drosophila Information Service**, v. 97, 2014.

SOUZA, C.M.; BALDIN, E.L.L.; RIBEIRO, L.P.; SILVA, I.F.; MORANDO, R.; BICALHO, K.U.; VENDRAMIM, J.D.; FERNANDES, J.B. Lethal and growth inhibitory activities of Neotropical Annonaceae-derived extracts, commercial formulation, and an isolated acetogenin against *Helicoverpa armigera*. **Journal of Pest Science**, v. 90, p. 701-709, 2017.

STEIN, C. P.; TEIXEIRA, E. P.; NOVO, J. P. S. Aspectos biológicos da mosca do figo, *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae). **Entomotropica**, v. 18, n. 3, p. 219-221, 2003.

VAN DER LINDE, K.; STECK, G. J.; HIBBARD, K.; BIRDSLEY, J. S.; ALONSO, L. M.; HOULE, D. First records of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae), a pest species on commercial fruits from Panama and the United States of America. **Florida Entomologist**, v.89, p.402-404, 2006.

VILELA, C. R. TEIXEIRA, E. P.; STEIN, C. P. **Mosca africana-do-figo, *Zaprionus indianus* (Diptera:Drosophilidae)**. In: Vilela, E. F., R. A. Zucchi & F.Cantor, (eds), Historico e impacto pragas introducidas no Brasil, Holos, Ribeirão Preto, p. 48-52. 2001.

VILELA, C. R.; GOÑI, B. **Mosca-africana-do-figo, *Zaprionus indianus* Gupta**. In: Evaldo Ferreira Vilela; Roberto Antonio Zucchi. (Org.). Pragas Introduzidas no Brasil: insetos e ácaros. 1ed.Piracicaba: FEALQ, v. 1, p. 191-214, 2015.