



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA
MESTRADO EM FITOTECNIA

FRANCO DENNIS LOYOLA MACALAPU

**PATOGENICIDADE DE FUNGOS SOBRE *Ceratitis capitata* (WIEDEMANN)
(DIPTERA: TEPHRITIDAE), EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

MOSSORÓ

2023

FRANCO DENNIS LOYOLA MACALAPU

**PATOGENICIDADE DE FUNGOS SOBRE *Ceratitis capitata* (WIEDEMANN)
(DIPTERA: TEPHRITIDAE), EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Proteção de plantas

Orientador: Prof. Dr. Elton Lucio de Araujo

Coorientadora: Profa. Dra. Elania Clementino Fernandes

MOSSORÓ

2023

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

LF825 Loyola Macalapu, Franco Dennis .
p Patogenicidade de fungos sobre *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), em condições de laboratório / Franco Dennis Loyola Macalapu. - 2023.
69 f. : il.

Orientador: Elton Lucio Araujo.
Coorientador: Elania Clementino Fernandes.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, 2023.

1. Moscas-das-frutas. 2. Controle microbiano.
3. Mortalidade. 4. Micose. I. Araujo, Elton Lucio , orient. II. Clementino Fernandes, Elania , co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade com AACR2 e os dados fornecidos pelo autor(a).

Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência

Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva

CRB: 15/120

FRANCO DENNIS LOYOLA MACALAPU

**PATOGENICIDADE DE FUNGOS SOBRE *Ceratitis capitata* (WIEDEMANN)
(DIPTERA: TEPHRITIDAE), EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Proteção de plantas

Defendida em: 20 / 07 / 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Elton Lucio de Araujo (UFERSA)
Presidente

Profa. Dra Elania Clementino Fernandes (UFERSA)
Membro Examinador

Prof. Dr. Ewerton Marinho da Costa (UFCG)
Membro Examinador

Profa. Dra. Jailma Suerda Silva de Lima (UFERSA)
Membro Examinado

*À minha avó Santos Mendoza Román
(In Memoriam).*

A meus pais Elena e Jorge Luis por serem o meu maior exemplo de luta, dedicação e perseverança. Obrigado pelo carinho, apoio e compressão que me deram e fizeram de mim ser um grande profissional e ser humano, dedicado e apaixonado pelo que faz. A minhas irmãs Gina, Marisela e Esthefani, por estar sempre comigo apesar da distância neste processo. Los amo mucho familia.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar a vida, as forças e saúde durante esta caminhada do mestrado no Brasil.

A toda a minha família, por sempre me apoiar a cumprir meus sonhos, obrigado por sempre estar aí para mim.

Ao meu orientador Elton Lucio de Araujo, pelos ensinamentos, auxílios e apoio durante meu mestrado.

A Elania Clementino Fernandes, pelo apoio, ensinamentos e motivação para ser um grande profissional.

A meus bons amigos, que lembrarei sempre: Maria Ítala, Hellanny Matos, Joao Pedro, Rayane Sley, Márcia Mayara, Ramon Argolo, Álricelia Lima e Benedito Charles, obrigado pela amizade, vocês me fizeram sentir que estava em casa.

A meus amigos estrangeiros (de todas as turmas), pela motivação, risadas e os bons conselhos que deram para mim: Carolina Ramirez, Yansen Herrera, Vladimir Rubiano, Deisy Rosero e Fabiola Retuerto.

Agradeço a meus amigos da faculdade: Dariane Viela, Lorena Luma, Juliano Fernandes e João Victor.

Agradeço a toda a equipe e colegas do Laboratório de Entomologia Aplicada da UFRSA: Jonathan Lima, Francisco Resende, Bruna Salvino, Giovana Dias, Cecilia Godeiro e Jefferson Marcos.

A Profa. Márcia Michelle de Queiroz Ambrosio e a toda sua equipe do laboratório de Microbiologia Agrícola pelo auxílio durante o meu experimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRSA, e aos docentes do programa pelos ensinamentos durante o mestrado.

Ao Programa de Alianças para a Educação e a Capacitação (PAEC), junto com à Organização dos Estados Americanos (OEA), por me ter selecionado para realizar o mestrado no Brasil.

Agradeço a UFRSA e a PROPPG pela concessão da bolsa.

Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente.

Eleanor Roosevelt

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1. Curvas de mortalidade de adultos de *Ceratitis capitata*, expostos a fungos entomopatogênicos pelo método de inoculação tópica 32

Figura 2. Curvas de mortalidade de adultos de *Ceratitis capitata*, após alimentação com dieta contaminada com suspensões de fungos entomopatogênicos em duas proporções 35

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Fungos entomopatogênicos e doses usadas nos bioensaios.....	29
Tabela 2. Mortalidade de adultos de <i>Ceratitis capitata</i> , expostos a fungos entomopatogênicos pelo método de inoculação tópica.	31
Tabela 3. Mortalidade de adultos de <i>Ceratitis capitata</i> , após alimentação de dieta contaminada com suspensões de fungos entomopatogênicos em duas proporções	33
Tabela 4. Tempo letal médio (TL ₅₀)(dias) da mortalidade de <i>Ceratitis capitata</i> expostos a fungos entomopatogênicos misturados com dieta de alimentação, em duas proporções.....	34

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

- Tabela 1.** Mortalidade pupal de *Ceratitis capitata* expostas a fungos entomopatogênicos, mediante o método tópico em duas doses diferentes.....55
- Tabela 2.** Mortalidade de adultos de *Ceratitis capitata* emergidos de pupários expostos a fungos entomopatogênicos, mediante o método tópico em duas doses diferentes.....55
- Tabela 3.** Mortalidade pupal de *Ceratitis capitata* expostas a fungos entomopatogênicos, mediante o método de imersão em duas doses diferentes.56
- Tabela 4.** Mortalidade de adultos de *Ceratitis capitata* emergidos de pupários expostos a fungos entomopatogênicos, mediante o método de imersão em duas doses diferentes.57
- Tabela 5.** Mortalidade de pupas e adultos de *Ceratitis capitata* expostos a fungos entomopatogênicos, mediante solo contaminado em duas doses diferentes.58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO II - PATOGENICIDADE DE FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS SOBRE ADULTOS DE <i>Ceratitis capitata</i> (WIEDEMANN) (DIPTERA: TEPHRITIDAE), EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO	24
RESUMO.....	24
ABSTRACT	25
1. INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1. Local do estudo	28
2.2. Criação de <i>Ceratitis capitata</i>	28
2.3. Fungos entomopatogênicos (FEs) utilizados nos bioensaios	28
2.4. Testes de patogenicidade de fungos entomopatogênicos (FEs) sobre adultos de <i>Ceratitis capitata</i>	29
2.4.1. Método por inoculação tópica	29
2.4.2. Método pela alimentação	30
2.5. Variáveis analisadas	30
2.6. Análises estatísticas.....	30
3. RESULTADOS.....	31
3.1. Método por inoculação tópica.....	31
3.2. Método pela alimentação	33
4. DISCUSSÃO	36
5. CONCLUSÕES.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
CAPÍTULO III – EFICÁCIA DA INFECÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS EM PUPÁRIOS DE <i>Ceratitis capitata</i> (WIEDEMANN) (DIPTERA: TEPHRITIDAE), EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO	48

RESUMO.....	48
ABSTRACT	49
1. INTRODUÇÃO	50
2. MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1. Local do estudo	52
2.2. Procedência dos pupários de <i>Ceratitis capitata</i>	52
2.3. Linhagens comerciais para os bioensaios	52
2.4. Condução dos bioensaios.....	52
2.4.1. Patogenicidade dos fungos entomopatogênicos (FEs) em pupas de <i>Ceratitis capitata</i>	52
2.4.1.1. Método tópico	52
2.4.1.2. Método por imersão	53
2.4.1.3. Método por solo contaminado.....	53
2.5. Variáveis analisadas	54
2.6. Análises estatísticas.....	54
3. RESULTADOS.....	55
4. DISCUSSÃO	59
5. CONCLUSÕES	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO GERAL

Com base nos dados fornecidos pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, 2021), o Brasil ocupa a terceira posição no ranking mundial de produtores de frutas, ficando atrás apenas da China e Índia. Esse destaque no mercado global de frutas é resultado, em parte, da habilidade do Brasil em atender às exigências fitossanitárias dos países importadores de frutas in natura (De Almeida et al., 2019).

Nos últimos anos, as áreas de cultivo de frutas têm experimentado um crescimento significativo devido ao aumento na produção. Entretanto, esse cenário promissor é ameaçado por diversos fatores, sendo o ataque de pragas um dos principais desafios a serem enfrentados (Klick et al., 2016).

Dentre essas pragas destacamos as moscas-das-frutas, em especial *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), conhecida também como mosca do mediterrâneo (medfly), que é considerada como uma das pragas limitantes do setor frutícola no mundo, devido aos danos causados nos frutos, gerando perdas significativas (Guillem-Amat et al., 2020). Além disso, é uma praga que compromete a produção devido aos danos diretos e indiretos que causam nas frutas, afetando muitas vezes o rendimento e os custos de produção (Gava et al., 2020; Louzeiro et al., 2021). *Ceratitis capitata* é uma praga polífaga, invasora e agressiva, chegando a causar muitas vezes a abertura de procedimentos de quarentena em países importadores de frutas (Papadopoulos et al., 2001; Scolari et al., 2021).

Para o controle de *C. capitata*, em várias partes del mundo, são utilizadas diversas medidas como por exemplo a técnica de machos estéreis. Essa abordagem envolve a liberação em larga escala de machos esterilizados, com o objetivo de diminuir as taxas reprodutivas das fêmeas selvagens (Klassen; Curtis; Hendrichs, 2005; Harter et al., 2015). Porém o principal método de controle é o químico, através da aplicação de inseticidas juntamente com o uso de armadilha com atrativos alimentares (Montes; Raga, 2006; Guillem - Amat et al., 2020).

Contudo, o uso excessivo de produtos químicos pode se tornar uma ameaça para os produtores frutícolas (Del Fava; Ioriatti; Melegarom, 2017; Leach et al., 2018). Além disso, esse tipo de controle químico pode gerar impactos sobre organismos não alvo e ainda mais preocupante, levar ao desenvolvimento de resistência (Vontas et al., 2011). Diante dessa problemática, surge a necessidade premente de buscar novas opções sustentáveis de controle, visando preservar tanto o meio ambiente como a saúde humana. O controle biológico é uma dessas alternativas promissoras (Fanning; Grieshop; Isacs, 2018).

O controle biológico, conforme descrito por Parra et al. (2002), é um fenômeno natural que envolve a regulação de plantas e animais por meio de inimigos naturais, os quais atuam como agentes de mortalidade biótica. No contexto do controle biológico das moscas-das-frutas, os principais agentes utilizados são os parasitoides (larvas e pupas) e os fungos entomopatogênicos (FEs) (Paranhos; Nava; Malavasi, 2019).

Os FEs, são classificados como microrganismos que provocam doenças em artrópodes-praga, possuindo a capacidade de infectar e depois causar a morte destas, considerados pesticidas de base biológica. Apresentam a vantagem de serem agentes de biocontrole ecologicamente sustentáveis, uma vez que não afetam os inimigos naturais nem representam riscos para o bem-estar humano. Por essa razão, tornam-se uma alternativa viável para o controle dos tefritídeos (Zimmermann, 2007; Mantzoukas; Eliopoulos, 2020; Essiedu; Adepoju; Ivantsova, 2020).

Atualmente, a segurança alimentar dos cultivos, especialmente em relação aos resíduos de agrotóxicos, tem sido uma preocupação crescente. Nesse contexto, o uso dos FEs tem desempenhado um papel fundamental como reguladores das populações de artrópodes-praga no campo, sendo aplicados no manejo sustentável de pragas em diversas culturas (Oreste et al., 2012; Lacey et al., 2015; Mantzoukas; Eliopoulos, 2020; Gava et al., 2021).

Dessa forma, a inclusão de FEs em programas de manejo integrado de pragas, irá diminuir o risco de atingir os níveis máximos de resíduos (LMRs), além de não oferecer risco ao meio ambiente (Molina et al., 2010). Outro ponto importante é que os FEs, podem ser aplicados nos três tipos de categorias do controle biológico: clássico, conservativo e aumentativo, se tornado uma alternativa promissora para a fruticultura mundial (Mccravy, 2008).

Os FEs apresentam uma característica única: a capacidade de produzir grandes quantidades de propágulos infecciosos (Kaya; Vega, 2012; Harris-Shultz et al., 2020; Litwin; Nowak; Różalska, 2020). A disseminação desses propágulos ocorre através de hospedeiros vivos infectados que, ao morrerem, espalham os propágulos para lugares distintos da infecção (Hajek, 1999).

Os propágulos infecciosos encontrados na maioria dos FEs, são classificados como hifas (micélios), blastosporos ou conídios (De Faria; Wraight, 2007). Para produzir em grande quantidade os FEs, utiliza-se culturas em substratos artificiais, que podem ser líquidos ou sólidos, aplicados para suprimir as pragas por meio de aplicações inundativas ou inoculativas (Meikle et al., 2003; Jackson; Dunlap; Jaronski, 2010; Mascarin; Jaronski, 2016; Jaronski, 2023).

Além disso, o controle de qualidade é indispensável em uma produção massal para garantir uma virulência fúngica maior e um nível de patogenicidade que seja determinante no controle dos artrópodes-praga (Dotaona et al., 2015). Os FEs dos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Cordyceps* são os mais utilizados no mundo para o controle de pragas (Gebremariam; Chekol; Assefa, 2021).

No gênero *Beauveria* podemos destacar o fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Clavicipitaceae), descoberto no ano de 1835, por Agostino Bassi (Lord, 2005), de natureza hemibiotrófica oportunista, entomófaga e saprófaga (Sharma; Sharma, 2021). *Beauveria bassiana* possui conidióforos, que apresentam células conidiogênicas com conídios de formato globosos e subglobosos que são originados de um raque com desenvolvimento em padrão zigue-zague (Dangi; Lim, 2018). *Beauveria bassiana* é considerado o maior agente dentro do controle biológico, por sua capacidade de infectar uma ampla variedade de hospedeiros, sendo considerado generalista (De Faria; Wraight, 2007; Araújo; Hughes, 2016).

Estudos mostram que *B. bassiana*, possui maior longevidade, quando comparado a outros fungos entomopatogênicos, podendo infectar hospedeiros de diversas ordens tais como Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera e Orthoptera, independente do estágio, provocando a conhecida doença “muscardina branca” (Dannon et al., 2020; Sinno et al., 2021).

Outro importante fungo é *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae), que foi relatado pela primeira vez por Metschnikoff, inicialmente foi descrito como *Entomophthora anisopliae*, anos depois passou a ser descrito como *Metarhizium* por Sorokin. Esse gênero está distribuído em quase todas as partes do mundo (Zimmermann, 2007; Mongkolsamrit et al., 2020).

Além disso, o gênero *Metarhizium*, se caracteriza por apresentar conídios hidrofóbicos causadas pelas hidrofobinas (proteínas com alto conteúdo de cisteína) na parede celular (Inglis et al., 2001). As estruturas desse gênero são compostas por conidióforos, que são ramificados a partir de uma fiálide (Brunner-Mendoza et al., 2019). Esse gênero apresenta outras espécies, que são utilizadas para o controle de pragas: *Metarhizium robertsii* JF Bisch., SA Rehner & Humber, *Metarhizium brunneum* Petch, *Metarhizium guizhouense* QT Chen & HL Guo e *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (Hernández-Domínguez; Guzmán-Franco, 2017 ; Mongkolsamrit et al., 2020).

Uma das características do gênero *Metarhizium* é apresentar colônias de colorações verde, que vão desde verde pálido, verde brilhante a um verde amarelado, conhecido como

muscardina verde (Bridge et al., 1993). Encontra-se infectando uma diversidade de insetos das ordens Coleoptera, Dermaptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera Orthoptera (Zimmermann, 2007).

Outro gênero de grande importância é o *Cordyceps*, anteriormente denominado de *Isaria* (Kepler et al., 2017). *Cordyceps fumosorosea* Wize (Hypocreales: Cordycipitaceae) é um fungo que apresenta uma característica dimórfica, ou seja, possui duas formas distintas: micelial (conídio assexuado não móvel) e leveduriforme (fungo vegetativo) (Deshpande, 1999). Além disso, trata-se de um fungo com propriedade endofítica e que ocorre naturalmente (Akutse et al., 2013). Esse gênero é caracterizado por apresentar em suas estruturas fúngicas hifas septadas, conidióforos verticilados e fiálides, das quais surgem os conídios com formato ovoide a subgloboso (Chen et al., 2022). *Cordyceps fumosorosea* apresenta dois tipos de propágulos: conídios e blastosporos, causando infecções graves, levando a morte de seus hospedeiros (Lopes et al., 2017; Gandarilla-Pacheco et al., 2017). Dentre seus principais hospedeiros estão os insetos das ordens Hemiptera e Lepidoptera (Zimmermann, 2008).

Por sua vez, *Cordyceps javanica* (Friedrichs & Bally) Samson & Hywel-Jones (Hypocreales: Cordycipitaceae), conhecida anteriormente como *Isaria javanica*, foi relatada pela primeira vez em Java (Indonésia) em *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae) (Samson, 1974). Essa espécie apresenta alta patogenicidade no controle de *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) (Kepler et al., 2017). Além disso, tem sido observada alta virulência em insetos-praga das ordens Lepidoptera, Hemiptera e Thysanoptera (Wang et al., 2022).

No entanto, a eficácia dos FEs pode ser afetada pelos fatores abióticos como umidade, temperatura, precipitação e radiação solar (UV-A e B), além de fatores bióticos como comportamento do hospedeiro e interação fungo-inseto (Jaronski, 2010). Essas limitações causam forte impacto na germinação dos propágulos infecciosos, além de impactar também o grau de invasão e virulência das cepas frente ao hospedeiro (Mascarin et al., 2019; Litwin; Nowak; Ro, 2020).

Finalmente, os FEs precisam superar o sistema de defesa de seus hospedeiros para produzir esporos viáveis (Mora; Castilho; Fraga, 2018). O processo infeccioso tem início com a fixação dos FEs à cutícula do hospedeiro (Patel, 2020), utilizando forças físicas, eletrostáticas e químicas (Mascarin; Jaronski, 2016). A fixação dos fungos é mediada por uma série de mecanismos, impulsionados pelas propriedades hidrofóbicas da parede celular dos

conídios, contendo, por exemplo, hidrofobinas ricas em proteínas (cisteínas), presentes nos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Cordyceps* (Mora; Castilho; Fraga, 2018).

Após a adesão dos fungos, ocorre a germinação dos esporos, iniciando o ciclo de vida dos FEs e formando o tubo germinativo que penetrará a cutícula do hospedeiro (Islam et al., 2021). Para o desenvolvimento das estruturas de penetração, como tubos germinativos e apressórios, ou a produção de substâncias mucilaginosas indispensáveis para a formação do tubo germinativo, as condições abióticas, como umidade, temperatura, exigências nutricionais, químicas e físicas, devem ser ideais (Shah; Pell, 2003). Nessa fase, ocorre a produção de enzimas degradantes, como proteases, quitinases, quitosanases e lipases, com o objetivo de degradar a cutícula do hospedeiro (Ali; Huang; Ren, 2010). A cutícula dos insetos é constituída por três camadas: a cuticulina, a epicutícula e a procutícula (Pedrini; Crespo; Juárez, 2007; Mannino et al., 2019). A procutícula é composta por uma camada interna chamada endocutícula e uma camada externa conhecida como exocutícula, onde estão presentes as células epidérmicas e a hemocele (Mora; Castilho; Fraga, 2018).

A cutícula é rompida por uma pressão mecânica, permitindo a penetração de hifas ou blastosporos que se colonizam internamente no inseto (Zacharuk, 1970; Mascarin; Jaronski, 2016), resultando na produção de enzimas degradantes da cutícula para obter nutrição e eventualmente colonizar o inseto (Vega et al., 2012). Uma vez realizada a penetração, os fungos enfrentam diferentes respostas do sistema imunológico do inseto, precisando vencer essas defesas para completar o processo de infecção (Pal; Leger; Wu, 2007).

Por último, com as condições favoráveis, as hifas atravessam o tegumento ocorrendo a emergência do fungo para o exterior, dando início ao processo de esporulação (fase reprodutiva) (Mora; Castilho; Fraga, 2018).

Dentre os benefícios do uso dos FEs, destacam-se o controle eficiente de pragas agrícolas e florestais, a produção de alimentos livres de resíduos químicos, a preservação dos ecossistemas, a capacidade de produção on farm, bem como a fonte de disseminação e o modo de ação de contato que possuem. Esses fungos agem diretamente sobre a cutícula do hospedeiro, sem a necessidade de ingestão para que surtam efeito (Islam et al., 2021; Fenibo; Ijoma; Matambo, 2021). Além disso, os FEs apresentam outras vantagens, como desempenhar funções adicionais dentro das plantas. Estudos mostram que esses fungos podem atuar como endófitos, promovendo o crescimento das plantas, além de atuarem como antagonistas contra doenças (Jaber; Enkerli, 2017).

A utilização crescente dos FEs nos últimos anos é justificada pelos inúmeros benefícios que eles oferecem, bem como seu potencial e as interações complexas que

estabelecem com insetos, hospedeiros e o ambiente. Essas características fazem dos FEs o agente de controle biológico mais amplamente empregado no combate a insetos-praga (Sharma; Sharma; Yadav, 2023; Kutalmış et al., 2023).

De fato, os FEs são amplamente reconhecidos como os agentes mais promissores no controle biológico de pragas devido à sua notável versatilidade nas formas de aplicação (Ekesi et al., 2007; Silva et al., 2020; Shaurub et al., 2023). Além disso, existem pesquisas que comprovam a patogenicidade dos principais fungos, especialmente *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *C. fumosoroseae*, contra os tefritídeos em diferentes estágios de vida (Castillo et al., 2000; Ekesi et al., 2005; Almeida et al., 2007; Ali et al., 2008; Toledo et al., 2017; Soliman et al., 2020).

Diversas formas de aplicação têm sido empregadas para a utilização desses FEs, incluindo a pulverização, tratamento do solo e transmissão indireta por meio de vetores (Islam et al., 2021). Contudo, a transmissão indireta merece destaque, sendo objeto de estudo em todo o mundo, e evidências comprovam que certos fungos possuem a habilidade de disseminar esporos aos insetos receptores, resultando em altas taxas de mortalidade e comprometendo a capacidade reprodutiva em adultos infectados (Paradza et al., 2021; Gálvez et al., 2023).

Dada a crescente demanda por alternativas mais seguras e sustentáveis ao uso de pesticidas químicos, os FEs ganharam destaque como uma abordagem eficaz para o controle de insetos-praga. Portanto, a ampla adoção dos FEs no controle biológico é justificada pelas inúmeras vantagens que oferecem tornando-os uma valiosa ferramenta para o manejo integrado das moscas-das-frutas. O contínuo estudo e aprimoramento do uso dos FEs podem impulsionar ainda mais seu uso na fruticultura brasileira, especialmente no semiárido brasileiro.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKUTSE, K. S. et al. Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on the life-history parameters of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). **Fungal Ecology**, v. 6, n. 4, p. 293-301, 2013.
- ALI, A.; SERMANN, H.; BÜTTNER, C. Susceptibility of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v. 73, n. 3, p. 589-596, 2008.
- ALI, S.; HUANG, Z.; REN, S. Production of cuticle degrading enzymes by *Isaria fumosorosea* and their evaluation as a biocontrol agent against diamondback moth. **Journal of Pest Science**, v. 83, n. 4, p. 361-370, 2010.
- ALMEIDA, J. E. M et al. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi and nematode on medfly *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). **BioAssay**, v. 2, n. 7, p. 1-7, 2007.
- ARAÚJO, J. P. M.; HUGHES, D. P. Diversity of entomopathogenic fungi. which groups conquered the insect body? **Advances in Genetics**, v. 94, p. 1–39, 2016.
- BRIDGE, P. D. et al. Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. **Microbiology**, v. 139, n. 6, p. 1163-1169, 1993.
- BRUNNER-MENDOZA, C. et al. A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 83-102, 2019.
- CASTILLO, M.A. et al. Susceptibility of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extracts. **Biological Control**, v. 19, n. 3, p. 274-282, 2000.
- CHEN, W.H. et al. Species diversity of *Cordyceps*-like fungi in the Tiankeng Karst region of China. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 5, p. e01975-22, 2022.
- DANGI, N.; LIM, U.T. Identification and evaluation of a new entomopathogenic fungal strain against *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae) and its two egg parasitoids. **Plos One**, v. 13, n. 4, p. e0195848, 2018.
- DANNON, H. F. et al. Toward the efficient use of *Beauveria bassiana* in integrated cotton insect pest management. **Journal of Cotton Research**, v. 3, n. 1, p. 1-21, 2020.
- DE FARIA, M. R.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, n. 3, p. 237-256, 2007.
- DE ALMEIDA, L. B. M. et al. Diversity of fruit flies (Diptera: Tephritoidea) and their host plants in a conservation unit from midwestern Brazil. **Florida Entomologist**, v. 102, n. 3, p. 562-570, 2019.

DEL FAVA, E.; IORIATTI, C.; MELEGARO, A. Cost–benefit analysis of controlling the spotted wing drosophila (*Drosophila suzukii* (Matsumura)) spread and infestation of soft fruits in Trentino, Northern Italy. **Pest Management Science**, v. 73, n. 11, p. 2318-2327, 2017.

DESHPANDE, M. V. Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. **Critical reviews in microbiology**, v. 25, n. 3, p. 229-243, 1999.

DOTAONA, R. et al. Screening of tropical isolates of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) for virulence to the sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (Coleoptera: Brentidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 35, n. 4, p. 153–163, 2015.

EKESI, S. et al. Effect of soil application of different formulations of *Metarhizium anisopliae* on african tephritid fruit flies and their associated endoparasitoids. **Biological Control**, v. 35, n. 1, p. 83-91, 2005.

EKESI, S. et al. The role of entomopathogenic fungi in the integrated management of fruit flies (Diptera: Tephritidae) with emphasis on species occurring in Africa. **Use of entomopathogenic fungi in biological pest management**, p. 239-274, 2007.

ESSIEDU, J. A.; ADEPOJU, F. O.; IVANTSOVA, M. N. Benefits and limitations in using biopesticides: A review. **AIP Conference Proceedings**, v. 2313, n., 2020.

FANNING, P. D.; GRIESHP, M. J.; ISAACS, R. Efficacy of biopesticides on spotted wing *Drosophila*, *Drosophila suzukii* Matsumura in fall red raspberries. **Journal of Applied Entomology**, v. 142, n. 1–2, p. 26–32, 2018.

FENIBO, E. O.; IJOMA, G.N.; MATAMBO, T. Biopesticides in sustainable agriculture: A critical sustainable development driver governed by green chemistry principles. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 619058, 2021.

GÁLVEZ, C. et al. Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* spores using infected males and inoculation device: impact on survival and fecundity of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Phytoparasitica**, v. 51, n. 2, p. 263-272, 2023.

GANDARILLA-PACHECO, F.L. et al. Production of infectious units of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) from different indigenous isolates of northeastern Mexico using 3 propagation strategies. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 50, n. 1, p. 81-89, 2017.

GAVA, C.A.T. et al. Applying local entomopathogenic fungi strains to the soil can control *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) Wiedemann adults. **Biocontrol Science and Technology**, v. 30, n. 2, p. 103-115, 2020.

GAVA, C.A.T. et al. Impact of soil texture on conidia movement and residual effect of entomopathogenic fungi applied through irrigation to control fruit-fly pupae in mango orchards. **Biological Control**, v. 163, p. 104559, 2021.

GEBREMARIAM, A.; CHEKOL, Y.; ASSEFA, F. Phenotypic, molecular, and virulence characterization of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) Vuillemin, and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin from soil samples of Ethiopia for the development of mycoinsecticide. **Heliyon**, v. 7, n. 5, p. e07091, 2021.

GUILLEM-AMAT, A. et al. Field detection and predicted evolution of spinosad resistance in *Ceratitis capitata*. **Pest Management Science**, v. 76, n. 11, p. 3702-3710, 2020.

HAJEK, A. E. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. **Advances in Microbial Ecology**, v. 15, n. 1, p. 193–249, 1999.

HARTER, W. R. et al. Toxicities and residual effects of toxic baits containing spinosad or malathion to control the adult *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, v. 98, n. 1, p. 202-208, 2015.

HARRIS-SHULTZ, K. et al. Evaluation of strains of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* to control sugarcane aphids on grain sorghum. **Agrosystems, Geosciences & Environment**, v. 3, n. 1, p. e20047, 2020.

HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, C.; GUZMÁN-FRANCO, A. W. Species diversity and population dynamics of entomopathogenic fungal species in the genus *Metarhizium* a spatiotemporal study. **Microbial Ecology**, v. 74, n. 1, p. 194–206, 2017.

INGLIS, G. D. et al. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**. Wallingford UK: CABI publishing, p. 23-69, 2001.

ISLAM, W. et al. Insect-fungal-interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests. **Microbial Pathogenesis**, v. 159, p. 105122-105122, 2021.

JABER, L. R.; ENKERLI, J. Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth? **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 28-41, 2017.

JACKSON, M. A.; DUNLAP, C.A.; JARONSKI, S. T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. **BioControl**, v. 55, n. 1, p. 129–145, 2010.

JARONSKI, S. T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. **BioControl**, v. 55, n. 1, p. 159-185, 2010.

JARONSKI, S. T. Mass production of entomopathogenic fungi state of the art. **Mass production of beneficial organisms**, p. 317-357, 2023.

KAYA, H. K.; VEGA, F. E. Scope and basic principles of insect pathology. **Insect Pathology**, p. 1-12, 2012.

KEPLER, R. M. et al. A phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). **IMA Fungus**, v. 8, n.2, p. 335-353, 2017.

KLASSEN, W.; CURTIS, C. F.; HENDRICH, J. History of the sterile insect technique. In: **Sterile Insect Technique**. CRC Press, 2021. p. 1-44.

KLICK, J. et al. Reduced spray programs for *Drosophila suzukii* management in berry crops. **International Journal of Pest Management**, v. 62, n. 4, p. 368-377, 2016.

KUTALMIŞ, A. et al. Phylogenetic analysis and biocontrol potential of entomopathogenic fungi against *Tropinota* (= *Epicometis*) *hirta* (Poda) (Coleoptera: Cetoniidae) and the apple scab disease *Ventura inaequalis*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 33, n. 1, p. 1-12, 2023.

LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1-41, 2015.

LEACH, H. et al. Rapid harvest schedules and fruit removal as non-chemical approaches for managing spotted wing *Drosophila*. **Journal of Pest Science**, v. 91, n. 1, p. 219-226, 2018.

LITWIN, A.; NOWAK, M.; RÓŻALSKA, S. Entomopathogenic fungi: unconventional applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 19, n. 1, p. 23-42, 2020.

LOPES, R.S. et al. The potential of *Isaria* spp. as a bioinsecticide for the biological control of *Nasutitermes corniger*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 9, p. 1038-1048, 2017.

LORD, J. C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 89, n. 1, p. 19-29, 2005.

LOUZEIRO, L. R. F. et al. Incidence of *Frugivorous flies* (Tephritidae and Lonchaeidae), fruit losses and the dispersal of flies through the transportation of fresh fruit. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 24, n. 1, p. 50-60, 2021.

MANNINO, M. C. et al. Is the insect cuticle the only entry gate for fungal infection? Insights into alternative modes of action of entomopathogenic fungi. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 2, p. 33, 2019.

MANTZOUKAS, S.; ELIOPOULOS, P. A. Endophytic entomopathogenic fungi: A valuable biological control tool against plant pests. **Applied Sciences**, v. 10, n. 1, p. 360, 2020.

MASCARIN, G.M. et al. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 165, p. 46-53, 2019.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 1-26, 2016.

MCCRABY, K. W. Conservation biological control. **Encyclopedia of Entomology**, n. 2, p. 1021-1023, 2008.

MEIKLE, W. G. et al. A distributed delay routine-based simulation model of *Beauveria bassiana* conidial stability in response to environmental stressors. **BioControl**, v. 48, n. 5, p. 561-578, 2003.

MOLINA, C. A. et al. Selection of a *Bacillus pumilus* strain highly active against *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1320-1327, 2010.

MONGKOLSAMRIT, S. et al. Revisiting *Metarhizium* and the description of new species from Thailand. **Studies in Mycology**, v. 95, n. 1, p. 171–251, 2020.

MONTES, S. M. N. M.; RAGA, A. Eficácia de atrativos para monitoramento de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) em pomar de citros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 3, p. 317–323, 2006.

MORA, M. A. E.; CASTILHO, A. M. C.; FRAGA, M. E. Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, n. 0, p. 1-10, 2018.

ORESTE, M. et al. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Bals. -Criv.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (metschn.) sorokin against *Galleria mellonella* L. and *Tenebrio molitor* L. in laboratory assays. **Redia**, v. 95, p. 43–48, 2012.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. FAO. **FAOSTAT**. Divisão de estatística. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 20 junho. 2022.

PAL, S.; LEGER, R. J. St; WU, L. P. Fungal peptide destruxin a plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 12, p. 8969-8977, 2007.

PAPADOPOULOS, N. T. et al. Seasonal and annual occurrence of the mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in northern Greece. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 94, n. 1, p. 41-50, 2001.

PARANHOS, B. J; NAVA, D. E; MALAVASI, A. Biological control of fruit flies in Brazil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 54, n. e26037, p. 1- 13, 2019.

PARADZA, V. M. et al. Virulence and horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* by the adults of the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) and the efficacy of oil formulations against its nymphs. **Heliyon**, v. 7, n. 11, p. e08277, 2021.

PARRA, J. R. et al. Controle Biológico: **Terminologia. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, p. 1-16, 2002.

PATEL, T.K. *Metarhizium*. In: **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**. Academic Press, p. 593-610, 2020.

PEDRINI, N.; CRESPO, R.; JUÁREZ, M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 124-137, 2007.

SAMSON, R.A. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. **Studies Mycology**, p.1 119, 1974.

SCOLARI, F. et al. Tephritid fruit fly semiochemicals: Current knowledge and future perspectives. **Insects**, v. 12, n. 5, p. 408, 2021.

SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 5, p. 413-423, 2003.

SHARMA, R.; SHARMA, P. Fungal entomopathogens: a systematic review. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 1, p. 1-13, 2021.

SHARMA, A.; SHARMA, S.; YADAV, P. K. Entomopathogenic fungi and their relevance in sustainable agriculture: A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 9, n. 1, p. 2180857, 2023.

SHAURUB, E.S. H. Review of entomopathogenic fungi and nematodes as biological control agents of tephritid fruit flies: current status and a future vision. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 171, n. 1, p. 17-34, 2023.

SILVA, A. C. L. et al. Endophytic colonization of tomato plants by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for controlling the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. **CABI Agriculture and Bioscience**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2020.

SOLIMAN, N. A. et al. Pathogenicity of three entomopathogenic fungi against the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 1, p. 1-8, 2020.

SINNO, M. et al. Selection of endophytic *Beauveria bassiana* as a dual biocontrol agent of tomato pathogens and pests. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1242, 2021.

TOLEDO, J. et al. Pathogenicity of three formulations of *Beauveria bassiana* and efficacy of autoinoculation devices and sterile fruit fly males for dissemination of conidia for the control of *Ceratitis capitata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 164, n. 3, p. 340-349, 2017.

VEGA, F. E. et al. Fungal entomopathogens, Second Edi. ed. **Insect Pathology**, p. 171-220, 2012.

VONTAS, J. et al. Insecticide resistance in tephritid flies. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 100, n. 3, p. 199-205, 2011.

WANG, W. et al. Development of *Cordyceps javanica* BE01 with enhanced virulence against *Hyphantria cunea* using polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 972425, 2022.

ZACHARUK, R. Y. Fine structure of the fungus *Metarrhizium anisopliae* infecting three species of larval *Elateridae* (Coleoptera). II. Dormant and germinating conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 15, n. 1, p. 63-80, 1970.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 553-596, 2007.

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 9, p. 865-901, 2008.

CAPÍTULO II - PATOGENICIDADE DE FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS SOBRE ADULTOS DE *Ceratitis capitata* (WIEDEMANN) (DIPTERA: TEPHRITIDAE), EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

RESUMO

Ceratitis capitata (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) é uma das principais pragas da fruticultura mundial, causando danos diretos e indiretos que afetam diversas frutíferas. O uso dos fungos entomopatogênicos (FEs), é uma alternativa promissora dentro do controle biológico de pragas. Recentemente vários estudos estão sendo realizados para avaliar a eficiência dos entomopatógenos no controle de moscas-das-frutas. Neste trabalho se avaliou o potencial de quatro fungos entomopatogênicos sobre adultos de *C. capitata*, mediante duas formas de exposição (inoculação tópica e pela alimentação), em condições de laboratório. Os tratamentos avaliados foram *Beauveria bassiana* com concentração de 2×10^9 UFC/mL, *Cordyceps fumosorosea* 3×10^9 UFC/mL, *Cordyceps javanica* 1×10^{10} UFC/mL, *Metarhizium anisopliae* 6×10^8 UFC/mL e água destilada esterilizada como controle. Cada tratamento foi composto por 20 repetições, sendo cada mosca (3 a 5 dias de idade) uma repetição. A aplicação tópica foi realizada em adultos (previamente anestesiados a frio), com 1 µl de cada suspensão fúngica, aplicadas no dorso da mosca. Foram avaliadas duas doses (0,5 e 1,0 L ou Kg. ha⁻¹). No método pela alimentação as moscas passaram 12 horas sem alimentação antes de iniciar o bioensaio. A dieta de alimentação foi misturada com os conídios dos tratamentos, em duas proporções (1:1 e 1:2), permanecendo dentro das gaiolas por 48 horas. Em seguida, as moscas de ambos experimentos, foram transferidas para gaiolas plásticas (25,5 x 25 x 12 cm), com alimento e água *ad libitum*, e acondicionadas em câmaras BOD (temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de $65 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas). A mortalidade das moscas foi registrada diariamente por 21 dias. Os exemplares mortos foram acomodados em placas de Petri (5 x 1cm), sobre papel filtro e um pedaço de algodão umedecido e colocados em câmaras BOD. Ao final das avaliações no método pela inoculação tópica constatou-se, que a maior mortalidade foi para *M. anisopliae* com mortalidades de 75% e 90% nas duas doses testadas, respectivamente. O menor valor de tempo letal médio (TL₅₀) foi para *M. anisopliae* (3,52 e 3,55 dias). Por outro lado, no método pela alimentação *C. javanica* alcançou mortalidades de 95% para ambas proporções testadas e com um TL₅₀ de 5,86 e 5,95 dias. *Beauveria bassiana*, apresentou um aumento de mortalidade na proporção maior (1:2), atingindo uma mortalidade de 70% e um TL₅₀ de 3,72 dias, porém as moscas mortas deste tratamento, não apresentaram sinal de micose. Estes resultados sugerem que *M. anisopliae*, *C. javanica* e *B. bassiana* apresentam potencial de uso para o controle de *C. capitata*.

Palavras chaves: Moscas-das-frutas. Controle microbiano. Micose. Mortalidade

CHAPTER II - PATHOGENICITY OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS ON ADULTS OF *Ceratitis capitata* (WIEDEMANN) (DIPTERA: TEPHRITIDAE), UNDER LABORATORY CONDITIONS

ABSTRACT

Ceratitis capitata (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) is one of the main pests of fruit growing worldwide, causing direct and indirect damage affecting several fruit trees. The use of entomopathogenic fungi (EPFs) is a promising alternative within the biological control of pests. Recently, several studies are being conducted to evaluate the efficiency of entomopathogens in the control of fruit flies. In this work, the potential of four entomopathogenic fungi on adults of *C. capitata* was evaluated, through two forms of exposure (topical inoculation and feeding), under laboratory conditions. The treatments evaluated were *Beauveria bassiana* with a concentration of 2×10^9 CFU/mL, *Cordyceps fumosorosea* 3×10^9 CFU/mL, *Cordyceps javanica* 1×10^{10} CFU/mL, *Metarhizium anisopliae* 6×10^8 CFU/mL and sterilized distilled water as control. Each treatment consisted of 20 replicates, each fly (3 to 5 days old) being a replicate. The topical application was performed on adults (previously cold anesthetized), with 1 μ L of each fungal suspension, applied on the back of the fly. Two doses were evaluated (0.5 and 1.0 L or Kg. ha⁻¹). In the feeding method, the flies spent 12 hours without food before starting the bioassay. The feeding diet was mixed with the conidia of the treatments, in two proportions (1:1 and 1:2), remaining inside the cages for 48 hours. Then, the flies from both experiments were transferred to plastic cages (25.5 x 25 x 12 cm), with food and water *ad libitum*, and placed in BOD chambers (temperature $25 \pm 1^\circ\text{C}$, humidity $65 \pm 10\%$ and 12-hour photophase). Fly mortality was recorded daily for 21 days. The dead specimens were placed in Petri dishes (5 x 1 cm), on filter paper and a piece of moistened cotton and placed in BOD chambers. At the end of the evaluations in the method by topical inoculation, it was found that the highest mortality was for *M. anisopliae* with mortalities of 75% and 90% in the two doses tested, respectively. The lowest value of mean lethal time (TL₅₀) was for *M. anisopliae* (3.52 and 3.55 days). On the other hand, in the feeding method *C. javanica* reached mortalities of 95% for both proportions tested and with a TL₅₀ of 5.86 and 5.95 days. *Beauveria bassiana*, showed an increase in mortality in the higher proportion (1:2), reaching a mortality of 70% and a TL₅₀ of 3.72 days, but the dead flies of this treatment did not show signs of mycosis. These results suggest that *M. anisopliae*, *C. javanica* and *B. bassiana* have potential use for the control of *C. capitata*.

Key words: Fruit flies. Microbial control. Mycosis. Mortality.

1. INTRODUÇÃO

Ceratitis capitata (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) é uma das principais pragas da fruticultura mundial, ocasionando prejuízos e perdas significativas na produção e comercialização de frutas *in natura* (White; Elson-Harris, 1992; Liquido et al., 2020). Por ser uma praga altamente destrutiva, a regulação populacional de *C. capitata* é realizada principalmente por meio do uso de inseticidas (Baronio et al., 2019; Guillem-Amat et al., 2020). No entanto, o uso abusivo dos inseticidas pode ocasionar o acúmulo de resíduos nas frutas, provocando a rejeição desses frutos no mercado internacional (Hallman; Quinlan, 1996).

Nos últimos anos, o mercado internacional tem se tornado mais exigente em relação à produção de frutas, visando garantir a segurança alimentar. Essa crescente demanda tem resultado em restrições cada vez maiores ao uso do controle químico (Paranhos; Nava; Malavasi, 2019). Nesse contexto, o controle biológico e o uso de biopesticidas têm surgido como ferramentas viáveis para atender a essas exigências fitossanitárias impostas pelos mercados (Garcia et al., 2020; Di Ilio; Cristofaro, 2021).

Os biopesticidas são agentes de controle de pragas agrícolas baseados em substâncias naturais ou organismos vivos (Marutescu et al., 2017), sendo considerados inseticidas de origem biológica que possuem compostos ativos, como derivados de plantas (botânicos), metabólitos secundários (antibióticos), microalgas e os microrganismos entomopatogênicos (Copping; Menn, 2000; Costa et al., 2019; Ayilara et al., 2023). Estes últimos, conhecidos como biopesticidas microbianos, englobam fungos, bactérias, vírus, protozoários e nematoides como princípios ativos (Kachhawa, 2017; Faria et al., 2023).

Dentre os biopesticidas microbianos, os fungos entomopatogênicos (FEs) são os mais utilizados na agricultura, ocorrendo naturalmente e sendo onipresentes em diversos ambientes, como os solos (Barta et al., 2010). Esses FEs possuem a notável capacidade de causar infecções e, conseqüentemente, provocar a morte de insetos-praga (Behie; Bidochka, 2014).

Os FEs surgem como ferramentas de controle altamente sustentáveis contra populações de mosca-das-frutas, representando uma medida de biocontrole promissora, especialmente quando aplicada em sistemas de manejo integrado dessa praga (Shaurub, 2022). A patogenicidade dos FEs tem sido comprovada em diferentes espécies de tefritídeos, como *Bactrocera zonata* Saunders (Diptera:Tephritidae) (Mahmoud, 2009 ; Murtaza et al., 2022), *Bactrocera cucurbitae* Coquillett (Diptera:Tephritidae) (Hamzah et al., 2021),

Bactrocera tryoni Froggatt (Diptera:Tephritidae) (McGuire; Edwards; Northfield, 2023), *Bactrocera dorsalis* Hendel (Diptera:Tephritidae) (Faye et al., 2021) e *Anastrepha fraterculus* Loew (Diptera:Tephritidae) (De Lima Silva, 2022).

Ainda há uma quantidade limitada de pesquisas que abordam o controle de adultos de *C. capitata* utilizando FEs. Mas estes estudos têm explorado diferentes abordagens, como o uso de isolados nativos ou cepas comerciais, bem como diversas formas de exposição (Konstantopoulou; Mazomenos, 2005; Quesada-Moraga; Ruiz-García; Santiago-Álvarez, 2006; Qazzaz et al., 2015; Soliman et al., 2020; Hallouti et al., 2021).

Além da virulência sobre *C. capitata*, os FEs também demonstram capacidade de serem fontes de disseminação (Hallouti et al., 2021), o que depende das técnicas de aplicação e das características de qualidade, como a viabilidade dos conídios (Toledo et al., 2007). Nesse contexto, o potencial de utilização dos FEs no controle de tefritídeos tem sido objeto de estudo em diversas partes do mundo, assim como as estratégias e métodos de aplicação, tais como pulverizações, iscas tóxicas e transmissão horizontal (Paranhos; Nava; Malavasi, 2019; Ramírez e Ramírez et al., 2022).

Assim sendo, diante da escassez de informações sobre o uso de FEs para o controle de *C. capitata* e da ausência de bioinseticidas à base de FEs registrados para tefritídeos no Brasil, torna-se essencial realizar estudos e explorar essa alternativa ecológica para o controle biológico dessas mosca-das-frutas. Diante desse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade de quatro FEs em adultos de *C. capitata*, por meio de diferentes métodos de exposição em condições de laboratório.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do estudo

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Entomologia Aplicada/Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró RN, Brasil durante os meses de agosto de 2022 a março de 2023.

2.2. Criação de *Ceratitis capitata*

Os insetos eram mantidos em salas climatizadas (temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas). Os indivíduos utilizados em todos os experimentos foram provenientes dessa criação. As moscas eram mantidas em gaiolas plásticas semitransparentes (27,6 x 33,1 x 48,7 cm) (SANREMO®, 29L), com uma das faces revestida por tecido voile, onde as fêmeas realizavam a postura. Na lateral da gaiola havia uma tela em forma de manga para o manuseio. Dentro da gaiola foi colocado um recipiente (14 x 9 cm), contendo a alimentação e uma garrafa plástica de 250 ml com fita absorvente (Spontex®) que servia de bebedouro de água para os adultos.

A alimentação das moscas consistia em uma dieta composta por levedura de cerveja e açúcar na proporção de 1:4. No exterior da gaiola, na parte frontal, logo abaixo do tecido voile para oviposição, era colocado bandejas plásticas contendo água para o recolhimento dos ovos. A coleta de ovos era realizada diariamente. Os ovos eram transferidos para uma dieta artificial, baseada na dieta descrita por Albajes e Santiago Álvarez (1980), onde as larvas eclodiam e se desenvolviam. Após alcançar o 3º instar, as larvas saíam da dieta e pupavam no fundo do recipiente. Em seguida os pupários eram recolhidos e transferidos para recipientes de plástico (15 x 15 x 9,5 cm), onde permaneciam até emergência dos adultos, que posteriormente eram liberados nas gaiolas de criação, para manter as populações.

2.3. Fungos entomopatogênicos (FEs) utilizados nos bioensaios

A dose menor utilizada neste estudo, foi determinada tendo como base as dosagens de bulas dos produtos usadas para o controle de outras pragas e em registrados de outros países para o controle dos tefritídeos (Tabela 1). Foi utilizada a dose menor e o dobro da dose. O tratamento testemunha foi constituído por água destilada esterilizada. Os produtos foram preservados em geladeira a uma temperatura de 4°C . Se usou um padrão de volume de água de $500. \text{ha}^{-1}$, para as diluições dos produtos se usou água destilada esterilizada.

Tabela 1. Fungos entomopatogênicos e doses usadas nos bioensaios.

Fungos/Cepas	Concentrações	Doses utilizadas
<i>Beauveria bassiana</i> Simbi BB15	(2×10^9 UFC/mL)	0,5 – 1,0 L. Ha ⁻¹
<i>Cordyceps fumosorosea</i> ESALQ 4778	(3×10^9 UFC/mL)	0,5 – 1,0 L. Ha ⁻¹
<i>Cordyceps javanica</i> BRM 27666	(1×10^{10} UFC/mL)	0,5 – 1,0 Kg. Ha ⁻¹
<i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB 425	(6×10^8 UFC/mL)	0,5 – 1,0 L. Ha ⁻¹

2.4. Testes de patogenicidade de fungos entomopatogênicos (FEs) sobre adultos de *Ceratitis capitata*

2.4.1. Método por inoculação tópica

A metodologia utilizada teve como base a realizada por Quesada- Moraga; Ruiz-García; Santiago-Álvarez. (2006). As moscas (com três a cinco dias de idade) foram anestesiadas por 1 min no frio (-21°C) e em seguida foi realizada a aplicação tópica dos tratamentos no dorso da mosca. As aplicações foram realizadas com auxílio de uma micropipeta, onde um volume de 1µl das suspensões fúngicas e o tratamentos testemunha foi aplicado em cada inseto. Foram avaliadas duas concentrações (0,5 ml ou g/500ml de água e 1,0 ml ou g/500ml de água) para cada FEs. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e 20 repetições, sendo cada mosca uma repetição.

Após as aplicações, as moscas foram transferidas para gaiolas plásticas (25,5 x 25 x 12 cm), cobertas com tecido voile, que foram acondicionadas em câmaras BOD (temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de $65 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas). Durante o período que permaneceram vivas foi disponibilizado para as moscas água e alimento *ad libitum*. A mortalidade foi avaliada diariamente por um período de 21 dias pós a aplicação. Cada mosca que morria era individualizada em uma placa de Petri (5 x 1cm), sobre papel filtro e junto a uma pequena porção de algodão umedecido, que em seguida era fechada com papel filme e acomodadas em câmara B.O.D (temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de $65 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas), para favorecer o desenvolvimento e esporulação dos fungos. A identificação dos fungos foi baseada nas características morfológicas e com a inspeção das estruturas com ajuda de um microscópio (Quesada-Moraga; Ruiz-García; Santiago-Álvarez, 2006).

2.4.2. Método pela alimentação

O método por alimentação foi baseado nas metodologias utilizadas por Konstantopoulou; Mazomenos, (2005), Beris et al. (2013) e Qazzaz et al. (2015). Neste bioensaio, a dieta utilizada para a alimentação das moscas adultas, foi contaminada com as suspensões dos fungos e fornecidas para elas. As moscas (com três a cinco dias de idade) foram colocadas em gaiolas plásticas (25,5 x 25 x 12 cm) como descrito anteriormente. Antes de realizar o bioensaio as moscas passaram 12 horas sem alimentação. A dieta foi misturada com as suspensões fúngicas em duas proporções (1:1 e 1:2) respectivamente. Para o controle a mistura foi feita com água destilada esterilizada. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e 20 repetições, sendo cada mosca uma repetição.

A mistura foi pincelada em discos de papel filtro (19,63cm²) e colocados em placas pequenas (5 x 1cm), que foram disponibilizadas dentro das gaiolas por 48 horas. Após esse período, as placas com o alimento foram retiradas das gaiolas e substituídas pela dieta padrão e água. A mortalidade foi verificada por 21 dias, e as moscas que morriam eram retiradas das gaiolas e colocadas em placas de Petri (5 x 1cm) sobre papel filtro e junto a um pedaço de algodão úmido, em seguida acondicionadas em câmaras tipo B.O.D (temperatura de 25 ± 1°C, umidade de 65 ± 10% e fotofase de 12 horas). Diariamente as moscas eram vistoriadas para se verificar a presença ou não de esporulações típicas dos fungos avaliados.

2.5. Variáveis analisadas

- A mortalidade total (%) foi analisada considerando dois parâmetros: a mortalidade dos adultos que apresentaram esporulação (sinal de micélio) e a mortalidade daqueles sem esporulação.
- Tempo letal médio (LT50) (dias)

2.6. Análises estatísticas

As diferenças nas taxas de mortalidade foram avaliadas usando o teste Exato de Fisher, e o Teste post-hoc de Fisher foi aplicado para comparação de proporções. Todas as análises foram consideradas significativas com um nível de probabilidade de 5%.

Para determinar os tempos letais médios de mortalidade (TL₅₀) foi empregada a análise de Probit (Finney, 1971). Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software estatístico R (2020).

3. RESULTADOS

3.1. Método por inoculação tópica

No bioensaio por inoculação tópica sobre adultos de *C. capitata*, *M. anisopliae* causou as maiores porcentagens de mortalidade com esporulação, apresentando uma variação de 75 a 90% nas duas doses testadas (0,5 e 1,0 Kg ou L. ha⁻¹), respectivamente, diferindo do tratamento controle ($p<0,05$). Ao analisar a mortalidade das moscas sem desenvolvimento de esporulação, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos na dose menor ($p>0,05$). No entanto, na dose maior, *C. fumosorosea* alcançou 35% de mortalidade, e diferiu do controle ($p<0,05$). Para a mortalidade total *M. anisopliae* foi o único tratamento que diferiu do tratamento controle ($p<0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Mortalidade de adultos de *Ceratitis capitata*, expostos a fungos entomopatogênicos pelo método de inoculação tópica.

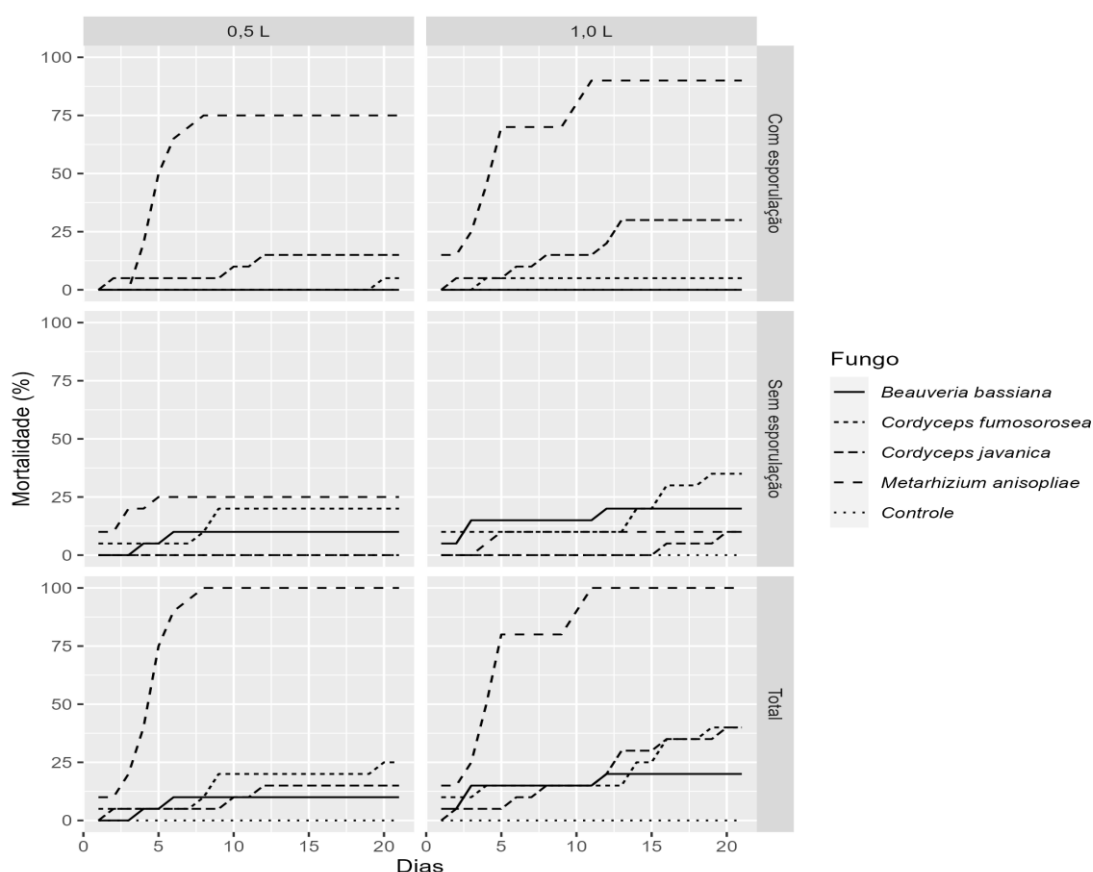
Dose testada	Fungo (UFC/mL)	Mortalidade com esporulação (%)	Mortalidade sem esporulação (%)	Mortalidade total (%)
0,5	<i>B. bassiana</i> (2x10 ⁹)	0 c	10 a	10 bc
	<i>C. fumosorosea</i> (3x10 ⁹)	5 bc	20 a	25 bc
	<i>C. javanica</i> (1x10 ¹⁰)	15 bc	0 ab	15 bc
	<i>M. anisopliae</i> (6x10 ⁸)	75 a	25 a	100 a
	Controle	0 c	0 ab	0 c
	p	<0,001	<0,05	<0,001
1,0	<i>B. bassiana</i> (2x10 ⁹)	0 c	20 ab	20 bc
	<i>C. fumosorosea</i> (3x10 ⁹)	5 bc	35 a	40 bc
	<i>C. javanica</i> (1x10 ¹⁰)	30 ab	10 ab	40 bc
	<i>M. anisopliae</i> (6x10 ⁸)	90 a	10 ab	100 a
	Controle	0 c	0 b	0 c
	p	<0,001	0,095	<0,001

Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa de acordo com o teste Exato de Fisher ($p<0,05$).

O tempo letal médio (TL₅₀) foi possível determinar apenas para o tratamento com *M. anisopliae*, devido à baixa mortalidade observada nos demais tratamentos, que ficou abaixo de 50%. Nos exemplares que apresentaram sinal de esporulação nas duas doses testadas, os valores obtidos de (TL₅₀) variaram entre 3,52 e 3,55 dias, respectivamente. Esses resultados indicam que o *M. anisopliae* demonstrou maior eficácia no controle dos insetos, com uma ação mais rápida e letal.

Ao longo do tempo de avaliação, observou-se que apenas *M. anisopliae* alcançou uma mortalidade total de 100% nas duas doses testadas. Na dose menor (0,5 Kg ou L. ha⁻¹), esse fungo apresentou uma mortalidade com presença de esporulação de 75% nos primeiros 8 dias avaliados (Figura 1). Na dose maior (1,0 Kg ou L. ha ha⁻¹), *M. anisopliae* demonstrou níveis crescentes de mortalidade com esporulação, chegando a cerca de 70% nos primeiros 5 dias avaliados, e posteriormente, por volta dos 11 dias de avaliação, alcançou uma mortalidade de 90% nas moscas com sinal de esporulação (Figura 1).

Figura 1. Curvas de mortalidade de adultos de *Ceratitis capitata*, expostos a fungos entomopatogênicos pelo método de inoculação tópica.



No caso do fungo *C. javanica*, foi observado um aumento na mortalidade conforme a dose aumentava, alcançando 30% nas moscas com esporulação durante os primeiros 13 dias após a inoculação e mantendo-se constante até o final das avaliações. Em relação ao fungo *C. fumosorosea*, na dose menor, registrou-se uma mortalidade com esporulação de apenas 5%, mantendo-se estável até o final do bioensaio. Já na dose maior, a mortalidade atingiu 35%, mas sem a presença de esporulação nos últimos dias avaliados (dia 19).

No tratamento com *B. bassiana*, não foi observada nenhuma mortalidade com sinal de esporulação nas duas doses testadas. Na dose maior, apenas 20% de mortalidade sem esporulação foi alcançada durante os primeiros 12 dias após a inoculação. O tratamento controle manteve a população inicial de moscas, ao longo dos 21 dias de avaliação (Figura 1).

3.2. Método pela alimentação

No bioensaio pela alimentação, as maiores mortalidades com esporulação foram observadas nas moscas alimentadas com a dieta contendo conídios de *C. javanica*, alcançando mortalidades de até 95%, diferindo estatisticamente do tratamento controle para as duas proporções que foram testadas ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Mortalidade de adultos de *Ceratitis capitata*, após alimentação com dieta contaminada com suspensões de fungos entomopatogênicos em duas proporções.

Proporção	Fungo (UFC/mL)	Mortalidade com esporulação (%)	Mortalidade sem esporulação (%)	Mortalidade total (%)
1:1	<i>B. bassiana</i> (2×10^9)	15 bc	35 ab	50 a
	<i>C. fumosorosea</i> (3×10^9)	0 b	45 a	45 a
	<i>C. javanica</i> (1×10^{10})	95 a	5 bc	100 a
	<i>M. anisopliae</i> (6×10^8)	50 ac	0 c	50 a
	Controle	0 b	0 c	0 b
	p	<0,001	<0,001	<0,001
1:2	<i>B. bassiana</i> (2×10^9)	5 b	70 a	75 a
	<i>C. fumosorosea</i> (3×10^9)	5 b	15 b	20 bc
	<i>C. javanica</i> (1×10^{10})	95 a	5 b	100 a
	<i>M. anisopliae</i> (6×10^8)	45 a	10 b	55 ab
	Controle	0 b	0 b	0 c
	p	<0,001	<0,001	<0,001

Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa de acordo com o Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

O fungo *B. bassiana* apresentou um notável aumento na mortalidade quando aplicado na proporção maior 1:2, atingindo 70% de mortalidade. No entanto, é importante ressaltar que as moscas mortas não apresentaram desenvolvimento de esporulação. Esse resultado apresentou diferenças estatísticas quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Os menores valores médios de tempo letal (TL_{50}), para a mortalidade total (com esporulação e sem esporulação) de *C. capitata* foram observados para *B. bassiana* na proporção 1:2 com 3,72 dias, seguido do tratamento *C. javanica* que apresentou valores de

5,86 a 5,95 dias nas duas proporções 1:1 e 1:2, respectivamente. *M. anisopliae* atingiu valores mais altos, variando de 16,27 e 15,16 dias de acordo com a proporção testada (Tabela 4).

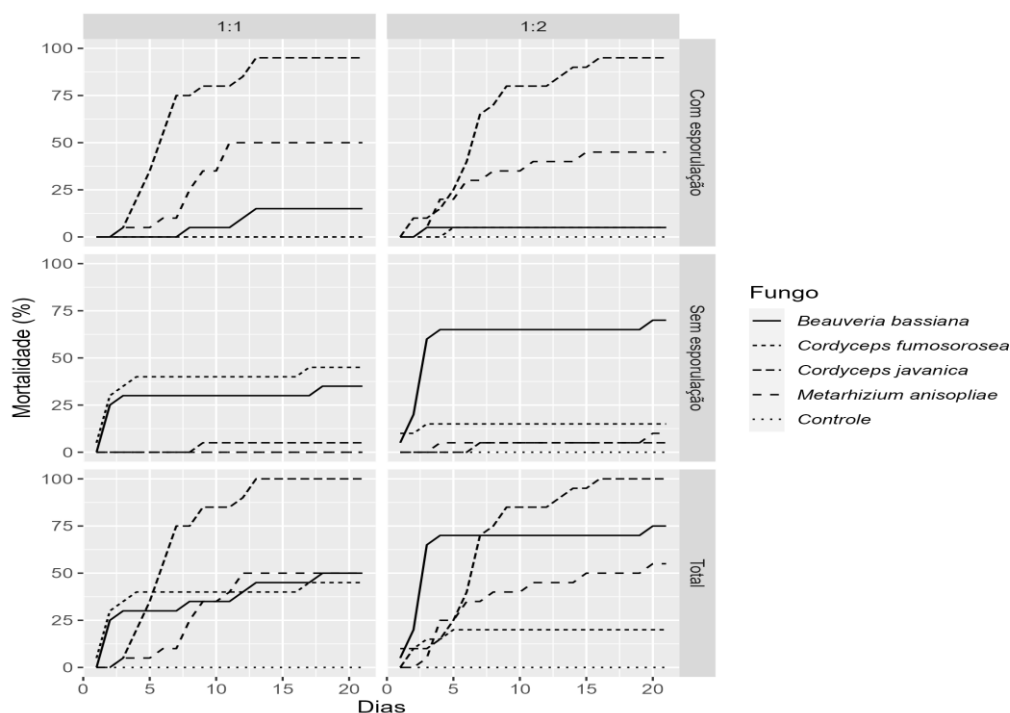
Tabela 4. Tempo letal médio (TL₅₀) (dias) da mortalidade de *Ceratitis capitata* expostos a fungos entomopatogênicos misturados com dieta de alimentação, em duas proporções.

Fungo (UFC/mL)	TL ₅₀ e IC (dias) ¹ 1:1	TL ₅₀ e IC (dias) ¹ 1:2
<i>B. bassiana</i> (2x10 ⁹)	20,33 (14,36 - 39,70)	3,72 (2,16 - 5,12)
<i>C. fumosorosea</i> (3x10 ⁹)	-	-
<i>C. javanica</i> (1x10 ¹⁰)	5,86 (5,30 - 6,39)	5,95 (5,31 - 6,55)
<i>M. anisopliae</i> (6x10 ⁸)	16,27 (14,19 - 19,52)	15,16 (12,55 - 19,59)

¹TL₅₀= Tempo Letal médio/ IC = Intervalo de Confiança a 5% de probabilidade de erro.

Ao longo do período de avaliação, os resultados demonstraram que o método de alimentação com *C. javanica* nas duas proporções testadas apresentou a maior taxa de mortalidade com esporulação. Durante os primeiros nove dias, a mortalidade atingiu 80%, e essa tendência continuou a aumentar nas avaliações dos dias 13 e 16, chegando a 95% em ambas as doses testadas (Figura 2).

Figura 2. Curvas de mortalidade de adultos de *Ceratitis capitata*, após alimentação com dieta contaminada com suspensões de fungos entomopatogênicos em duas proporções.



Por outro lado, *M. anisopliae* atingiu mortalidades com esporulação de 50% e 45% nas duas proporções testadas, alcançando esses valores aos 11 e 15 dias de avaliação, respectivamente, e mantendo-se constantes até o final do período avaliado. Por sua vez, *B. bassiana* mostrou maiores níveis de mortalidade sem presença de esporulação na proporção maior 1:2, chegando a 70% nos primeiros 10 dias de avaliação. No entanto, na proporção menor, observou-se uma mortalidade de apenas 35%, alcançada já no final das avaliações (dia 18) (Figura 2).

C. fumosorosea apresentou uma taxa de mortalidade com esporulação de apenas 5% na proporção 1:2 aos 5 dias de avaliação, mantendo-se nesse valor até o final do bioensaio. Já ao avaliar a mortalidade sem esporulação nas duas proporções testadas, a proporção 1:1 apresentou a maior taxa de mortalidade, alcançando 40% nos primeiros 4 dias de avaliação e aumentando para 45% aos 17 dias. Em contraste, o tratamento controle não registrou nenhuma mortalidade nas duas proporções testadas (Figura 2).

4. DISCUSSÃO

A elevada mortalidade de adultos de *C. capitata* ocasionada pela inoculação tópica de *M. anisopliae* (6×10^8 UFC/mL) nas duas doses testadas no presente estudo, também foi observada por outros autores avaliando diferentes cepas e concentrações deste fungo. Assim, Castillo et al. (2000) relataram uma mortalidade de 90% de *C. capitata* com a cepa CECT 2952. Quesada-Moraga; Ruiz-García; Santiago-Alvarez. (2006) constataram uma mortalidade de 95% de *C. capitata* com a cepa EAMa 01/58-SU. É possível inferir com esses resultados que *M. anisopliae* pode ocasionar uma mortalidade acentuada em adultos de *C. capitata* quando aplicado de forma tópica, dependendo da cepa e concentração aplicada.

As altas taxas de patogenicidade ocasionadas por *M. anisopliae*, pode ser devido a característica de produzir metabólitos secundários (Skrobek; Shah; Butt, 2008). As destruxinas são um dos principais metabólitos secundários de *M. anisopliae* (Vey et al., 2001), existindo precedentes de ter uma alta atividade inseticida que já foi comprovado em moscas-das-frutas como *Bactrocera olea* Gmelin (Diptera: Tephritidae) (Yousef et al., 2013), *C. capitata* (Lozano-Tovar., 2015) e *Anastrepha obliqua* Macquart (Diptera: Tephritidae) (Lozano-Tovar et al., 2023). As destruxinas causam a destruição das mitocôndrias, o que vai provocar a anulação da reação imunológica na hemolinfa, através da redução da secreção de fluidos dos tubos de Malpighi (Mustafa; Kaur, 2013).

A alta virulência apresentada pelo fungo *M. anisopliae* (6×10^8 UFC/mL) nestes bioensaios pode ser atribuída à sua concentração utilizada. Por outro lado, os fungos *B. bassiana* e *C. fumosorosea* tiveram concentrações maiores (2×10^9 e 3×10^9 , respectivamente), corroborando com os encontrados por Soliman et al. (2014) que demonstrou a virulência de *M. anisopliae* mesmo em concentrações menores ($2,3 \times 10^7$ UFC/mL) em diferentes estágios de *C. capitata*. Esses resultados diferem dos verificados por Khlaywi et al. (2014), indicando que maiores concentrações de conídios de *M. anisopliae* resultam em maiores taxas de mortalidade.

O tratamento com *C. javanica* resultou em níveis de mortalidade total de *C. capitata* inferiores a 40% quando as moscas foram expostas topicamente. Estes são os primeiros relatos da patogenicidade de *C. javanica* sobre adultos de *C. capitata*, no Brasil. Existem relatos confirmando a susceptibilidade de *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae) ao *C. javanica*, testada a uma concentração de $1,6 \times 10^4$. Essa cepa mostrou ser a mais virulenta quando comparada com *B. bassiana* e *M. anisopliae* para essa espécie, através do método de pulverização (Gutierrez-Palomares et al., 2021).

A baixa mortalidade proporcionada por *C. javanica* neste estudo, possivelmente está associada à baixa concentração que apresenta o fungo (1×10^{10}). Nesse contexto, os níveis de metabólitos secundários presentes no fungo, como a emerigelina e fumosorinoma, podem não ter sido suficientes para alcançar altos índices de mortalidade (Lin et al., 2019).

O tratamento com *C. fumosorosea* apresentou baixos níveis de mortalidade, independentemente da dose testada. Essa baixa eficácia é consistente com resultados obtidos por Ali, Sermann e Büttner. (2008), que relataram uma mortalidade de 7,5% na concentração de 3×10^4 , uma concentração semelhante à nossa. De acordo com Lacey, Fransen e Carruthers. (1996), *C. fumosorosea* já foi relatada infectando espécies da ordem diptera. No entanto, com base em nossos resultados, *C. capitata* não é um hospedeiro adequado para este fungo. Esse comportamento foi verificado anteriormente por Castillo et al. (2000), que avaliou esse fungo com o isolado CECT 2706 e obteve eficácias inferiores a 10%.

O tratamento com as doses de *B. bassiana* estudadas resultou em uma baixa mortalidade em *C. capitata*. No entanto, Quesada-Moraga, Ruiz-García e Santiago-Álvarez. (2006) avaliaram a patogenicidade de dez isolados de *B. bassiana* sobre *C. capitata* e relataram uma mortalidade com presença de esporulação variando de 38% a 100% através da inoculação tópica no dorso das moscas. Esses resultados também foram observados por Hallouti et al. (2021) ao utilizar o método de contato, verificando mortalidades superiores a 91% em adultos de 3 dias de idade de *C. capitata* com dois isolados nativos de *B. bassiana* (NS10 e OS1) na concentração de 1×10^7 . Resultados semelhantes foram obtidos em outras espécies de tefritídeos, como *B. dorsalis* com uma mortalidade de 99% (Marri et al., 2016) e *Rhagoletis indifferens* Curran (Diptera: Tephritidae), com uma mortalidade de 100% após receber uma aplicação tópica de 1 μ l de solução da cepa CX-10282 (Yee, 2020).

Os valores de tempo letal médio (TL_{50}) obtidos para *M. anisopliae* nas duas doses testadas, foram próximos aos obtidos por Quesada-Moraga; Ruiz-García; Santiago-Alvarez. (2006), apresentando valores de 5,1 e 5,3 dias, quando inocularam *C. capitata* com a cepa EAMa 01/58-Su, a duas concentrações diferentes 1×10^7 e 1×10^8 , respectivamente.

As baixas taxas de mortalidade que apresentaram alguns tratamentos nas duas doses testadas, provavelmente é devido à variação genética que apresentam as cepas (Leger et al. 1889). Essa variação pode influenciar no processo infeccioso sobre o hospedeiro, afetando as secreções dos conídios durante a adesão na cutícula do inseto e consequentemente na germinação e na penetração do apressório nas camadas internas (Leger et al., 1992).

Além disso, existe uma complexa interação entre células antimicrobianas que geralmente se encontram secretadas na cutícula do hospedeiro, durante a fixação ou

germinação do conídio (Barreto et al., 2016). Outro fator que favorece a inativação destes conídios, são os agentes de estresse abiótico como: as baixas umidades, altas temperaturas e a exposição UV (Fernández-Bravo et al., 2016; Mannico; Pedrini; Paixao, 2019). As estratégias na formulação dos produtos, poderiam melhorar os níveis de mortalidade, aumentando a tolerância a essa resistência genética das cepas (Paixao et al., 2017). Por exemplo, os FEs possuem maior capacidade de resistência ao estresse quando são cultivados em ambiente iluminado com luz branca em comparação com o cultivo no escuro (Dias et al., 2021).

No ensaio de alimentação, o tratamento com *C. javanica* resultou em elevados índices de mortalidade nas duas proporções testadas. Até o momento, a literatura científica apresenta escassez de pesquisas relacionadas à patogenicidade de *C. javanica* em relação à mosca-das-frutas, especialmente *C. capitata*. Portanto, este estudo demonstrou que *C. javanica* pode provocar uma alta mortalidade através da contaminação por ingestão e contato por caminhamento, conforme a metodologia utilizada neste estudo.

A mortalidade verificada para *B. bassiana*, na proporção 1:2, foi semelhante por Qazzaz et al. (2015), quando avaliaram a patogenicidade de cinco isolados nativos de *B. bassiana* em *C. capitata*, via ingestão da dieta contaminada na mesma proporção, relatando uma mortalidade de 60% com o isolado P. Bv 41. Posteriormente Chergui et al. (2020), testaram a cepa BAUM M6-4 e concluíram que após alimentação de *C. capitata* com conídios de *B. bassiana* por 48 horas, houve uma mortalidade de 68,3 a 86,3%, respectivamente.

Os valores de mortalidade de *C. capitata* após ingestão da dieta contaminada para *M. anisopliae* com sinal de esporulação atingiram valores de 50 a 45 %, nas duas proporções testadas, respectivamente. Esses resultados foram similares aos obtidos por Beris et al. (2013), quando verificaram a patogenicidade desse fungo sobre *C. capitata* na proporção 1:1, com as concentrações de $1,5 \times 10^7$ e $1,5 \times 10^8$, atingindo mortalidades de 43,9 e 41,19%, respectivamente.

Estudos realizados comprovaram que *C. capitata*, ao ingerir extratos proteicos produzidos por *M. anisopliae* em combinação com a dieta de alimento, sofre danos no intestino médio. Esses efeitos foram relatados por Ortiz-Urquiza et al. (2009) e Lozano-Tovar et al. (2015) e também observados em outra espécie de tefritídeo, *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae), conforme mencionado por Toledo-Hernandez et al. (2018).

Foi observada uma mortalidade moderada em *C. fumosorosea*, entretanto, as moscas que morreram após ingerir os conídios misturados com a dieta não apresentaram desenvolvimento de esporulação. É relevante destacar que a maior mortalidade para esse fungo foi observada na proporção 1:1. Esse comportamento atípico suscita a necessidade de

realizar mais testes com esse fungo utilizando o mesmo método. Pesquisas conduzidas por Beris et al. (2013) relataram que a cepa IBB020 do fungo *C. fumosorosea*, em concentrações de $1,5 \times 10^7$ e $1,5 \times 10^8$, causou mortalidades com presença de esporulação de 60,1% e 69,4%, respectivamente, em *C. capitata*, quando as moscas foram alimentadas com a mistura da dieta contendo esses conídios por 24 horas. Os resultados obtidos neste estudo divergem desses encontrados, indicando que a cepa utilizada pode ter uma patogenicidade menos expressiva em relação a *C. capitata*.

O menor tempo letal médio (TL_{50}) foi obtido para *B. bassiana* na proporção maior 1:2, mostrando-se similar ao valor de 6,54 dias relatado por Chergui et al. (2020), quando avaliou a patogenicidade da cepa BMAUM M6-4 através do método de alimentação em *C. capitata*. Por outro lado, para *C. javanica*, verificaram-se valores mais elevados nas duas proporções testadas. Esses resultados estão em concordância com Gutierrez-Palomares et al. (2021), que constatarem um (TL_{50}) de 4,58 dias em *D. sukuzii* quando as moscas foram pulverizadas com a cepa CHE-CNRCB 307 na concentração de 1×10^8 . Além disso, os valores mais prolongados de (TL_{50}) foram observados para o tratamento *M. anisopliae* nas duas proporções testadas, corroborando com os resultados relatados por Beris et al. (2013), que encontraram valores de 14,7 e 15,5 dias para esse fungo sobre *C. capitata*.

Neste estudo, os tratamentos baseados em FEs revelaram mortalidades com e sem presença de esporulação, provavelmente devido à multiplicação de bactérias entéricas que colonizam a hemolinfa dos indivíduos mortos, inibindo o desenvolvimento fúngico, conforme sugerido por Shimazu. (1994). Entretanto, algumas moscas ainda foram capazes de sobreviver aos bioensaios após a infecção por FEs, possivelmente graças a um sistema imunológico forte, caracterizado pela produção abundante de peptídeos antimicrobianos e fenoloxidasas (Levitin; Whiteway, 2008; Dubovskiy et al., 2013), os quais encapsulam as hifas fúngicas e bloqueiam sua atividade, como observado por Lu e Leger. (2016). Esses resultados reforçam a complexa interação entre FEs e a resposta imunológica das moscas, proporcionando novas perspectivas científicas para o controle biológico desses insetos-praga.

É importante destacar que, durante as avaliações realizadas para ambos os bioensaios, observou-se que as moscas mortas que conseguiram desenvolver o sinal de esporulação apresentaram esse comportamento nas primeiras 48 horas após serem acomodadas e mantidas na câmara BOD. Esse padrão foi verificado em todos os tratamentos fúngicos, nas duas doses/proporções testadas.

Finalmente, este estudo fornece informações sobre a interação dos fungos avaliados e *C. capitata*. Com base em nossos resultados, podemos sugerir que os FEs *M. anisopliae* e *C.*

javanica mostraram-se promissores para serem incorporados no manejo integrado de adultos de *C. capitata*, por meio de pulverizações e uso de iscas tóxicas associadas a atrativos alimentares. Essas estratégias podem oferecer uma alternativa sustentável e eficaz para o controle dessa praga agrícola, contribuindo assim para o avanço do controle biológico de insetos-praga na fruticultura do semiárido.

5. CONCLUSÕES

M. anisopliae causou alta mortalidade e baixo tempo letal médio (TL_{50}) em adultos de *C. capitata*, por meio da exposição por inoculação tópica.

Os tratamentos com *C. javanica*, *M. anisopliae* e *B. bassiana* apresentaram elevada patogenicidade no método de alimentação em *C. capitata*. No entanto, *B. bassiana* necessitou maior quantidade de conídios e não houve esporulação nas moscas mortas com esse tratamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, A.; SERMANN, H.; BÜTTNER, C. Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v. 73, n. 3, p. 589-596, 2008.

ALBAJES, R.; ALVAREZ, S. Influence of temperature on the development of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) [Mediterranean fruit fly]. In: **Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Serie Agrícola**. 1980.

AYILARA, M. S. et al. Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides: A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticides. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1040901, 2023.

BARONIO, C. A. et al. Toxicities and residual effect of Spinosad and Alpha-Cypermethrin-Based baits to replace Malathion for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) control. **Journal of Economic Entomology**, v. 112, n. 4, p. 1798–1804, 2019.

BARRETO, L. P. et al. Effect of heat stress and oil formulation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* ss on tick cuticle and artificial medium. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, n. 138, p. 94-103, 2016.

BARTA, M. et al. Hypocrealean fungi associated with populations of *Ips typographus* in West Carpathians and selection of local *Beauveria* strains for effective bark beetle control. **Biologia**, v. 73, p. 53-65, 2018.

BEHIE, S. W.; BIDOCHKA, M. J. Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: An additional branch of the soil nitrogen cycle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1553–1560, 2014.

BERIS, E. I. et al. Pathogenicity of three entomopathogenic fungi on pupae and adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Pest Science**, v. 86, n. 2, p. 275-284, 2013.

CASTILLO, M.A. et al. Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extracts. **Biological control**, v. 19, n. 3, p. 274-282, 2000.

CHERGUI, S. et al. Pathogenicity of indigenous *Beauveria bassiana* (Balsamo) against *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 1, p. 128, 2020.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science: Formerly Pesticide Science**, v. 56, n. 8, p. 651-676, 2000.

COSTA, J.A. et al. Potential of microalgae as biopesticides to contribute to sustainable agriculture and environmental development. **Journal of Environmental Science and Health**

- **Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 54, n. 5, p. 366–375, 2019.

DE LIMA SILVA, T. et al. Mortalidade de imaturos e adultos de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) causada por *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) em condições de laboratório. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 13, p. e339111335304, 2022.

DI ILIO, V.; CRISTOFARO, M. Polyphenolic extracts from the olive mill wastewater as a source of biopesticides and their effects on the life cycle of the mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 41, n. 1, p. 359–366, 2021.

DIAS, L. P. et al. Conidiation under illumination enhances conidial tolerance of insect-pathogenic fungi to environmental stresses. **Fungal Biology**, v. 125, n. 11, p. 891-904, 2021.

DUBOVSKIY, I. M. et al. Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi? **PloS One**, v. 8, n. 4, p. e60248, 2013.

FARIA, M. et al. On-farm production of microbial entomopathogens for use in agriculture: Brazil as a case study. **Neotropical Entomology**, v. 52, n. 2, p. 122-133, 2023.

FAYE, P. D. et al. Field efficacy of *Metarhizium acridum* (Hypocreales: Clavicipitaceae) in the control of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in citrus orchards in Senegal. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 41, p. 1185-1195, 2021.

FERNÁNDEZ-BRAVO, M. et al. Responses to abiotic environmental stresses among phylloplane and soil isolates of *Beauveria bassiana* from two holm oak ecosystems. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, n. 141, p. 6-17, 2016.

FINNEY, D. J. Probit analysis, Cambridge University Press. **Cambridge, UK**, 1971.

GARCIA, F. R. M. et al. Biological control of tephritid fruit flies in the Americas and Hawaii: A review of the use of parasitoids and predators. **Insects**, v. 11, n. 10, p. 1–34, 2020.

GUILLEM-AMAT, A. et al. Functional characterization and fitness cost of spinosad-resistant alleles in *Ceratitis capitata*. **Journal of Pest Science**, v. 93, n. 3, p. 1043–1058, 2020.

GUTIERREZ-PALOMARES, V. M. et al. Pathogenicity and virulence of *Isaria javanica*, *Metarhizium anisopliae*, and *Beauveria bassiana* strains for control of *Drosophila suzukii* (Matsumura). **Southwestern Entomologist**, v. 46, n. 4, p. 853-860, 2021.

HALLMAN, G. J.; QUINLAN, M. Synopsis of postharvest quarantine treatment research. In: **Fruit Fly Pests**. CRC Press, 1996. p. 473-477.

HALLOUTI, A. et al. Evaluation of native entomopathogenic fungi isolates for microbial control of the mediterranean fruit fly (*Ceratitis Capitata* (Diptera: Tephritidae)) pupae and adults. **Sumerianz Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 153-164, 2021.

- HAMZAH, A. M. et al. Efficacy of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) against *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) under controlled and open-field conditions on bitter gourd. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2021.
- KACHHAWA, D. Microorganisms as a biopesticides. **J Entomol Zool Stud**, v. 5, n. 3, p. 468-473, 2017.
- KHLAYWI, S. A. et al. Efficacy of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to control mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. **International Journal of Entomological Research**, v. 2, n. 3, p. 169-173, 2014.
- KONSTANTOPOULOU, M. A.; MAZOMENOS, B. E. Evaluation of *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii* strains and four wild-type fungal species against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata*. **BioControl**, v. 50, n. 2, p. 293-305, 2005.
- LACEY, L. A.; FRANSEN, J. J.; CARRUTHERS, R. Global distribution of a naturally occurring fungi of *Bemisia*, their biologies and use as biological control agents. **Bemisia: 1995, taxonomy, biology, damage, control and management**, 1996.
- LEGER, R. J. et al. Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**, v. 13, n. 3, p. 274-288, 1989.
- LEGER, R. J. et al. Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 60, n. 1, p. 89-101, 1992.
- LEVITIN, A.; WHITEWAY, M. *Drosophila* innate immunity and response to fungal infections. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 1021-1026, 2008.
- LIN, R. et al. Genome sequence of *Isaria javanica* and comparative genome analysis insights into family S53 peptidase evolution in fungal entomopathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 17, p. 7111-7128, 2019.
- LIQUIDO, N. J. et al. Compendium of fruit fly host plant information: The USDA primary reference in establishing fruit fly regulated host plants. In: **Area-wide management of fruit fly pests**. CRC Press, 2020. p. 363-368.
- LOZANO-TOVAR, M. D. et al. Insecticidal activity of a destruxin-containing extract of *Metarhizium brunneum* against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 2, p. 462-472, 2015.
- LOZANO-TOVAR, M. D. et al. Study on the insecticidal activity of entomopathogenic fungi for the control of the fruit fly (*Anastrepha obliqua*), the main pest in mango crop in Colombia. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 3, p. 83, 2023.
- LU, H.-L.; LEGER, R. J. St. Insect immunity to entomopathogenic fungi. **Advances in Genetics**, p. 251-285, 2016.

MAHMOUD, M. F. et al. Susceptibility of the peach fruit fly *Bactrocera zonata* (Saunders) (Diptera: Tephritidae) to three entomopathogenic fungi. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 19, n. 2, p. 169-175, 2009.

MANNINO, M. C.; PAIXÃO, F. RS.; PEDRINI, N. The limpet transcription factors of *Triatoma infestans* regulate the response to fungal infection and modulate the expression pattern of defensin genes. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 108, p. 53-60, 2019.

MARRI, D. et al. Evaluation of the efficacy of a commercial formulation of *Beauveria bassiana* for the control of the invasive fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). **Biopesticides International**, v. 12, n. 1, p. 9-19, 2016.

MARUTESCU, L. et al. Botanical pesticides with virucidal, bactericidal, and fungicidal activity. In: **New pesticides and soil sensors**. Academic Press, 2017. p. 311-335.

MCGUIRE, A. V. et al. The infection efficacy of *Metarhizium* strains (Hypocreales: Clavicipitaceae) against the Queensland fruit fly *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 116, n. 2, p. 627-631, 2023.

MURTAZA, G. et al. Biological control potential of entomopathogenic fungal strains against peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saunders) (Diptera: Tephritidae). **PeerJ**, v. 10, p. 1–16, 2022.

MUSTAFA, U; KAUR, G. Studies on destruxin production and toxicity by entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* ARSEF 2735. **Kavaka**, v. 41, p. 6874 ,2013.

ORTIZ-URQUIZA, A. et al. Purification and characterisation of proteins secreted by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with insecticidal activity against adults of the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 65, n. 10, p. 1130-1139, 2009.

PAIXÃO, F. R. S. et al. Increased heat tolerance afforded by oil-based conidial formulations of *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium robertsii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 3, p. 324-337, 2017.

PARANHOS, B. J.; NAVA, D. E.; MALAVASI, A. Biological control of fruit flies in Brazil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 54, 2019.

QAZZAZ, F. O. et al. Effectiveness of *Beauveria bassiana* native isolates in the biological control of the mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*). **Advances in Entomology**, v. 3, n. 02, p. 44, 2015.

QUESADA-MORAGA, E.; RUIZ-GARCÍA, A.; SANTIAGO-ALVAREZ, C. Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 99, n. 6, p. 1955-1966, 2006.

RAMÍREZ E RAMÍREZ, F. et al. Sexual performance and survival of males of *Ceratitis capitata* VIENNA 8 (Diptera: Tephritidae) inoculated with a commercial formulation of *Beauveria bassiana*. **Journal of Applied Entomology**, v. 146, n. 1–2, p. 67–76, 2022.

SHAURUB, E.S. H. Review of entomopathogenic fungi and nematodes as biological control agents of tephritid fruit flies: current status and a future vision. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 171, n. 1, p. 17–34, 2022.

SHIMAZU, M. Potential of the cerambycid-parasitic type of *Beauveria brongniartii* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for microbial control of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 29, n. 1, p. 127–130, 1994.

SKROBEK, A.; SHAH, F. A.; BUTT, T. M. Destruxin production by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in insects and factors influencing their degradation. **BioControl**, v. 53, n. 2, p. 361–373, 2008.

SOLIMAN, N. A. et al. Entomopathogenic nematodes and fungi as bioControl agents for the peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saunders) and the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) soil borne-stages. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 24, n. 2, p. 497, 2014.

SOLIMAN, N. A. et al. Pathogenicity of three entomopathogenic fungi against the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 1, p. 1–8, 2020.

THAKUR, N. et al. Microbial biopesticides: current status and advancement for sustainable agriculture and environment. In: **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering**. Elsevier, 2020. p. 243–282.

TOLEDO, J. et al. Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) under laboratory and field cage conditions. **Journal of Economic Entomology**, v. 100, n. 2, p. 291–297, 2007.

TOLEDO-HERNÁNDEZ, R. A.; TOLEDO, J.; SÁNCHEZ, D. Effect of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) on food consumption and mortality in the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 38, n. 3, p. 254–260, 2018.

VEY, A. et al. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**, p. 311–346, 2001.

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

YEE, W. L. Laboratory evaluation of CX-10282 containing *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) strain GHA against adult *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae). **Phytoparasitica**, v. 48, n. 2, p. 231–245, 2020.

YOUSEF, M. et al. Biocontrol of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) with *Metarhizium brunneum* and its extracts. **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 3, p. 1118-1125, 2013.

**CAPÍTULO III –EFICÁCIA DA INFECÇÃO DE FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS EM PUPÁRIOS DE *Ceratitis capitata* (WIEDEMANN)
(DIPTERA: TEPHRITIDAE), EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

RESUMO

Ceratitis capitata (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) é uma das pragas mais prejudiciais da fruticultura mundial. Uma das dificuldades no controle dessa praga é que ela completa seu ciclo de vida (pupa) no solo. Nesse sentido, a aplicação dos fungos entomopatogênicos (FEs) pode representar uma alternativa eficiente para o controle durante a fase pupal. Esses FEs possuem a capacidade de persistir por prazos prolongados nos solos, tornando esse ambiente ideal para sua conservação e disseminação. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência de quatro FEs sobre a fase de pupa de *C. capitata*, em condições de laboratório. Os tratamentos avaliados foram *Beauveria bassiana* (2×10^9 UFC/mL), *Cordyceps fumosorosea* (3×10^9 UFC/mL), *Cordyceps javanica* (1×10^{10} UFC/mL), *Metarhizium anisopliae* (6×10^8 UFC/mL) e água destilada esterelizada como controle. Para isso, foram utilizadas três formas de aplicação: método tópico, método por imersão (30 segundos) e por solo contaminado, nas concentrações 0,5-1,0 L ou Kg. Ha⁻¹. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado contendo cinco tratamentos e 20 repetições por tratamento. Os ensaios foram avaliados por 21 dias, as moscas que conseguiam emergir eram transferidas para gaiolas plásticas e alimentadas com uma dieta a base de lêvedo e açúcar (1:4) e água. Pupários e adultos foram transferidas para câmara BOD (temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $65 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas), para constatar sintomas de esporulação. Os melhores resultados para o método tópico foram observados para *B. bassiana* na maior dose, alcançando 65 % de mortalidade total nos pupários, já nos adultos emergidos *B. bassiana* e *M. anisopliae* alcançaram mortalidades de 50 e 45%, respectivamente. No método por imersão (30s), o melhor resultado foi para *C. fumosorosea* na maior dose avaliada, com 55% de mortalidade total. A mortalidade total pós emergência de adultos atingiu 70% para *M. anisopliae*. Para o método em solo contaminado a maior mortalidade total foi verificada na menor dosagem de *M. anisopliae* com 80% de mortalidade, sendo 60% dessa mortalidade observada nas moscas que apresentaram esporulação, *C. javanica* alcançou 70% de mortalidade total, na maior dosagem. Os resultados sugerem que os FEs avaliados, apresentam efeito de mortalidade sobre pupários de *C. capitata*.

Palavras-chave: Mosca do mediterrâneo. Entomopatógenos. Patogenicidade. Esporulação. Pós-emergência

CHAPTER III – EFFECTIVENESS OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGAL INFECTION IN PUPARIA OF *Ceratitis capitata* (WIEDEMANN) (DIPTERA: TEPHRITIDAE), UNDER LABORATORY CONDITIONS

ABSTRACT

Ceratitis capitata (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) is one of the most damaging pests of fruit growing worldwide. One of the difficulties in controlling this species is that it completes its life cycle (pupa) in the soil. In this sense, the application of entomopathogenic fungi (EPFs) may represent an efficient alternative for control during the pupal stage. These EPFs have the ability to persist for long periods in soils, making this environment ideal for their conservation and dissemination. Therefore, the objective of this work was to evaluate the efficiency of four FEs on the pupal stage of *C. capitata*, under laboratory conditions (temperature $25 \pm 2^\circ\text{C}$, RH of $65 \pm 10\%$ and photophase of 12 hours). The treatments evaluated were *Beauveria bassiana* (2×10^9 CFU/mL), *Cordyceps fumosorosea* (3×10^9 CFU/mL), *Cordyceps javanica* (1×10^{10} CFU/mL), *Metarhizium anisopliae* (6×10^8 CFU/mL) and sterilized distilled water as control. For this, three forms of application were used: topical method, immersion method (30 seconds) and contaminated soil, at concentrations 0.5-1.0 L or Kg. Ha⁻¹. The experiments were composed of 20 replicates per treatment, where each puparia corresponded to one replicate. The trials were evaluated for 21 days, flies that managed to emerge were transferred to plastic cages and fed a diet based on leaven and sugar (1:4) and water. Pupae and adults were transferred to a BOD chamber until sporulation symptoms were observed. The best results for the topical method were observed for *B. bassiana* at the highest dose, reaching 65% total mortality in puparia, while in emerged adults *B. bassiana* and *M. anisopliae* reached mortalities of 50 and 45%, respectively. In the immersion method (30s), the best result was for *C. fumosorosea* at the highest dose, with a 55% total mortality. The total mortality after adult emergence reached 70% for *M. anisopliae*. For the method in contaminated soil the best total mortality was verified at the lowest dose, for *M. anisopliae* with 80%, being the 60% mortality found in the flies that presented sporulation, *C. javanica* the highest dose improved its total mortality, reaching 70%. The results suggest that the EPFs evaluated, present control effect on puparia of *C. capitata*.

Key-words: Mediterranean fruit fly. Entomopathogens. Pathogenicity. Sporulation. Post-emergence

1. INTRODUÇÃO

Os fungos entomopatogênicos (FEs), pertencentes à ordem dos Hypocreales, especialmente das famílias *Clavicipitaceae* e *Cordycipitaceae*, caracterizam-se por persistirem por longos períodos nos solos, tornando esse ambiente o habitat ideal para sua conservação e disseminação (Zimmermann, 1986; Rudeen et al., 2013; Kepler et al., 2017). Um exemplo é *Metarhizium anisopliae* Metschnikoff Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae), que quando aplicado via solo, pode manter sua viabilidade por até cinco a dez anos, permitindo a regulação das populações de pragas do solo e reduzindo os custos de controle (Rath; Koen; Rowe, 1995).

A longevidade dos FEs, é uma razão para que sejam considerados altamente patogênicos e apreciado dentro das estratégias para o controle de pragas (Quesada-Moraga et al., 2007), pois o solo vai facilitar a multiplicação dos conídios, proporcionando-lhes todas as condições favoráveis para seu desenvolvimento (Ekesi; Maniania; Lux, 2002). Os FEs além de colaborar na regulação de populações de inseto-praga que habitam no solo (estágios imaturos), tem a característica de produzir massivamente esporos, e fatores como a corrente de água ajudam na disseminação destes nos habitats terrestres (Blango; Kniemeyer; Brakhage, 2019).

O controle de insetos adultos, como *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), por meio de FEs é efetivo devido à contaminação direta que ocorre através dos propágulos infecciosos (Dimbi et al., 2003). No entanto, enfrenta-se certa dificuldade no controle dos estágios imaturos das moscas-das-frutas, uma vez que eles completam seu ciclo de vida no solo, o que dificulta o uso de inimigos naturais (parasitoides) como estratégia de controle (Boari; Zuccari; Vurro, 2008).

O efeito dos FEs sobre pupários de *C. capitata* tem sido relatado em diversos estudos, por meio de diferentes métodos de aplicação, tais como: o método tópico (Imoulan; Alaoui; El Mezine, 2011; Abdellah et al., 2020), o método por imersão (Quesada-Moraga; Ruiz-García; Santiago-Álvarez, 2006; Beris et al., 2013; Soliman et al., 2020), e também através de solo contaminado com conídios (Ekesi et al., 2005; Almeida et al., 2007; Ali et al., 2009).

Segundo Gava et al. (2020; 2021), o uso dos FEs, através do sistema de irrigação por gotejamento mostrou resultados promissores contra pupários de *C. capitata*, avaliando cepas de fungos baseados em *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Clavicipitaceae) e *M. anisopliae*. Além disso, o possível sucesso da aplicação dos FEs em campo via solo pode ser atribuído à irrigação permanente que apresentam os pomares de

frutícolas, o que vai ajudar a intensificar a umidade relativa do solo, favorecendo à multiplicação dos propágulos (Hallouti et al., 2020). Nesse contexto fatores como a umidade, temperatura, já foram relatados para atingir altos níveis de patogenicidade dos FEs, fatores como textura do solo e pH, também deveriam ser considerados para o controle de insetos do solo (Garrido-Jurado et al., 2011)

Outros autores também relataram o efeito dos FEs sobre outros tefritídeos, evidenciando sua patogenicidade em pupários através de diferentes métodos de exposição e concentrações. Essa virulência foi observada tanto em linhagens comerciais quanto em isolados nativos de diferentes espécies, incluindo *Bactrocera zonata* Saunders (Diptera: Tephritidae) (Hussein et al., 2018), *Rhagoletis pomonella* Walsh (Diptera: Tephritidae) (Usman et al., 2020), *Bactrocera dorsalis* Handel (Usman et al., 2021) e *Zeugodacus cucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae) (Hintènou et al., 2023).

Nesse contexto, a virulência dos FEs sobre pupários de diferentes tefritídeos tem sido relatada nos últimos anos. Além disso, foi comprovado o efeito que esses agentes apresentam nos adultos que emergem após a contaminação, o que reforça a relevância dos FEs como uma opção promissora e eficaz no controle biológico das moscas-das-frutas.

Diante dessa necessidade de incorporar novas abordagens de biocontrole na fruticultura do semiárido brasileiro, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de mortalidade de quatro FEs comercializados no Brasil, sobre os pupários e adultos emergidos desses pupários de *C. capitata*, em condições de laboratório, utilizando diferentes métodos de contaminação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do estudo

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia Aplicada, Departamento de Ciências Agronômicas e Florestais, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró/RN, Brasil.

2.2. Procedência dos pupários de *Ceratitis capitata*

Os pupários foram obtidos da criação proveniente do Laboratório de Entomologia Aplicada da UFERSA. Eles foram mantidos sob condições controladas em salas climatizadas (temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas), onde as coletas eram realizadas diariamente.

2.3. Linhagens comerciais para os bioensaios

As linhagens de FEs utilizados nesta pesquisa tiveram as seguintes concentrações: *Beauveria bassiana* (2×10^9 UFC/mL), *Cordyceps fumosorosea* (3×10^9 UFC/mL), *Cordyceps javanica* (1×10^{10} UFC/mL) e *Metarhizium anisopliae* (6×10^8 UFC/mL), sendo o tratamento testemunha água destilada esterilizada. Se usou duas doses para todos os tratamentos fúngicos 0,5 e 1,0 L ou Kg. Ha^{-1} , usando um volume de água para a calda de 500L. Ha^{-1} .

2.4. Condução dos bioensaios

2.4.1. Patogenicidade dos fungos entomopatogênicos (FEs) em pupas de *Ceratitis capitata*

Os pupários utilizados ($n = 20$), tinham três dias de idade, sendo cada pupa uma repetição. Os experimentos eram mantidos em ambientes controlados, com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de $65 \pm 10\%$, (câmara tipo B.O.D SL-200).

2.4.1.1. Método tópico

O bioensaio foi realizado baseado na metodologia de Imoulan; Alaoui; El Mezine. (2011). O experimento consistiu na aplicação tópica das suspensões de conídios dos tratamentos nas duas doses testadas, com ajuda de uma micropipeta na superfície da (1 μL). Para o tratamento controle foi utilizada água destilada esterilizada. Logo após aplicação, as pupas foram secas por 5 minutos, para eliminar todo tipo de resíduo. As pupas foram individualizadas em placas de Petri (5 x 1 cm). No interior de cada placa continha um disco

de papel filtro e algodão úmido para manter a umidade. Em seguida as placas foram fechadas com plástico filme e transferidas para câmara climatizada B.O.D (temperatura $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas), onde foram avaliadas com relação a mortalidade ocasionada pelos fungos (presença de micélio).

Os adultos que emergiram foram transferidos para gaiolas plásticas (25,5 x 12,5 x 12 cm), e acomodados em câmara BOD (temperatura $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas), e receberam alimento *ad libitum*. A mortalidade dos adultos foi avaliada diariamente até 21º dia, contando a partir da montagem do experimento. As moscas mortas foram recolhidas e individualizadas em placas de Petri menores (5 x 1cm), contendo papel filtro e algodão umedecido para gerar umidade necessária. Em seguida foram fechados com plástico filme e acondicionadas em câmara B.O.D (temperatura $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas).

2.4.1.2. Método por imersão

Para o método por imersão foi utilizada a metodologia descrita por Beris et al. (2013). Para cada tratamento foram submergidas vinte pupários em 2 mL das caldas fúngicas, por 30 segundos, utilizando para o controle água destilada esterilizada. Após secagem do excesso do fluido com papel filtro durante 5 minutos, as pupas foram transferidas individualmente para Placas de Petri (5 x 1 cm), acondicionadas da mesma forma descrita no método de acima e levadas para câmara B.O.D (temperatura $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas), até desenvolver o sinal de micose típica dos tratamentos aplicados.

Os adultos emergidos foram levados para gaiolas plásticas (25,5 x 12,5 x 12 cm), e acondicionados da mesma forma do experimento anterior, com fornecimento de alimento *ad libitum*. A mortalidade dos adultos foi avaliada até os 21 dias, desde a aplicação dos tratamentos nos pupários. As moscas mortas eram retiradas e acomodadas em placas de Petri menores (5 x 1cm), da mesma forma do experimento descrito acima. Por último as placas foram transferidas e mantidas em câmara B.O.D, como foi descrito acima.

4.4.1.3. Método por solo contaminado

Para comprovar a patogenicidade dos tratamentos em pupários através do solo contaminado foi usado a metodologia descrita por Usman et al. (2021). O solo utilizado (57% areia, 25% silte e 18% argila), foi autoclavado a 120°C por dois dias, por um período de uma hora. Posteriormente o solo foi seco ao ar por 48 horas. O solo totalmente seco foi submetido a peneiramento (2 mm a malha da peneira) e depois foram colocados em copos de 30 mL, na

quantidade de 20 gramas por copo. Logo em seguida foi adicionado 1mL da calda inicial das suspensões dos tratamentos de ambas doses + 1mL de água destilada esterilizada. Em seguida os copos foram tampados e agitados suavemente até a mistura ficar uniforme. Foram utilizadas 20 pupas por tratamento, enterrando uma pupa em cada copo a 2 cm de profundidade. Para o controle se usou água destilada esterilizada (2 mL).

Os adultos emergidos foram transferidos para gaiolas plásticas (25,5 x 12,5 x 12 cm), receberam alimento *ad libitum* e foram transferidos para câmara BOD (com as condições já mencionadas anteriormente). A mortalidade dos adultos foi registrada diariamente até o dia 21º, considerando o dia do início do bioensaio. As moscas mortas foram individualizadas em placas de Petri menores (5 x 1cm), e acondicionadas da mesma forma que os bioensaios anteriores.

Para todos os experimentos, foram considerados os seguintes parâmetros para determinar a mortalidade total dos tratamentos fúngicos sobre *C. capitata* (1) a mortalidade das pupas após exposição à suspensão de conídios (com presença de esporulação), (2) as pupas que apresentaram falhas de emergência, aquelas que tiveram sintomas, como pupários necróticos, pupas encolhidas, já para o final dos bioensaios foram consideradas como mortas, (3) a mortalidade de moscas adultas emergidas expostas à suspensão de conídios durante a fase de pupa (com e sem esporulação) (WANG et al., 2021).

2.5. Variáveis analisadas

- ✓ Mortalidade total de pupas (%);
- ✓ Mortalidade total adultos emergidos de pupários tratados.

2.6. Análise estatísticas

Foi adotado um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com cinco tratamentos, para as duas doses testadas. Cada tratamento compreendeu 20 repetições, correspondendo cada uma a uma pupa de *C. capitata*.

As diferenças nas taxas de mortalidade foram avaliadas através do teste Exato de Fisher, e o Teste post-hoc de Fisher foi utilizado para comparar as proporções. Todas as análises foram consideradas significativas com um nível de probabilidade de 5%. Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o software estatístico R (2020).

3. RESULTADOS

Na avaliação da mortalidade dos pupários com presença de micélio nas duas doses, *C. javanica* apresentou resultados estatisticamente diferentes dos demais tratamentos e do controle ($p < 0,05$). Apenas nesse tratamento foi observado o desenvolvimento de micélio sobre os pupários tratados. Quanto à mortalidade pupal sem desenvolvimento de micélio, na dose menor, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p > 0,05$). Já na dose maior, as mortalidades aumentaram, destacando-se *B. bassiana*, *C. fumosorosea* e *M. anisopliae*, com mortalidades de 65%, 65% e 55%, respectivamente, todas diferindo significativamente da testemunha ($p < 0,05$). Ao avaliar a mortalidade total, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para as duas doses testadas ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Mortalidade pupal de *Ceratitis capitata* expostas a fungos entomopatogênicos, mediante o método tópico em duas doses diferentes.

Dose testada	Fungo (UFC/mL)	Mortalidade com micélio (%)	Mortalidade sem micélio (%)	Mortalidade total (%)
0,5	<i>B. bassiana</i> (2×10^9)	0 b	5 a	5 a
	<i>C. fumosorosea</i> (3×10^9)	0 b	25 a	25 a
	<i>C. javanica</i> (1×10^{10})	25 a	15 a	40 a
	<i>M. anisopliae</i> (6×10^8)	0 b	30 a	30 a
	Controle	0 b	10 a	10 a
	p	<0,001	0,390	0,173
1,0	<i>B. bassiana</i> (2×10^9)	0 b	65 a	65 a
	<i>C. fumosorosea</i> (3×10^9)	0 b	65 a	65 a
	<i>C. javanica</i> (1×10^{10})	30 a	15 b	45 a
	<i>M. anisopliae</i> (6×10^8)	0 b	55 ab	55 a
	Controle	0 b	15 b	15 a
	p	<0,001	<0,05	0,214

Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa de acordo com o teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

Ao avaliar a mortalidade das moscas emergidas, não foram observadas diferenças estatísticas na esporulação (desenvolvimento de micélio) pós emergência para ambas as doses em todos os tratamentos ($p > 0,05$). A mortalidade das moscas que não conseguiram esporular micélio também foi avaliada, e constatou-se que, na dose menor, *B. bassiana* e *M. anisopliae* diferiram significativamente do controle ($p < 0,05$). Quanto à mortalidade total, as maiores porcentagens de mortalidade foram observadas na dose menor nos tratamentos com *B.*

bassiana e *M. anisopliae*, alcançando 50% e 45%, respectivamente. Esses FEs apresentaram diferenças estatísticas em relação ao tratamento controle ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Mortalidade de adultos de *Ceratitis capitata* emergidos de pupários expostos a fungos entomopatogênicos, mediante o método tópico em duas doses diferentes.

Dose testada	Fungo (UFC/mL)	Mortalidade com micélio (%)	Mortalidade sem micélio (%)	Mortalidade total (%)
0,5	<i>B. bassiana</i> (2×10^9)	20 a	30 a	50 a
	<i>C. fumosorosea</i> (3×10^9)	0 a	10 ab	10 ab
	<i>C. javanica</i> (1×10^{10})	25 a	0 b	25 ab
	<i>M. anisopliae</i> (6×10^8)	5 a	40 a	45 a
	Controle	0 a	0 b	0 b
	p	<0,05	<0,05	<0,001
1,0	<i>B. bassiana</i> (2×10^9)	0 a	25 a	25 ab
	<i>C. fumosorosea</i> (3×10^9)	0 a	10 a	10 ab
	<i>C. javanica</i> (1×10^{10})	20 a	15 a	35 a
	<i>M. anisopliae</i> (6×10^8)	15 a	30 a	45 a
	Controle	0 a	0 a	0 b
	p	<0,05	0,150	0,214

Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa de acordo com o teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

Ao avaliar a mortalidade dos pupários por meio da imersão, constatou-se que *C. javanica* foi a única a desenvolver sinal de micélio para ambas as doses, com mortalidades de 35% e 20%, respectivamente. Esses valores diferiram estatisticamente do tratamento do controle ($p < 0,05$). Já nas avaliações de mortalidade pupal sem micélio e total, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para ambas as doses ($p > 0,05$). No entanto, verificou-se um aumento nas mortalidades para a dose maior (Tabela 3).

Tabela 3. Mortalidade pupal de *Ceratitis capitata* expostas a fungos entomopatogênicos, mediante o método de imersão em duas doses diferentes.

Dose testada	Fungo (UFC/mL)	Mortalidade com micélio (%)	Mortalidade sem micélio (%)	Mortalidade total (%)
0,5	<i>B. bassiana</i> (2×10^9)	0 b	15 a	15 a
	<i>C. fumosorosea</i> (3×10^9)	0 b	20 a	20 a
	<i>C. javanica</i> (1×10^{10})	35 a	10 a	45 a
	<i>M. anisopliae</i> (6×10^8)	0 b	10 a	10 a
	Controle	0 b	5 a	5 a
	p	<0,001	0,802	0,136
1,0	<i>B. bassiana</i> (2×10^9)	0 b	50 a	50 a
	<i>C. fumosorosea</i> (3×10^9)	0 b	55 a	55 a

<i>C. javanica</i> (1×10^{10})	20 a	20 a	40 a
<i>M. anisopliae</i> (6×10^8)	0 b	55 a	55 a
Controle	0 b	15 a	15 a
p	<0,001	0,178	0,355

Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa de acordo com o teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

Após emergência de adultos, quando se avaliou a mortalidade com sinal de micélio nas moscas, *C. javanica* e *M. anisopliae* obtiveram os melhores resultados, para ambas doses, diferindo estatisticamente, quando comparado com o controle ($p < 0,05$). A mortalidade sem micélio para a dose menor, não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p > 0,05$). Para a dose maior os tratamentos com *B. bassiana* e *C. fumosorosea*, alcançaram mortalidades de 40%, em ambas linhagens houve diferenças estatísticas, comparado com o controle ($p < 0,05$). Na mortalidade total, *M. anisopliae*, foi o melhor tratamento para a dose menor, atingindo uma mortalidade 70%, diferindo do controle, porém não dos outros tratamentos ($p > 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Mortalidade de adultos de *Ceratitis capitata* emergidos de pupários expostos a fungos entomopatogênicos, mediante o método de imersão em duas doses diferentes.

Dose testada	Fungo (UFC/mL)	Mortalidade com micélio (%)	Mortalidade sem micélio (%)	Mortalidade total (%)
0,5	<i>B. bassiana</i> (2×10^9)	20 ab	10 a	30 a
	<i>C. fumosorosea</i> (3×10^9)	5 b	20 a	25 ab
	<i>C. javanica</i> (1×10^{10})	45 a	0 a	45 a
	<i>M. anisopliae</i> (6×10^8)	60 a	10 a	70 a
	Controle	0 b	0 a	0 b
	p	<0,001	0,155	<0,001
1,0	<i>B. bassiana</i> (2×10^9)	0 b	40 a	40 a
	<i>C. fumosorosea</i> (3×10^9)	0 b	40 a	40 a
	<i>C. javanica</i> (1×10^{10})	40 a	5 ab	45 a
	<i>M. anisopliae</i> (6×10^8)	30 a	10 ab	40 a
	Controle	0 b	0 b	0 B
	p	<0,001	<0,001	<0,05

Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa de acordo com o teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

Ao avaliar a mortalidade pupal no bioensaio do solo contaminado, constatou-se que as mortalidades foram relativamente baixas, variando de 20 a 25% para a dose menor. Para a dose maior, as mortalidades tiveram um aumento, sendo *C. fumosorosea* e *M. anisopliae* os melhores tratamentos, alcançando 45% de mortalidade para ambos tratamentos, porém não houve diferença estatística entre os tratamentos e o controle ($p < 0,05$). No caso das moscas

emergidas após serem expostas aos tratamentos, na fase de pupa, a maior porcentagem de mortalidade foi observada para *M. anisopliae* com 60% de mortalidade com presença de micélio na dose menor, diferindo estatisticamente quando comparado com o controle ($p<0,05$). Na avaliação da mortalidade dos adultos sem micélio, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos e o controle ($p>0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5. Mortalidade de pupas e adultos de *Ceratitis capitata* expostos a fungos entomopatogênicos, mediante solo contaminado em duas doses diferentes.

Dose testada	Fungo (UFC/mL)	Mortalidade de pupas (%)	Mortalidade de adultos com micélio (%)	Mortalidade de adultos sem micélio (%)	Mortalidade total (%)
0,5 L	<i>B. bassiana</i> (2×10^9)	25 a	20 ab	15 a	60 a
	<i>C. fumosorosea</i> (3×10^9)	25 a	30 a	5 a	60 a
	<i>C. javanica</i> (1×10^{10})	20 a	20 ab	15 a	55 a
	<i>M. anisopliae</i> (6×10^8)	20 a	60 a	0 a	80 a
	Controle	10 a	0 b	0 a	10 b
	P	0,868	<0,05	0,207	<0,05
1,0 L	<i>B. bassiana</i> (2×10^9)	35 a	0 b	15 a	50 ab
	<i>C. fumosorosea</i> (3×10^9)	45 a	0 b	15 a	60 ab
	<i>C. javanica</i> (1×10^{10})	30 a	35 a	5 a	70 a
	<i>M. anisopliae</i> (6×10^8)	45 a	25 ab	0 a	70 a
	Controle	15 a	0 b	0 a	15 b
	P	0,569	<0,001	0,207	0,162

Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa de acordo com o teste Exato de Fisher ($p<0,05$).

4. DISCUSSÃO

Com base em nossos resultados, para a aplicação tópica das linhagens fúngicas em pupários de *C. capitata*, observamos que não apresentaram altos níveis de virulência quando expostos à dose menor (0,5 Kg ou L. ha⁻¹). No entanto, essas eficácias aumentaram quando os pupários foram submetidos a uma dose maior. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Imoulán, Alaoui e El Meziane. (2011), que avaliaram 118 isolados nativos de *B. bassiana* e obtiveram mortalidades que variaram de 10% a 90% após aplicação tópica de 5 µl em pupários de *C. capitata*, utilizando uma concentração de 1x10⁸.

A linhagem *B. bassiana* mostrou algum grau de virulência em pupários de *C. capitata*, porém, essa virulência só foi evidenciada quando a dose aplicada foi maior, alcançando um máximo de 65% de mortalidade total. Esses resultados diferem dos encontrados por Hallouti et al. (2020), que avaliaram linhagens de *B. bassiana* provenientes de solos da região de Souss, no Marrocos, e observaram mortalidades superiores a 90% em pupas de *C. capitata* usando o método de contato (pulverização) com os isolados NS10 e OS1.

Essa alta patogenicidade relatada por Hallouti et al. (2020) pode ser atribuída à proximidade dessas linhagens com o ambiente natural da mosca do Mediterrâneo, ou também à sua adaptabilidade aos ambientes climáticos da região, de acordo com as observações de Bidochka, Kasperski; Wild. (1998).

Com *M. anisopliae*, nossos resultados foram semelhantes aos relatados por Abdellah et al. (2020). Em seu estudo, eles também testaram a patogenicidade desse fungo através da inoculação tópica em pupários de *B. dorsalis*, utilizando concentrações próximas das que utilizamos (5x10⁶ e 10x10⁶). Eles conseguiram obter mortalidades de 40% e 50%, respectivamente.

O fungo *C. javanica* demonstrou ser eficaz contra pupários de *C. capitata* quando aplicada topicamente. Foi o único tratamento que conseguiu produzir esporos nos pupários tratados, colonizando completamente a superfície do tegumento. Esse comportamento não foi observado nos demais tratamentos, o que difere dos resultados encontrados por Abdellah et al. (2020), que relataram esporulação de *M. anisopliae* uma semana após a aplicação em pupários de *B. dorsalis*, e por Hallouti et al. (2021), que obtiveram esporulação de *B. bassiana* em pupários de *C. capitata*. Além disso, o tratamento com *C. fumosorosea* junto com *B. bassiana* mostraram ter maior virulência contra os pupários, alcançando as maiores porcentagens de mortalidade quando aplicado topicamente.

Os resultados para o método por imersão, demonstraram ter semelhança aos obtidos através do método tópico, observando-se níveis moderados de mortalidade, dependendo do fungo avaliado e a dose testada. Em geral, nossos resultados à dose maior, concordam com aqueles demonstrados por Beris et al. (2013), quando testaram *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *C. fumosorosea*, através da imersão (30 segundos) em pupários de *C. capitata* de 4 a 5 dias de idade, alcançando mortalidades de 52,1, 52,3 e 63,5 %, respectivamente. Assim Soliman et al. (2020), verificaram a patogenicidade de *M. anisopliae* (cepa 5130) e *B. bassiana* (cepa 5133), através da imersão de pupas de 5 dias de idade, verificando-se mortalidades de 77,5 e 65 %, respectivamente. Os resultados obtidos para *C. javanica*, apresentaram similitude aos obtidos no método tópico, além de se repetir o comportamento do desenvolvimento de sinal de micélio nas pupas infectadas. Esse comportamento não foi observado nos demais tratamentos.

Embora a hipótese de que um aumento no tempo de submersão dos pupários nas suspensões de conídios poderia resultar em uma maior mortalidade tenha sido considerada, esse cenário não foi respaldado por um estudo realizado por Wang et al. (2021). Nesse estudo, os pesquisadores testaram *C. fumosorosea*, *B. bassiana* e *M. anisopliae* em pupas de *B. dorsalis*, utilizando uma imersão de 1 minuto, e obtiveram taxas de mortalidade variando de 0% a 35%. Curiosamente, esses resultados foram semelhantes aos obtidos em nosso estudo, mesmo ao aplicar um tempo menor de submersão, mas com os mesmos fungos.

No método de solo contaminado, observamos mortalidades superiores a 50% em ambas as doses testadas. Esses resultados estão em concordância com o estudo de Mohsin, Hamad e Hanawi. (2023), que comprovaram a patogenicidade de *B. bassiana* utilizando a mesma metodologia. Nesse estudo, eles avaliaram dois isolados (B53 e B100) em pupários de 4 a 5 dias de idade de *C. capitata*, obtendo eficácias de 61,3% e 50,3%, respectivamente.

Além disso, observamos que a emergência dos adultos foi reduzida, o que também está de acordo com as descobertas de Ali et al. (2009). Nesse estudo, eles avaliaram o efeito de *B. bassiana* através da contaminação de pupários, aplicando os conídios via solo em condições de semi campo.

As doses testadas para *M. anisopliae*, alcançaram elevadas mortalidades, sendo superiores a 70%. Esses resultados foram similares aos verificados por Ekesi; Maniania; Lux. (2003), quando avaliaram a patogenicidade de 4 linhagens de *M. anisopliae* (ICIPE 18, ICIPE 20, ICIPE 60 e ICIPE 69), através da contaminação via solo (sem ser esterilizado) de pupários de *C. capitata*. O efeito de *C. javanica* para a infecção dos pupários, através da metodologia descrita, foi também observado na espécie *R. pomonella*, de acordo com Usman et al.(2020), a

linhagem ajudou a reduzir a emergência de adultos desta praga, atingindo mortalidades superiores a 50% em condições de laboratório, o que concordaria com nossos resultados.

Para *C. fumosorosea* a mortalidade total alcançada foi similar para as duas doses testadas, atingindo valores superiores de 60%. Esses resultados concordam com os obtidos por Usman et al. (2020), através do método citado. Os autores avaliaram a patogenicidade de *C. fumosorosea* (cepa Apopka 97), concluindo ao final das avaliações que esse fungo ajudou a reduzir a emergência de adultos de *R. pomonella*.

No presente estudo, foi comprovada a patogenicidade de *C. javanica* através de três métodos: aplicação direta (método tópico e imersão) e aplicação indireta via solo contendo conídios dos fungos. Observamos resultados promissores desse fungo na mortalidade de pupários de *C. capitata*. Até o momento, conhecemos apenas um estudo que confirma o efeito de *C. javanica* em pupários de tefritídeos, especificamente em *R. pomonella*. Além disso, em nossa pesquisa, observamos que essa linhagem tem a capacidade de desenvolver sinais de esporulação (micélio) tanto nas pupas tratadas como nos adultos que emergem desses pupários.

Ao final das avaliações para os três bioensaios realizados, notou-se a emergência de adultos dos pupários infectados, independentemente do método de exposição, do fungo e da dose aplicada. Posteriormente, verificou-se a mortalidade acompanhada do desenvolvimento micelial. Nossos resultados com pupários tratados topicamente evidenciaram tanto a emergência quanto a mortalidade de adultos. Esses níveis de emergência também foram observados por outros autores que avaliaram a patogenicidade de diferentes linhagens fúngicas em pupários de *C. capitata* (Imoulán; Alaoui; El Meziane, 2011; Oreste et al., 2015; Hallouti et al., 2020).

Para a mortalidade total dos adultos emergidos após a imersão dos pupários, verificou-se que nossos resultados foram próximos aos obtidos por Beris et al. (2013). Eles observaram eficácias de 43,1%, 47,9% e 33,1% para *B. bassiana*, *C. fumosorosea* e *M. anisopliae*, respectivamente. No bioensaio através do solo contaminado, também foram registradas taxas de mortalidade de adultos com crescimento micelial para as duas doses testadas. Esses resultados foram observados por Globe et al. (2011) ao verificarem mortalidades que variaram de 1% a 33% com *M. anisopliae* (FCM Ar-23B3) e *B. bassiana* (G01R11). O tratamento com *M. anisopliae* atingiu a maior mortalidade de adultos com micélio, corroborando com Soliman et al. (2020), que observaram esse mesmo comportamento em diferentes estágios da mosca do Mediterrâneo.

Nas avaliações realizadas neste estudo, observaram-se diversos sintomas nas pupas tratadas, incluindo pupários necróticos, pupários encolhidos, pupas com falhas na emergência ou emergências incompletas. Esses mesmos sintomas foram relatados por Gul et al. (2015) quando eles avaliaram o efeito de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *C. fumosorosea* sobre pupários de *B. zonata*.

Esses sintomas indicam que as linhagens fúngicas testadas têm potencial para afetar negativamente o desenvolvimento das pupas e, conseqüentemente, a emergência dos adultos. Isso sugere que essas linhagens podem ser eficazes como agentes de controle biológico contra as pragas-alvo, incluindo *C. capitata*.

De maneira geral, ficou evidenciado que os pupários de *C. capitata* são menos suscetíveis aos FEs em comparação com os adultos (Quesada-Moraga; Ruiz-García; Santiago-Álvarez, 2006; Qazzaz et al., 2015). Essa menor susceptibilidade pode ser atribuída à idade das pupas, considerada um fator importante para aumentar o grau de virulência dos FEs (Dimbi; Maniania; Ekesi et al., 2013). Estudos confirmam que a emergência de adultos de *C. capitata* provenientes de pupários tratados aumenta até três vezes mais quando pupas de 4 a 6 dias de idade são utilizadas (Ekesi et al., 2002). Isso ocorre devido à esclerotização e endurecimento do tegumento das pupas, o que limita a penetração dos tubos germinativos dos fungos (Kaaya; Muninyi, 1995; Globe, 2011; Dimbi; Maniania; Ekesi, 2013).

A hipótese de que a idade da pupa influenciaria no grau de virulência sobre pupários de *C. capitata* foi confirmada por Imoulán, Alaoui e El Meziane. (2011). Eles observaram, através da aplicação tópica da linhagem *B. bassiana* (1×10^8), valores máximos de mortalidade entre 83,33% e 90,0% em pupários de 1 dia de idade. Essa suposição também foi apoiada por Soliman et al. (2014), que obteve altas taxas de mortalidade de 94,4% em pupários de mesma idade de *C. capitata* ao utilizar *M. anisopliae*. A explicação para essas altas mortalidades está relacionada ao fato de que os pupários com um dia de idade apresentam a cutícula mais macia, favorecendo a penetração dos tubos germinativos dos FEs, tornando-os mais suscetíveis à infecção (Beris et al., 2013).

Os pupários utilizados nos experimentos deste estudo tinham três dias de idade, o que pode ter sido uma das razões para a obtenção de níveis moderados de patogenicidade observados nos diferentes tratamentos, considerando as doses testadas e os métodos de aplicação.

Nos três bioensaios realizados, foi comprovado que a pós emergência de adultos, pode atingir taxas de mortalidades elevadas, associados com índices de crescimento micelial, essa hipótese foi confirmada por vários autores em *C. capitata* (Dimbi et al., 2003; Ekesi et al.,

2007; Beris et al, 2013). Isso pode ser explicado, que no momento da emergência, as moscas ficam expostas a resíduos dos conídios ativos presentes no tegumento do pupário, ou também pela penetrabilidade dos fungos nos pupários antes da emergência dos adultos. Esse padrão de transmissão de pós-emergência, foi relatada em outras espécies de tefritídeos *Ceratitis fasciventris* Bezzi (Diptera: Tephritidae) e *Ceratitis cosyra* Walker (Diptera: Tephritidae) (Ekesi et al., 2002).

A esporulação pós-emergência de fungos em adultos originados de pupários tratados pode se mostrar uma ferramenta promissora no manejo integrado dos tefritídeos, especialmente quando aplicada via solo. Os adultos emergidos podem contribuir para a disseminação dos conídios e também para a transmissão horizontal dos conídios não contaminados durante o acasalamento com indivíduos contaminados (Beris et al., 2013; Kisaakye et al., 2021). Para o tratamento controle, não foram observados pupários com presença de micélio, e quanto aos adultos emergidos, não houve mortalidade das moscas até o final dos bioensaios.

Este estudo fornece informações importantes para o controle dos estágios imaturos (fase pupa) dos tefritídeos através do uso de FEs. Nossos resultados sugerem que mais estudos devem ser realizados com *C. javanica* para o controle de *C. capitata*, avaliando os efeitos letais e subletais nos diferentes estágios dessa praga.

5. CONCLUSÕES

As quatro espécies de fungos avaliadas, apresentaram efeito de controle de pupários de *C. capitata* nos diferentes métodos de exposição.

Para os métodos de contaminação direta (tópico e imersão), os melhores resultados foram observados na dose maior.

A esporulação em pupários foi observada apenas em *C. javanica*, enquanto a esporulação pós emergência foi observada em todas as linhagens testadas.

No método pelo solo contaminado, o fungo *M. anisopliae* apresentou os melhores resultados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELLAH, A. M. et al. Efficacy of a Sudanese strain of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* Met. sorokin on puparia of *Bactrocera dorsalis* Hendel, under laboratory conditions. **Sustainable Management of Invasive Pests in Africa**, v. 14, p. 73-78, 2020.
- ALI, A. et al. Soil application of *Beauveria bassiana* to control *Ceratitis capitata* in semi field conditions. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v. 74, n. 2, p. 357-361, 2009.
- ALMEIDA, José EM et al. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi and nematode on medfly *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). **BioAssay**, v. 2, n. 7, p. 1-7, 2007.
- BERIS, E. I. et al. Pathogenicity of three entomopathogenic fungi on pupae and adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Pest Science**, v. 86, n. 2, p. 275-284, 2013.
- BIDOCHKA, M. J.; KASPERSKI, J. E.; WILD, G. AM. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. **Canadian Journal of Botany**, v. 76, n. 7, p. 1198-1204, 1998.
- BLANGO, M. G.; KNIEMEYER, O.; BRAKHAGE, A. A. Conidial surface proteins at the interface of fungal infections. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 9, p. 1–8, 2019.
- BOARI, A.; ZUCCARI, D.; VURRO, M. “Microbigation”: Delivery of biological control agents through drip irrigation systems. **Irrigation Science**, v. 26, n. 2, p. 101–107, 2008.
- DIMBI, S. et al. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera: Tephritidae). **Mycopathologia**, v. 156, n. 4, p. 375-382, 2003.
- DIMBI, S.; MANIANIA, N. K.; EKESI, S. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* in fruit flies and effect of fungal infection on egg laying and fertility. **Insects**, v. 4, n. 2, p. 206-216, 2013.
- EKESI, S.; MANIANIA, N. K.; LUX, S. A. Mortality in three African tephritid fruit fly puparia and adults caused by the entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 12, n. 1, p. 7–17, 2002.
- EKESI, S.; MANIANIA, N. K.; LUX, S. A. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 83, n. 2, p. 157-167, 2003.
- EKESI, S. et al. Effect of soil application of different formulations of *Metarhizium anisopliae* on African tephritid fruit flies and their associated endoparasitoids. **Biological Control**, v. 35, n. 1, p. 83-91, 2005.

EKESI, S. et al. The role of entomopathogenic fungi in the integrated management of fruit flies (Diptera: Tephritidae) with emphasis on species occurring in Africa. **Use of entomopathogenic fungi in biological pest management**, p. 239-274, 2007.

GARRIDO-JURADO, I. et al. Soil properties affect the availability, movement, and virulence of entomopathogenic fungi conidia against puparia of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**, v. 58, n. 3, p. 277-285, 2011.

GAVA, C.A. T. et al. Applying local entomopathogenic fungi strains to the soil can control *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) Wiedemann adults. **Biocontrol Science and Technology**, v. 30, n. 2, p. 103-115, 2020.

GAVA, C.A.T. et al. Impact of soil texture on conidia movement and residual effect of entomopathogenic fungi applied through irrigation to control fruit-fly pupae in mango orchards. **Biological Control**, v. 163, p. 104559, 2021.

GOBLE, T. A. et al. Investigation of native isolates of entomopathogenic fungi for the biological control of three citrus pests. **Biocontrol Science and Technology**, v. 21, n. 10, p. 1193-1211, 2011.

GUL, H. T. et al. Vulnerability of different life stages of *Bactrocera zonata* (Tephritidae: Diptera) against entomogenous fungi. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 47, n. 2, p. 307- 317, 2015.

HALLOUTI, A. et al. Diversity of entomopathogenic fungi associated with Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)) in Moroccan Argan forests and nearby area: impact of soil factors on their distribution. **BMC ecology**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2020.

HALLOUTI, A. et al. Evaluation of Native Entomopathogenic Fungi Isolates for Microbial Control of the Mediterranean Fruit Fly (*Ceratitis Capitata* (Diptera: Tephritidae)) Pupae and Adults. **Sumerianz Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 153-164, 2021.

HINTÈNOU, M. V. et al. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) isolates against life stages of *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 33, n. 1, p. 45, 2023.

HUSSEIN, M. A. et al. Evaluation of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on peach fruit Fly, *Bactrocera zonata* (Saunders) (Diptera: Tephritidae). **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, F. Toxicology & Pest Control**, v. 10, n. 1, p. 59-68, 2018.

IMOULAN, A.; ALAOUI, A.; EL MEZIANE, A. Natural occurrence of soil-borne entomopathogenic fungi in the Moroccan Endemic forest of *Argania spinosa* and their pathogenicity to *Ceratitis capitata*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 2619-2628, 2011.

KAAYA, G. P.; MUNYINYI, D. M. Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina spp.*) at developmental sites. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 66, n. 3, p. 237-241, 1995.

KEPLER, R. M. et al. A phylogenetically-based nomenclature for *Cordycipitaceae* (Hypocreales). **IMA Fungus**, v. 8, n. 2, p. 335–353, 2017.

KISAAKYE, J. et al. Evaluation of the entomopathogenic potential of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Isaria fumosorosea* for Management of *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). **Agriculture**, v. 11, n. 12, p. 1290, 2021.

MOHSIN, A. K.; HAMAD, B. SH; HANAWI, M. J. Susceptibility of *Ceratitis Capitata* (Wied) larvae and pupae to entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae*, and *Heterorhabditis bacteriophora*. **HIV Nursing**, v. 23, n. 3, p. 1642–1645, 2023.

ORESTE, M. et al. Effect of *Beauveria bassiana* strains on the *Ceratitis capitata* -*Psytalia concolor* system. **Bull Insectol**, v. 68, n. 2, p. 265-272, 2015.

QAZZAZ, F. O. et al. Effectiveness of *Beauveria bassiana* native isolates in the biological control of the Med-iterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*). **Advances in Entomology**, v. 3, n. 02, p. 44, 2015.

QUESADA-MORAGA, E.; RUIZ-GARCÍA, A.; SANTIAGO-ALVAREZ, C. Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of economic entomology**, v. 99, n. 6, p. 1955-1966, 2006.

QUESADA-MORAGA, E. et al. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. **Mycological Research**, v. 111, n. 8, p. 947-966, 2007.

RATH, A. C.; KOEN, T. B.; ROWE, B. A. Long-term field efficacy of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* against the subterranean scarab, *Adoryphorus couloni*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 5, n. 4, p. 439–452, 1995.

RUDEEN, M. L. et al. Entomopathogenic fungi in cornfields and their potential to manage larval western corn rootworm *Diabrotica virgifera*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, n. 3, p. 329–332, 2013.

SOLIMAN, N. A. et al. Entomopathogenic nematodes and fungi as bioControl agents for the peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saunders) and the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) soil borne-stages. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 24, n. 2, p. 497, 2014.

SOLIMAN, N. A. et al. Pathogenicity of three entomopathogenic fungi against the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 1, p. 1-8, 2020.

USMAN, M. et al. Virulence of entomopathogenic fungi to *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) and interactions with entomopathogenic nematodes. **Journal of Economic Entomology**, v. 113, n. 6, p. 2627-2633, 2020.

USMAN, M. et al. Evaluation of locally isolated entomopathogenic fungi against multiple life stages of *Bactrocera zonata* and *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae): Laboratory and field study. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, p. 1791, 2021.

WANG, D. et al. Susceptibility of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) pupae to entomopathogenic fungi. **Applied Entomology and Zoology**, v. 56, n.2, p. 269-275, 2021.

ZIMMERMANN, G. The 'Galleria bait method' for detection of entomopathogenic fungi in soil. **Journal of Applied Entomology**, v. 102, n. 1-5, p. 213-215, 1986.