

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA



Dissertação

**Potencial de nematoides entomopatogênicos para controle de
Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae)**

José Junior dos Santos

Pelotas, 2019

José Junior dos Santos

**Potencial de nematoides entomopatogênicos para controle de
Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Pelotas da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Entomologia.

Orientador: Dr. Flávio Roberto Mello Garcia

Coorientadora: Dra. Andressa Lima de Brida

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S237 Santos, José Junior dos

Potencial de nematóides entomopatogênicos para controle de *Drosophila suzukii* (Diptera: drosophilidae) / José Junior dos Santos ; Flavio Roberto Mello Garcia, orientador ; Andressa Lima de Brida, coorientadora. — Pelotas, 2019.

51 f. : il.

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

1. Neps. 2. Controle biológico. 3. Mosca-das-as-s-manchadas. 4. Patogenicidade. 5. Virulência. I. Garcia, Flavio Roberto Mello, orient. II. Brida, Andressa Lima de, coorient. III. Título.

CDD : 595.774

Banca examinadora:

Dra. Andressa Lima de Brida (Coorientadora)

Dr. Daniel Bernardi

Dr. Edison Zefa

Dr. Uemerson Silva Cunha

Dr. Flávio Roberto Mello Garcia (Orientador)

Dedico este trabalho aos meus pais Dione dos Santos e José dos Santos, por acreditarem em minhas buscas, me apoiando em todos os momentos. Em memória de meu avô Valdomiro Mattos da Silva.

Agradecimentos

Ao meu orientador Dr. Flavio Roberto Mello Garcia, por ter estendido a mão e acreditado nesse trabalho.

Agradeço a minha Coorientadora Dra. Andressa Lima de Brida por toda ajuda prestada, dedicação e paciência para a conclusão desta dissertação. Com admiração e respeito por seu trabalho, agradeço a oportunidade de ter convivido contigo e a todo crescimento que tive como pessoa e pesquisador.

Aos Doutores Silvia Renata Siciliano Wilcken e Luis Garrigos Leite, pela disponibilização dos isolados utilizados.

Ao Dr. Daniel Bernardi pela disponibilidade de ajudar com as análises estatísticas.

A toda equipe do LABEL, colegas e amigos.

A Rosane Maria Brandão pela compreensão e atenção ao me receber na Casa do Estudante Universitário. Sem essa oportunidade eu não estaria em Pelotas.

Não por menos, agradeço ao apoio que tive dos amigos conquistados em Pelotas, em especial a todos que dividiram espaços comigo e me suportaram nos momentos mais difíceis. Sem o amor de vocês eu nada seria.

Sou grato pelas oportunidades e pessoas que conheci ao percorrer essas trilhas.

Koba laroie Èsù!

***“Se soubessem tudo o que passei pra chegar
até aqui, esse título seria meu por outorga”***

José Junior dos Santos

Resumo

SANTOS, José Junior dos. **Avaliação do potencial de nematoides entomopatogênicos a *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae).** 2019. Dissertação (mestrado) Programa de Pós-graduação em Entomologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas – RS, Brasil.

Drosophila suzukii (Matsumura, 1931) representa uma das principais pragas associadas a produção de frutas pequenas no Brasil. É conhecida popularmente por sua preferência a frutos de tegumento frágil e causa grandes prejuízos na fruticultura. O uso de agentes biológicos se mostra muito promissor no controle do inseto, dessa forma o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial de nematoides entomopatogênicos em diferentes concentrações e temperaturas sobre a mortalidade de pupas de *D. suzukii*, e os efeitos na longevidade de adultos. Os bioensaios foram divididos em 3 etapas, teste de patogenicidade de *Steinernema rarum* PAM 25 e *Steinernema glaseri* 1J, na concentração de 1000 juvenis infectantes (JIs), inoculados em 5 pupas de *D. suzukii* (MATSUMURA 1931) com aproximadamente 48 horas de idade, o experimento foi constituído por recipientes de plásticos (200 mL) contendo 50g de areia seca e autoclavada com 5% de umidade, acondicionadas em BODs a 25°C, 80% UR, fotoperíodo de 12 horas. No segundo bioensaio avaliamos a influência da concentração e temperatura na mortalidade de *D. suzukii*. O experimento foi conduzido com seis tratamentos (1500, 2000, 2500, 3000 e 4000) com 10 repetições nas temperaturas de 14, 22 e 25 °C. No terceiro bioensaio avaliamos a influência da presença no isolado e sua patogenicidade no tempo de vida do adulto. Para este experimento usamos a concentração com maior índice de mortalidade de cada temperatura sendo, 14°C 4000 JIs/mL, 22°C 1500 JIs/mL, 25°C 2000 JIs/mL. Para ambos os experimentos, o controle foi constituído com as mesmas configurações, porém, sem nematoide. As avaliações foram realizadas diariamente no decorrer de sete dias após a inoculação. Os adultos infectados com *S. rarum* PAM 25 apresentaram longevidade em médias de 5,18 dias a 14°C, 6,26 dias a 22 °C e 6,79 dias a 25°C dias. Houve diferença significativa entre o grupo controle em todas as temperaturas, porém não há diferença se comparadas entre elas.

Palavras-chave: NEPs. Controle biológico. Mosca-das-asas-manchadas. Patogenicidade. Virulência.

Abstract

SANTOS, José Junior dos .**Potential's evaluation of entomopathogenic nematodes to *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae)**. 2019. Thesis (masters) Graduate program in Entomology. Federal University of Pelotas. Pelotas – RS, Brazil.

Drosophila suzukii (Matsumura, 1931) represents one of the main plagues associated with the production of small fruits in Brazil. It is popularly known by preference towards fragile integument fruits and causing large damage to fruit harvesting. The use of biological agents shows to be very promising in controlling the insect, this way the goal of this work was to evaluate the potential of nematodes in different concentrations and temperatures over the mortality of *D. suzukii* pupae and effects on its adults' longevity. Bioassays were divided into 3 steps, *Steinernema rarum* PAM 25 and *Steinernema glaseri* J1 pathogenicity test, in the concentration of 1000 infective juveniles, inoculated in 5 pupae of *Drosophila suzukii* (MATSUMURA 1931) with approximately 48 hours of age, the experiment was constituted by plastic recipients (200 mL) containing 50g of dry sand and autoclaved with 5% humidity, stored in BODs at 25°C, 80% RH, 12 hours photoperiod. In the second bioassay, we evaluated the influence of concentration and temperature on *D. suzukii* mortality. The experiment counted six treatments (1500, 2000, 2500, 3000 and 4000) with 10 repetitions on 14, 22 and 25 °C of temperature. In the third bioassay, we evaluated the influence of presence on isolation and it's pathogenicity on an adult's life. For this experiment, we used the concentration with the highest mortality rate for each temperature which are, 14°C 4000 IJs/mL, 22°C 1500 IJs/mL, 25°C 2000 IJs/mL. For both experiments, the control was constituted with the same settings, though, without nematodes. The evaluations were realized on a daily basis for seven days after the inoculation. The infected adults with *S. rarum* PAM 25 presented a longevity average of 5.18 days at 14°C, 6.26 days at 22 °C and 6.79 days at 25°C. There was a significant difference between the control groups in all temperatures, although there is no difference if compared to each other.

Palavras-chave: EPNs, Biological control. Spotted-wing. Pathogenicity,

Virulence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Longevidade de adultos de <i>Drosophila suzukii</i> após a aplicação de <i>S. rarum</i> nas temperaturas de 14, 22, 25 °C.....	32
-----------------	--	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Mortalidade confirmada em pupas de <i>Drosophila suzukii</i> após a aplicação de <i>S. rarum</i> nas temperaturas de 14, 22, 25 °C.....	30
Tabela 2	Estimativa da CL 50 e CL 90 (JIS / mL) e intervalo de confiança (CL 95%) de nematoides entomopatogênicos em pupas de <i>Drosophila suzukii</i> em diferentes temperaturas.....	31

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. OBJETIVOS	21
3. HIPÓTESES	21
Artigo 1 – Patogenicidade de <i>Steinernema rarum</i> PAM 25 (Rhabditida: Steinernematidae) a <i>D. suzukii</i> (Diptera: Drosophilidae) e seu efeito na longevidade dos adultos	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1 Local e criação e manutenção de <i>Drosophila suzukii</i>	25
2.2 Manutenção e multiplicação das espécies de NEPs	25
2.3 Patogenicidade e virulência de NEPs a pupas de <i>D. suzukii</i>	26
2.4 Influência da concentração de NEPs e da temperatura na mortalidade de <i>D. suzukii</i>	26
2.5 Longevidade de adultos <i>D. Suzukii</i> pós-infecção de JIs de <i>S. rarum</i> PAM 25.....	27
2.6 Análise estatística	28
3. RESULTADOS	28
3.1 Patogenicidade e virulência de NEPs a pupas de <i>D. suzukii</i>	28
3.2 Influência da concentração de <i>S. rarum</i> PAM 25 e da temperatura na mortalidade de <i>D. suzukii</i>	28
3.3 Longevidade de adultos <i>D. suzukii</i> pós infecção de <i>S. rarum</i>	29
4. DISCUSSÃO	32
5. CONCLUSÃO	35
6. REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO GERAL

A fruticultura brasileira produz uma grande variedade de espécies frutíferas e possui condições climáticas favoráveis para produzir e exportar durante todas as estações do ano, produção que em 2017 foi estimada em 43,5 milhões de toneladas (KIST et al., 2018). Dentre as diversas espécies produzidas os frutos mais consumidos do mercado nacional e internacional são bananas (*Musa* spp.), laranjas (*Citrus* spp.), maçãs (*Malus domestica*) e morangos (*Fragaria* spp.), sendo espécies que apresentam grande adaptação ao clima tropical e subtropical (SEAB, 2012).

Referente à produção de frutas pequenas, o Brasil está entre os três países que mais produzem, destacando-se os cultivares de amora-preta (*Rubus* spp.), morango (*Fragaria* spp. L.), mirtilo (*Vaccinium* spp.), uva (*Vitis vinifera* L) e framboesa (*Rubus* spp.) (KIST et. al. 2018). O crescimento do mercado de pequenas frutas se apresenta como mais uma oportunidade para o fruticultor brasileiro diversificar a produção e obter bons lucros (LOPES et al., 2016).

A exportação de frutas *in natura* é muito inferior em relação à capacidade de produção, apenas 9% (ABRAFRUTAS, 2017). Os valores para exportação são poucos expressivos, devido aos processos burocráticos fitossanitários, e implementações de medidas obrigatórias para evitar possíveis infestações de insetos pragas (GARCIA et al., 2017).

Ambientes de monocultura são favoráveis a espécies que apresentam potencial de se tornarem uma população em desequilíbrio (ALTIERI; NICHOLLS, 2018). Estas espécies exibem capacidade de uso pioneiro de habitat, várias gerações em um curto tempo, altas taxas de fertilidade, crescimento rápido, corpo pequeno e nas mais diversas situações os indivíduos podem ajustar-se fisiológica ou morfológicamente ao longo de gerações, caracterizando assim seu sucesso como invasor (ROSECCHI et al., 2001).

Na fruticultura, dentre os complexos de pragas, a família Tephritidae (Ordem: Diptera) popularmente chamadas de mosca-das-frutas, são conhecidos por causarem grandes perdas econômicas em cultivares (GARCIA, 2012).

A família Drosophilidae é amplamente distribuída por todo mundo, exibe uma grande representatividade de espécies, ocupam diversos nichos e

possuem capacidade de viver nas mais variadas condições climáticas (MARKOW; O'GRADY, 2006). Na família Drosophilidae são registradas aproximadamente quatro mil espécies, sendo quase metade pertencente ao gênero *Drosophila* (DAVID; TSACAS, 1981; SCHLESENER et al., 2015).

A *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) teve possível origem no sudoeste asiático e foi descrita por Matsumura (1931), que descreveu toda sua morfologia e estágios de desenvolvimento, embora já mencionada antes por Kansawa (1916) em cerejeiras (*Eugenia involucrata* D.C.). A *D. suzukii* é considerada endêmica em diversos países asiáticos como China, Taiwan, Coreia do Norte, Coreia do Sul, Paquistão, Mianmar, Tailândia, Rússia e Índia (CINI et al., 2012). Em 1980 houve o primeiro registro da espécie fora do continente Asiático, em Oahu, Havaí, e posteriormente em outras ilhas havaianas coletadas através de iscas de banana com cogumelo e varredura vegetal (O'GRADY, 2002). Em 1997 e 1998 a espécie já havia sido registrada na Costa Rica e Equador em coleções entomológicas (HAUSER, 2011).

Os primeiros registros na América do Norte ocorreram entre 2008 e 2010, onde a espécie foi associada a grandes perdas econômicas em cultivares de pequenos frutos nos Estados Unidos da América, e em menores proporções no Canadá (WALSH et al., 2011). Nos anos seguintes de 2010 e 2011, dispersou-se rapidamente por países da Europa, tendo suas primeiras ocorrências descritas na Itália em cultivares de amora (*Rubus* sp.), capturada através de armadilhas com iscas (HAUSER, 2011; CALABRIA, 2011; CINI et al., 2012).

A maioria dos adultos desse gênero se alimenta de fungos e bactérias associados a frutos em decomposição ou sedimentos orgânicos em processo de decomposição, onde também depositam seus ovos, e após eclosão servem de alimento para as larvas (O'GRADY, 2002). Entretanto, a espécie *D. suzukii*, popularmente conhecida como mosca-da-cereja na Ásia, mosca-da-asa-manchada ou mosca-do-vinagre nas Américas, destaca-se por ser uma exceção por seu comportamento de ovipositar em frutos intactos (FUNES et al., 2018).

A preferência por pequenos frutos de tegumento frágil se estende a todos os níveis de maturação, desde verdes, maturação média e extremamente madura (LEE et al., 2011). Os danos no fruto são causados pelas fêmeas que

através de seu ovipositor serrilhado abrem perfurações no tegumento, possibilitando a entrada de fungos e bactérias causando infecções secundárias, além de ter a polpa danificada pelas larvas da mosca (DREVES et al., 2009; MARÍN, 2015).

A *D. suzukii* apresenta afinidade com diversas frutíferas, em especial com as pertencentes da família Rosaceae, que são comuns em pomares (SENASICA, 2013). Além de frutíferas comerciais e frutos silvestres das famílias Actinidaceae: Kiwi (*Actinidia* spp.) (DREVES et al., 2009), Ebenaceae: Caqui (*Diospyrus kaki*) (Kanzawa, 1935) Myrtaceae: Pitanga (*Eugenia uniflora*) (FDACS, 2010), Araçá (*Psidium cattleianum*) (Kido et al., 1996), Goiaba (*Psidium guajava*) (NUNES et al., 2014), Rutaceae: Laranjas (*Citrus* spp.) (FDACS, 2010; WALSH et al., 2011), Solanaceae: Tomate (*Lycopersicon esculentum*) (FDACS, 2010), também podem utilizar plantas ornamentais como hospedeiros alternativos quando o hospedeiro preferencial está ausente no pomar (ARNÓ et al., 2016; KENIS et al., 2016; LEE et al., 2015).

Além disso, esta espécie apresenta preferência por ambientes com umidades mais elevadas variando de 20 a 90% UR (HAUSER et al., 2009), justificando sua presença e chances de sucesso na propagação nos cultivos da região sul do Brasil (DEPRÁ et al., 2014).

No ano de 2013 os primeiros registros aconteceram no sul do Brasil no estado do Rio Grande do Sul no município de Vacaria em cultivos de morangueiro, sendo mais tarde registrada em outros municípios, Osório, Vila Maria, Erechim, Canguçu, Pelotas, Morro Redondo e Capão do Leão (DEPRÁ et al., 2014; SANTOS, 2014).

Os adultos de *D. suzukii* apresentam dimorfismo sexual com comportamentos de corte no acasalamento, são altamente férteis e estão aptos há reproduzir dois dias após emergência (MILLER et al., 2017). As fêmeas além de serem maiores que os machos, não possuem manchas nas asas, e em relação a outros drosophilídeos, seu ovipositor é sete vezes maior, serrilhado, estreito, com dentes esclerotizados robustos, permitindo a inserção dos ovos dentro dos frutos (WALSH et al., 2011; HAUSER, 2011). É uma espécie muito fértil, podendo depositar até 384 ovos durante toda sua vida e centenas de ovos antes do período de diapausa (HAMBY et al. 2016).

Seu ciclo de vida é curto, podendo apresentar várias gerações ao ano, variando de acordo com as condições ambientais e com tempo de vida estimado entre 21 a 63 dias em temperaturas maiores que 10 °C e menores que 30 °C (DIEPENBROCK, 2016; MILLER et al., 2017). As larvas possuem tempo de eclosão de 24 a 72 horas após oviposição, chegando ao último instar em 13 dias (DAFF, 2013). O período de pupa ocorre geralmente dentro do fruto, podendo eventualmente ocorrer no solo, e a duração desse período é de três a 15 dias (DAFF, 2010).

Um dos principais obstáculos na aplicação de métodos para o controle da *D. suzukii* é devido sua capacidade de adaptação a hospedeiros tendo comportamento oportunista, ecologia versátil, período de diapausa e ciclo de vida rápido (WALSH et al., 2011; CINI et al., 2012; BREWER et al., 2012). Dentre as estratégias de manejo, o monitoramento é a primeira ferramenta a ser utilizado no controle de pragas (LEE et al., 2011). Este método é basicamente voltado à manutenção dos pomares, observação de frutos e monitoramento de possíveis hospedeiros para *D. suzukii* (DREVES; RHODALACK, 2011; BRUCK et al., 2011).

A utilização de armadilhas contendo atrativos alimentares ou atrativos com feromônios, atraindo os insetos em busca de alimento, parceiros sexuais e oviposição são as mais utilizadas como medidas de controle e mensuração de infestações de *D. suzukii* (LANDOLT et al., 2011),

Entretanto, após aferir o nível de infestação, o método de controle mais utilizado para mosca-das-frutas (Família Tephritidae), é através da pulverização de inseticidas organofosforados, piretróides ou espinosinas (BEERS et al., 2011). Os inseticidas registrados para cerejeiras apresentaram alta eficiência no controle de adultos de *D. suzukii* chegando a quase 100% de mortalidade (BRUCK et al., 2011).

Os mesmos produtos utilizados para controle de outras espécies de dípteros de importância agrícola têm eficiência no controle de *D. suzukii* (SWEENEY, 2014). Porém, no Brasil para *D. suzukii* ainda não existe registro de inseticidas para nenhuma cultura (GARCIA et al., 2017). Estes métodos utilizando inseticidas para controle de *D. suzukii*, foram testados em laboratório no Brasil, apresentando mortalidade de 100% em adultos ou inviabilizando ovos (SCHLESENER et al., 2017).

Entretanto os inseticidas químicos apresentam pouca especificidade para determinadas espécies, causando grande impacto nas comunidades de insetos não alvos, por exemplo, polinizadores, inimigos naturais, decompositores ou demais grupos de invertebrados com importante papel ecológico (CAPRILE et al., 2014). Assim como as demais pragas associadas à fruticultura, as espécies do gênero *Drosophila* também apresentam predisponibilidade a desenvolverem mecanismos de resistência a certos inseticidas, acarretando em uma baixa eficácia, seleção de organismos resistentes e aumento de dosagens para seu controle, além de acumular nos recursos naturais e em longo prazo se tornar nocivo a outros organismos (BRUCK et al., 2011; CINI et al., 2012; LANTEREN et al., 2017).

Diante dos efeitos nocivos da utilização de inseticidas para controle de pragas e excessiva procura por alimentos livres de toxinas, os métodos alternativos para supressão de espécies consideradas pragas vêm ganhando atenção no mercado (GARCIA et al., 2017). A partir desse contexto as técnicas de controle biológico se apresentam como uma alternativa promissora, pois além de serem eficientes são inofensivos aos humanos e ao ambiente (LANTEREN et al., 2017).

Há uma grande diversidade de organismos que podem ser utilizados como agentes de biocontrole, como, fungos, bactérias, vírus, predadores, parasitoides e nematoides que apresentam potencial para introdução em possíveis programas de manejo integrado para o controle de *D. suzukii* (SCHLESENER, 2017b). A compatibilidade de alguns micro-himenópteros parasitoides, como, *Ganaspis*, *Leptopilina* (Hymenoptera, Figitidae) e *Trichopria* (Hymenoptera, Diapriidae) têm sido estudadas (CINI et al., 2012; NOMANO et al., 2015). Entretanto, há dificuldade de se obter parasitoides de ovos e larvas para *D. suzukii*, considerando que no estágio de ovo e larva da mosca, ocorre geralmente no interior do fruto, dificultando o ataque desses agentes de controle biológico (KACSOH; SCHLENKE, 2012).

Pesquisas com predadores para controle de *D. suzukii*, ainda é escasso. As espécies de predadores comercialmente disponíveis *Orius majusculus* (Reuter, 1879), *Orius laevigatus* (Fleber, 1860) (Hemiptera, Anthocoridae), *Atheta coriaria* (Kraatz, 1856) (Coleoptera, Staphylinidae), *Hypoaspis miles* (Berlese, 1892) (Acari, Laelapidae) e *Anthocoris nemoralis* (Fabricius, 1794)

(Hemiptera, Anthocoridae) foram testadas em larvas, pupas e adultos de *D. suzukii* em laboratório, entretanto, nenhum dos predadores tiveram número significativo de mortalidade, sendo incapazes de controlar efetivamente (CUTHBERTSON et al., 2014).

Outros organismos entomopatogênicos são os fungos e bactérias que tem sido pesquisados para fins de supressão de *D. suzukii*. Os fungos *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & W. Gams e *Beauveria bassiana* (Bals-Criv.) Vuill, causam uma redução em populações de *D. suzukii* em condições de laboratório, porém, não houve diferença significativa na emergência de adultos entre os tratamentos e o controle (CUTHBERTSON et al., 2014). A contaminação por *Wolbachia* spp feita em laboratório, apresentou uma baixa na população da mosca, pois seus efeitos incluem a redução da fecundidade das fêmeas de *D. suzukii* (TOCHEN et al., 2014).

Dos diversos organismos utilizados no controle biológico, os nematoides entomopatogênicos (NEPs) vem despertando atenção nos programas de manejo integrado de pragas (MIP) destacando-se por sua eficiência no controle de insetos pragas e sua permanência em campo (PARRA et al., 2002; GAUGLER et al., 2002; ZYL; MALAN, 2014).

Os NEPs são considerados organismos exclusivos do solo podendo ser encontrados em todo globo terrestre, em áreas agrícolas, florestas, fundo do mar, geleiras, deserto (GREWAL, 2000; SUBRAMANIAN; MUTHULAKSHMI, 2016).

No controle de pragas apresentam sucesso de interação, pois, seus hábitos biológicos e associações com bactérias simbiotes e mutualísticas do gênero *Xenorhabdus* Thomas & Poinar, 1979 e *Photorhabdus* Louis & Kuhl, 1983, permitem eficiência na mortalidade de insetos (DOLINSKI et al., 2006). Os NEPs apresentam o comportamento de busca ativa por hospedeiro e eficiente capacidade de permanência no solo, características exclusivas de seu ciclo de vida rápido que pode envolver uma ampla gama de hospedeiros (GREWAL et al., 2001).

O ciclo de vida dos nematoides após a eclosão do ovo apresenta quatro estádios juvenis (J1, J2, J3 e J4), considerando que o J3 é a forma infectante e o único e que caminha de formam livremente no solo em busca do hospedeiro (RITZINGER et al., 2010).

Os (J3) penetram no corpo dos hospedeiros através de estruturas que permitem perfurar a cutícula do inseto ou se aproveitam de orifícios naturais de seus hospedeiros, como boca, ânus ou espiráculos (GAUGLER et al., 2002). Após instalarem dentro do hospedeiro, liberam as bactérias na hemocèle, causando a morte por septicemia de 24 a 48 horas podendo chegar até 72 horas (GUTIÉRREZ; GONZÁLES, 2010). Essas bactérias quando liberadas servem de alimento para os próprios nematoides, que após termino do recurso, abandonam o cadáver do inseto e buscam um novo hospedeiro (CHASTON; GOODRIH-BLAIR, 2010).

A família Heterorhabditidae é representada por 20 espécies sendo os nematoides do gênero *Heterorhabditis* (Poinar, 1976) simbioses com bactérias do gênero *Photorhabdus* sp (Louis & Kuhl, 1983) (POINAR, 1990). São capazes de infectar os hospedeiros pelo tegumento, pois apresentam estruturas especializadas como dentes córneos localizados na região terminal da cabeça (BURNELL; STOCK, 2000). O ciclo de vida dessa família é composto por ovos, juvenis com quatro estádios e adulto, e possuem uma geração que apresenta hermafroditismo (NGUYEN, 2007; HOMINICK, 2002). No Brasil as primeiras espécies descritas do gênero *Heterorhabditis* foram *Heterorhabditis (Rhabditis) hambletoni* (Pereira, 1937) *Heterorhabditis* sp. foi relatado em citros no Estado de São Paulo (PAIVA; GARCIA; AGUILLERA, 2003) e *Heterorhabditis baujardi* (Phan et al., 2003) no Estado de Rondônia (PHAN et al., 2003; DEL VALLE; DOUCET, 2014). *Heterorhabditis amazonensis* (Andaló, 2006) foi descrita no Brasil no Estado do Amazonas (ANDALÓ; NGUYEN; MOINO JUNIOR, 2006).

A família Steinernematidae é composta por 62 espécies sendo os nematoides do gênero *Steinernema* (Travassos, 1927) simbioses com bactérias do gênero *Xenorhabdus* sp. (Thomas & Poinar, 1979) (POINAR, 1990). Atuam infectando os hospedeiros por aberturas naturais do corpo, como boca, ânus e espiráculos. O ciclo de vida dessa família é similar ao gênero *Heterorhabditis*, exceto pelo fato da primeira geração ter a formação de machos e fêmeas (SUBRAMANIAN; MUTHULAKSHMI, 2016).

Atualmente no Brasil tem - se realizado levantamentos em diversas regiões e culturas, sendo descritas duas novas espécies, como *H. amazonensis* (Andaló, Nguyen & Moino Jr., 2006) e *S. brasilense* (Nguyen et

al., 2010). Além destas espécies, sete espécies do gênero *Steinernema*: *S. australe* (Edgington, Buddie, Tymo, Hunt, Nguyen, France, Merino & Moore), *S. Diaprepesi* (Nguyen & Duncan), *S. feltiae* Filipjev, 1934), *S. glaseri* (Steiner, 1929), *S. puertoricense* (Roman & Figueroa, 1994), *S. rarum* (Doucet, 1986) e *S. riobrave* (Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994) e três espécies do gênero *Heterorhabdits*: *H. bacteriophora* (Poinar, 1976), *H. baujardi* (Phan; Subbotn; Nguyen; Moens, 2003) e *H. indica* Poinar, Karunakar, David, 1992, foram registradas (DOLINSKI *et al*, 2017).

Dentre as diversas espécies de NEPs já relatadas, *S. glaseri* e *S. rarum* são nematoides que devem ser considerados por apresentarem potencial entomopatogênico, podendo ser promissores no controle de *D. suzukii* (NGUYEN *et al.*, 2006; CAGNOLO; ALMIRAN, 2010; DOUCET; GRAYETTO, 1994). *Neoplectana glaseri*, ou mais conhecido pelo seu sinônimo *S. glaseri*, foi descrito por Steiner (1929). No Brasil, seu primeiro registro foi em ovos do bicudo-da-cana-de-açúcar, *Migdolus fryanulus* na Usina Amália em Santa Rosa de Viterbo, Estado de São Paulo (GAUGLER *et al.*, 1992; PIZANO *et al.*, 1985; BRIDA, 2015). Glaser e seus colaboradores descreveram o ciclo de vida, preferência por hospedeiros e modo de infecção, de *S. glaseri* e diante da sua persistência em campo, assegurou sua resposta positiva para ser isolado em laboratório (GLASER, 1932; GLASER *et al*, 1940), entretanto as exigências térmicas de *S. glaseri*, podem variar, em temperaturas menores a 10 °C não apresenta boas respostas de emergência e desenvolvimento em *Galleria mellonella*, (Lepidoptera: Pyralidae) já em 20, 22 e 25 °C apresenta um aumento gradativo de produção de JIs e emergências de seus hospedeiros (ZERVOS *et al.*, 1990).

Em trabalhos visando controle de dípteros, *S. glaseri* provocou mortalidade baixas em mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans* L.) (Diptera: Muscidae) e mosca-dos fungos *Bradysia mabiusi* Lane (Diptera: Sciaridae) (RODRIGUEZ-SOLANO *et al.*, 2004; LEITE *et al.*, 2007; TAVAREZ *et al.* 2012).

A espécie *Steinernema rarum* (Doucet) (DOUCET, 1986), foi isolado em amostras de solo em milharais na área de Rio Cuarto, província de Córdoba, Argentina, e também foi registrado na América do Norte no Mississippi (isolado J1) e outro em Louisiana (isolado 17C), sendo o primeiro relato desta espécie nos Estados Unidos (NGUYEN *et al.*, 2006). Essa espécie teve sua

patogenicidade e virulência avaliada em vários insetos-pragas como o bicudo do algodão (*Anthonomus grandis* Boh, 1843) (Coleoptera: curculionidae), Gorgulho-da-raíz (*Diaprepes abbreviatus* Linnaeus 1758) (Coleoptera: curculionidae), lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda* Smith, 1979) (Lepidoptera: noctuidae), formiga de fogo (*Solenopsis invicta*) (Hymenoptera: formicidae) e o cupim subterrâneo (*Coptotermes formosanus* Shiraki, 1909) (Blattodea: Rhinotermitidae), *Culex apicinus* Philippi e *Cullex pipens* L. (Diptera: Culicidae) apresentando mortalidade de 75% (CAGNOLO; ALMIRAN, 2010). *Culex quinquefasciatus* (Culicidae) com mortalidade 89,2 % (de DOUCET; GRAYETTO, 1994) *Musca domestica* L. (Muscidae) e *Ceratitis capitata* W. (Tephritidae) que se apresentam suscetíveis ao nematoide (de DOUCET et al. 1999).

Não há registro de estudos com *S. rarum* para controle de *D. suzukii*, porém as espécies *S. feltiae* (Filipjev, 1934), *S. carpocapsae* (Weiser, 1955) e *H. bacteriophora* (Poinar, 1976), permitiram mortalidade a pupas de *D. suzukii*, podendo reduzir em até 90% a emergência de adultos (CUTHBERTSON; AUDSLEY, 2016; HÜBNER et al., 2017). O isolado *H. bacteriophora* aplicado em culturas de morangueiro e mirtilheiros, juntamente com predadores naturais (*Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) e *Dalotia coriaria* (Coleoptera: Staphylinidae) reduziram a emergência de adultos de *D. suzukii* de 60 a 81% (RENKEMA; CUTHBERTSON, 2018).

Considerando a ocorrência da *D. suzukii* no Estado do Rio Grande do Sul, seu potencial de dispersão e propagação, juntamente com a ampla disponibilidade de alimento e condições climáticas favoráveis, a investigação da eficácia de agentes biológicos alternativos são importantes para os avanços de métodos de controle e supressão de *D. suzukii*. O uso de nematoides entomopatogênicos pode ser uma alternativa promissora no manejo integrado dessa praga.

2. OBJETIVOS

- Avaliar a patogenicidade de *Steinernema rarum* PAM 25 e *Steinernema glaseri* 1J a pupas de *Drosophila suzukii*;
- Verificar a influência da concentração de Juvenis Infectantes (JIs) de NEPs na mortalidade de pupas de *Drosophila suzukii* em diferentes temperaturas;
- Avaliar o efeito da temperatura na longevidade de adultos de *Drosophila suzukii* após a infecção de juvenis infectantes (JIs) de *Steinernema rarum* PAM 25 em pupas.

3. HIPÓTESES

- H¹ Nematoides entomopatogênicos são patogênicos a pupas de *D. suzukii*;
- H¹ O efeito da concentração de JIs de *S. rarum* PAM 25 sobre a mortalidade de *D. suzukii* é influenciada pela temperatura;
- H¹ A longevidade de adultos de *D. suzukii* é afetada, quando aplicado JIs de *S. rarum* PAM 25 em fase de pupa.

Artigo 1 – Patogenicidade de *Steinernema rarum* PAM 25 (Rhabditida: Steinernematidae) a *D. suzukii* (Diptera: Drosophilidae) e seu efeito na longevidade dos adultos

1. INTRODUÇÃO

Drosophila suzukii (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae) é uma praga polífaga que ataca diversas frutíferas e tem uma alta capacidade de disseminação (LEE et al., 2015). Esta praga causa prejuízos em pequenos frutos (DIEPENBROCK et al., 2017)., como; amoras (*Rubus* spp.), morangos (*Fragaria* spp.), mirtilo (*Vaccinium* spp.), uva (*Vitis vinifera* L) e framboesa (*Rubus* spp.) tendo também uma ampla variedade de hospedeiros alternativos para completar seu ciclo de vida (LEE et al., 2011).

A *D. suzukii*, assim como as demais espécies dentro da família Drosophilidae, responde de forma direta as influências causadas por variações na temperatura (DALTON et al., 2011). A temperatura pode o aumentar a população no início das estações quentes e diminuí-las em estações frias, podendo apresentar período de hibernação na fase adulta (KANSAWA, 1939; KIMURA, 2004).

Os danos causados pelas fêmeas da mosca-da-asa-manchada são ocasionados devido seu ovipositor grande e serrilhado que perfura o tegumento dos frutos para depositar seus ovos, abrindo a porta para infecções secundárias causadas por outros organismos como bactérias e fungos (BERRY, 2012). As depreciações causadas nos frutos pelas larvas, que se alimentam da polpa, é um fator importante a ser considerada na produção e exportação de frutas no Brasil, como já foram observadas em outros países, onde foram registradas perdas contabilizadas em aproximadamente US\$ 43 milhões no leste dos Estados Unidos da América, em cultivares de framboesa (*Rubus idaeus* L.) (GOODHUE, et al. 2011; BURRACK, 2014).

Considerando que *D. suzukii* apresenta o ciclo de vida curto podendo ter várias gerações ao ano, faz-se necessário buscar alternativas de controle desta praga (DEPRÁ et al., 2014; HAYE et al. 2016). Nessas circunstâncias o uso de inseticidas apresenta como uma medida rápida para seu controle, entretanto problemática, devido aos resíduos deixados nos frutos, recursos naturais e levar à seleção de indivíduos resistentes (GOODHUE et. al., 2011).

Um dos comportamentos comumente observados em *D. suzukii* é o abandono do sítio onde a larva se encontra, para empupar no solo, (WOLTZ; LEE, 2017). Neste contexto, visando o Manejo Integrado de Pragas, e alternativas sustentáveis ao meio ambiente e aos seres humanos, o uso de

nematoides entomopatogênicos (NEPs) apresenta-se como uma ferramenta promissora no controle biológico de pragas, pois são vermes terrestres que parasitam obrigatoriamente insetos para completar seu ciclo de vida (HOMINIK et al., 1996; BRIDA et al., 2018).

Os NEPs da família Steinernematidae, gênero *Steinernema* são registrados com uma ampla diversidade de hospedeiros, e são descritos em várias pesquisas que confirmam sua patogenicidade em insetos considerados pragas (KAYA; GAUGLER, 1993; GEORGIS et al., 1995). Os juvenis infectantes (JIs) entram no hospedeiro através de aberturas naturais ou através da cutícula e liberam a bactéria do gênero *Xenorhabdus* spp. (Thomas; Poinar, 1979) no interior da hemocela (LEWIS et al., 2006; FUJIMOTO et al., 2007), onde reproduzem e matam o hospedeiro por septicemia dentro de 24 a 48 horas (CICHE; ENSING, 2003; MEKETE et al., 2005), tornando o ambiente favorável para o desenvolvimento e reprodução de nematoides (GREWAL, 2012; KUCHARSKA et al., 2015).

Embora estratégias de controle com estes agentes entomopatogênicos ainda são escassas para *D. suzukii*. As espécies de nematoides *Steinernema kraussei* (Steiner, Travassos), *Steinernema feltiae* (Filipjev) e *Steinernema carpocapsae* (Weiser) foram testadas para o controle de larvas de *D. suzukii*, mas apresentaram baixas taxas de mortalidade em laboratório, exceto *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) com taxas de mortalidade em torno de 95 % contra larvas de *D. suzukii* (CUTHBERTSON et al., 2014; WOLTZ et al., 2015; CUTHBERTSON; AUDSLEY, 2016), e as espécies *Heterorhabditis amazonensis* (Andaló, 2006) IBCBn 24, *Heterorhabditis indica* (Poinar; Karunakar; David, 1992) IBCBn 05 causaram 33 e 43% mortalidade em pupas de *D. suzukii* (BRIDA et al., 2019).

Diante a escassez de informações sobre estratégias de controle desta mosca e a gama de espécies que o gênero *Steinernema* apresenta, pesquisas devem ser desenvolvidas para fins da utilização destes organismos no controle biológico de pragas. Portanto o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial de nematoides entomopatogênicos em diferentes concentrações e temperaturas sobre a mortalidade de pupas de *D. suzukii*, e os efeitos na longevidade de adultos em laboratório.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e criação e manutenção de *Drosophila suzukii*

O experimento foi conduzido no Laboratório de Ecologia de Insetos (LABEL) do Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética pertencente ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande Sul, Brasil.

As espécies de nematoides entomopatogênicos *Steinernema rarum* PAM 25 e *Steinernema glaseri* 1J foram obtidos da coleção de microrganismos entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu” do instituto biológico de São Paulo, São Paulo, Brasil.

A criação de *D. suzukii* foi mantida em ambiente climatizado (22 ± 1 °C), com umidade relativa (UR) de $70 \pm 10\%$ com fotoperíodo 12/12 h. Os adultos são mantidos em tubos de vidro cilíndrico com fundo chato (85mm x 25 mm $\pm$ 0,5 mm) e alimentados com dieta artificial. A dieta é adaptada da metodologia descrita por Dalton et al. (2011), que consiste em: 500ml de água, Ágar (4g), levedura (20g), farinha de milho (40g), açúcar (50g), Ácido propiônico 1,5ml, Nipagin (10%) (3,5ml) (DALTON et al., 2011).

2.2 Manutenção e multiplicação das espécies de NEPs

Os juvenis infectantes (JIs) de *S. rarum* PAM 25 e *S. glaseri* 1J foram multiplicados em lagartas de quinto instar de *Galleria mellonella* (Linneaus) (Lepidoptera: Pyralidae). Para a multiplicação cinco lagartas de *G. mellonella*, foram colocadas em placa de Petri (9 cm) com duas folhas de papel filtro, sobre as quais foram inoculados uma suspensão de 1,5 mL na concentração com 500 JIs/placa. As placas de Petri foram vedadas com filme de PVC e armazenadas em câmara climatizada BOD a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e UR de $80 \pm 10\%$. Após três dias da mortalidade, as lagartas mortas foram transferidas para armadilha de White (White, 1927). Os JIs que deixaram os cadáveres da lagarta de *G. mellonella*, foram coletados em água destilada (um cm de profundidade) em Erlemeyers mantidos em câmara climatizada BOD a $18 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e utilizados um dia após a coleta (SHAPIRO-ILAN; GAUGLER, 2002).

2.3 Patogenicidade e virulência de NEPs a pupas de *D. suzukii*

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos e 10 repetições. Para cada repetição foram utilizadas cinco pupas de *D. suzukii*. As pupas de *D. suzukii* (48h de idade) foram colocadas em recipientes plásticos (200 ml) com tampas perfuradas contendo 50g de substrato areia autoclavado, com umidade a 5%. Foi inoculado uma suspensão de 2 ml na concentração de 1000 JIs/mL de *S. rarus* PAM 25 e *S. glaseri* 1J. O tratamento controle foi constituído de 2 mL de água destilada (sem nematoide). Posteriormente os tratamentos foram armazenados em BOD a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sem fotoperíodo com UR $70 \pm 10\%$. As avaliações foram realizadas ao longo de 10 dias (média de tempo para emergência total de adultos à 25°C) e realizada a contagem de pupas mortas. Os cadáveres das pupas de *D. suzukii* foram dissecados para a observação da causa morte e os juvenis infectantes quantificados.

2.4 Influência da concentração de NEPs e da temperatura na mortalidade de *D. suzukii*

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 10 repetições. Para cada repetição foram utilizadas cinco pupas de *D. suzukii*. As pupas de *D. suzukii* (48h de idade) foram colocadas em recipientes plásticos (200 ml) com tampas perfuradas contendo 50g de substrato areia autoclavado, com umidade a 5%. Foi inoculada uma suspensão de 2 ml em concentrações de 1500, 2000, 2500, 3000, 4000 JIs/ml de *S. rarus* PAM 25. O tratamento controle foi constituído de 2ml de água destilada (sem nematoide). Posteriormente os tratamentos foram armazenados em BOD em temperaturas de 14° , 22° e 25°C . e $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e 12 horas de fotoperíodo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos de 10 repetições para cada temperatura.

As avaliações foram realizadas ao longo de 10 dias (média de tempo para emergência total de adultos à 25°C) e realizada a contagem de pupas mortas. Os cadáveres das pupas de *D. suzukii* foram dissecados com auxílio de estereoscópio em água destilada usando alfinetes entomológicos (40 x 0.50 mm), para a observação da causa morte e os juvenis infectantes quantificados.

Com base nos resultados, foram estimadas as concentrações necessárias para matar 50% e 90% (Concentração Letal “CL50 e CL90”) das pupas de *D. suzukii* expostas ao isolado *S. rorum* PAM 25.

2.5 Longevidade de adultos *D. Suzukii* pós-infecção de JIs de *S. rorum* PAM 25

Buscando avaliar a longevidade de adultos de *D. suzukii*, foram utilizadas as concentrações com a maior taxa de mortalidade de pupas de cada temperatura estudada; sendo, a concentração de 4000 JIs a 14 °C, a de 1500 JIs a 22 °C e a de 2000 JIs a 25 °C. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos por temperatura, com 10 repetições. O tratamento controle foi constituído de 2 mL de água destilada (sem nematoide). Para cada tratamento foram utilizadas recipientes contendo 50g de substrato, areia autoclavado, com 5% de umidade e com cinco pupas de *D. suzukii* de (48h de idade). Após a inoculação dos JIs de *S. rorum* PAM 25, os recipientes plásticos foram tampados com tampas perfuradas (aprox. 1 mm de diâmetro) para aeração e mantidos em BOD nas respectivas temperaturas com 70 ± 10% de umidade relativa e 12 horas de fotoperíodo. As avaliações foram realizadas ao longo de 10 dias (média de tempo para emergência total de adultos) e realizada a contagem de pupas mortas.

Os cadáveres das pupas de *D. suzukii* foram dissecados com auxílio de estereoscópio em água destilada usando alfinetes entomológicos (40 x 0.50 mm), para a observação da causa morte e os juvenis infectantes quantificados. Os adultos que emergiram nos tratamentos, foram transferidos para copos plásticos de 500 ml, com fundo revestido com tecido *voile* (5 cm) (gaiola) e alimentados com dieta artificial adaptada de Dalton et al. (2011), que consiste em: 500ml de água, Agar (4g), levedura (20g), farinha de milho (40g), açúcar (50g), Ácido propiônico 1,5ml, Nipagin (10%) (3,5ml). A água foi fornecida em algodão umedecido.

As avaliações foram realizadas diariamente, após a emergência dos adultos. Os adultos mortos foram transferidos para placas de Petri e dissecados com auxílio de alfinetes entomológicos (40 x 0.50 mm) em água destilada, quantificando os JIs no interior do inseto quando presentes.

2.6 Análise estatística

Os modelos lineares generalizados do modelo exponencial de distribuições (Nelder e Wedderburn, 1972) foram utilizados para as análises das variáveis estudadas (mortalidade de pupas (%), número de juvenis para pupas e adultos e longevidade de adultos).

Quando houve diferenças significativas entre os tratamentos, comparações múltiplas (teste de Tukey, $P < 0,05$) foram realizadas utilizando a função `glht` por meio do pacote `Multcomp`, com ajuste dos valores de p . Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico "R" versão 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

Um modelo binomial com função complementar log-log (modelo gompit) foi utilizado para estimar as concentrações letais (LC50 e LC90), utilizando o Procedimento Probit no software SAS versão 9.2 (SAS Institute, 2011).

3. RESULTADOS

3.1 Patogenicidade e virulência de NEPs a pupas de *D. sukukii*

Os isolados utilizados *S. rarum* PAM 25 e *S. glaseri* 1J foram patogênicos a pupas de *D. sukukii*. A taxa de mortalidade de pupas por *S. rarum* PAM 25 foi de 48% e de *S. glaseri* J1 de 28 %. O número de JIs infectantes também diferiu significativamente, em *S. rarum*, apresentou 18,1 JIs/ pupas, e *S. glaseri* apresentou 5,6 JIs/ pupa. Para a continuidade do trabalho utilizamos apenas o *S. rarum* PAM 25, por apresentar maior número de JIs por pupa e maior taxa de mortalidade.

3.2 Influência da concentração de *S. rarum* PAM 25 e da temperatura na mortalidade de *D. sukukii*

Em 14°C, a mortalidade de pupas de *D. sukukii* foi de 70%, na concentração de 4000 JIs/ml com 33,9 JIs/pupa (Tabela 1). Não houve diferença na taxa de mortalidade nas demais concentrações que variou de 28 a 44%. Contudo, o número de JIs em pupa apresentou diferença variando de 5,90 JIs na concentração de 1500 JIs/ml a 23,6 JIs/pupa na concentração de 3000 JIs/mL.

Na temperatura de 22 °C a concentração de 1500 JIs/ml provocou 62% de mortalidade em pupas de *D. sukii*. As concentrações de 2500 e 4000 JIs/ml foram as que provocaram as menores taxas de mortalidade em pupa de 42 e 46% respectivamente. Entretanto, a virulência da concentração de 4000 JIs/ml, mostrou – se maior, 35,4 JIs/pupa, quando comparada com as demais concentrações. As concentrações de 1500, 2000 e 3000 não houve diferença para os juvenis variando de 5,5 a 9,7 JIs/pupa.

Na temperatura de 25 °C, a menor taxa de mortalidade foi de 18% na concentração de 1500 JIs/ml e as maiores taxas em concentrações de 2000 e 2500 JIs/ml com 30% de mortalidade de pupas em ambas as concentrações. As médias de JIs apresentaram uma grande variação significativa de 1,4 a 45,1JIs/pupa. Entretanto, na concentração de 2000 JIs/ml foi encontrado um maior número de juvenis infectantes 26,8 JIs/pupa.

As concentrações letais (CL50 e CL90) foram obtidas em menores quantidades de JIs para o isolado *S. rarum* PAM 25 na temperatura de 22°C com 1.436,4 JIs para CL50 e 3.711 para CL 90 (Tabela 2).

3.3 Longevidade de adultos *D. sukii* pós infecção de *S. rarum*

A longevidade dos adultos de *D. sukii* foi influenciada pela presença dos JIs de *S. rarum* PAM 25 (Fig. 1).

Para a temperatura de 14 °C na concentração de 4000 JIs/mL, a média da longevidade dos adultos infectados foram de 5,18 dias, diferindo da testemunha com 8,97 dias com média de 1,67 JIs/adulto. Na temperatura de 22°C na concentração de 1500 JIs/mL, as médias da longevidade dos adultos infectados foram de 6,26 dias, diferindo da testemunha com 10,10 dias com média de 5,59 JIs/adulto. Para temperatura de 25° na concentração de 2000 JIs/mL, a média da longevidade dos adultos infectados foram de 6,79 dias, diferindo da testemunha com 9,53 dias com média de 8,08 JIs/adulto.

Tabela1: Mortalidade e virulência de juvenis infectantes de *Steinernema rarum* PAM 25 a pupas de *Drosophila suzukii* em diferentes concentrações e temperaturas.

Temperatura	Concentration of IJs	Mortalidade	Nº de Jis
14 °C	Testemunha	20,0 ± 2,98C	-
	1500	28,0 ± 7,42B	5,90 ± 2,00C
	2000	44,0 ± 7,18B	16,7 ± 4,03B
	2500	40,0 ± 6,66B	23,6 ± 6,85AB
	3000	28,0 ± 7,91B	16,3 ± 8,66B
	4000	70,0 ± 10,0A	33,9 ± 2,10A
	<i>F</i>	16,5	11,3
	<i>gl</i>	5	5
	<i>P</i>	>0,0001	>0,0001
22 °C	Testemunha	30,0 ± 2,25C	-
	1500	62,0 ± 1,17A	10,0 ± 1,49B
	2000	56,0 ± 4,42A	9,7 ± 1,84B
	2500	46,0 ± 4,35AB	5,5 ± 1,91C
	3000	58,0 ± 5,10A	8,0 ± 1,86B
	4000	42,0 ± 4,25B	35,4 ± 8,55A
	<i>F</i>	12,11	10,4
	<i>gl</i>	5	5
	<i>P</i>	>0,0001	>0,0001
25 °C	Testemunha	28,0 ± 2,11A	-
	1500	18,0 ± 3,12B	1,4 ± 0,54C
	2000	30,0 ± 3,12A	26,8 ± 7,88AB
	2500	30,0 ± 4,12A	22,9 ± 6,10B
	3000	20,0 ± 1,45AB	3,4 ± 1,75C
	4000	20,0 ± 4,11AB	45,1 ± 8,31A
	<i>F</i>	14,1	13,4
	<i>gl</i>	5	5
	<i>P</i>	>0,0001	>0,0001

O número de médias com a mesma letra (para cada temperatura) não é significativamente diferente (GLM com distribuição quase binomial seguida pelo teste post hoc de Tukey; $P < 0,05$).

Tabela 2: Estimativa da LC50 e LC90 (JIS / mL) e intervalo de confiança (IC 95%) de nematóides entomopatogênicos em pupas de *Drosophila suzukii* em diferentes temperaturas.

Temperature	Slope $\pm$ SE	LC ₅₀ (CI 95%) ^a	LC ₉₀ (CI 95%) ^b	χ^2 ^c	d.f. ^d
14°C	3.11 $\pm$ 0.40	3.200,25 (3.026,2 – 3.524,8)	5.703,4 (5.480,4 – 6.2010,8)	9.32	5
22°C	3.19 $\pm$ 0.19	1.436,4 (1.115,0 – 1.738,5)	3.711,0 (3.160,4 – 4.345,4)	6.14	5
25°C	3.14 $\pm$ 0.25	5.545,0 (5.219,2 – 6.676,8)	9.155,1 (8.388,9 – 10.342,8)	9,73	5

O número de médias com a mesma letra (para cada temperatura) não é significativamente diferente (GLM com distribuição quase binomial seguida pelo teste post hoc de Tukey; P <0,05).

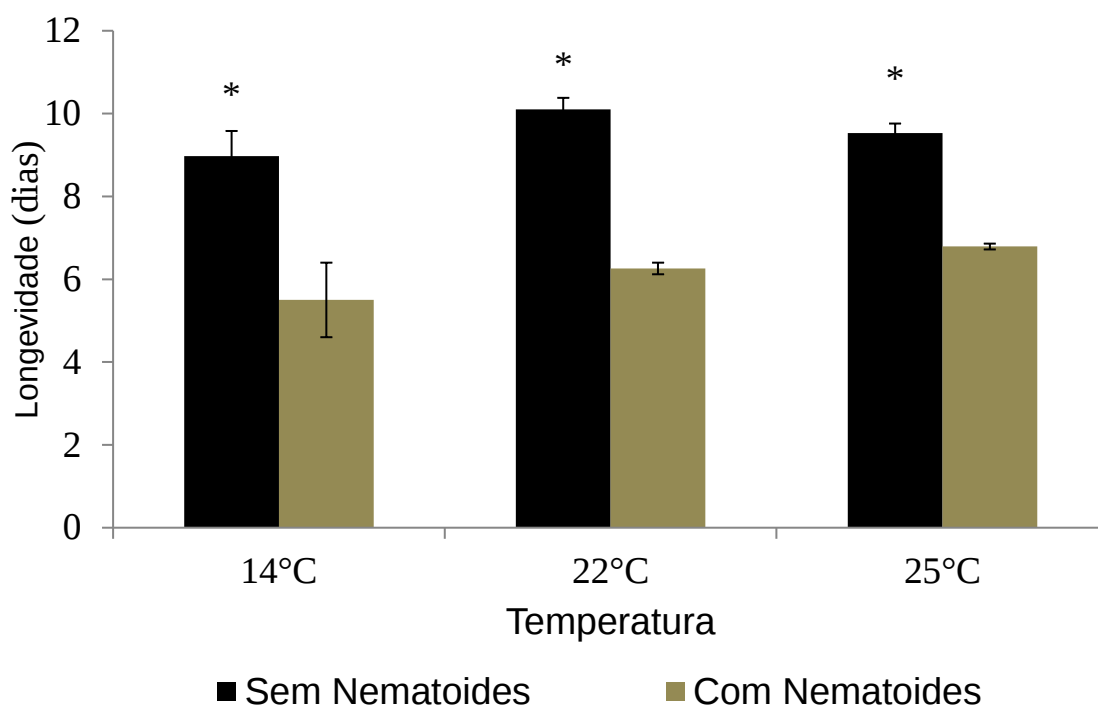


Fig. 1: Longevidade de adultos de *Drosophila suzukii* após a aplicação de nematoides entomopatogênicos em diferentes concentrações (14 °C 4000 JIs/ml, 22 °C 1500 JIs/ml, 25 °C 2000 JIs/ ml). *Asteriscos indicam diferenças significativas dentro da mesma temperatura de acordo com o teste t de Student ($P < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, pupas de *D. suzukii* foram suscetíveis aos juvenis infectantes de *S. rarum* PAM 25. Esta espécie se apresenta como mais virulenta quando comparado ao isolado *S. glaseri* 1J. Embora ambas as espécies tenham sido patogênicas a pupas de *D. suzukii*, deve ser levado em consideração algumas diferenças morfológicas do nematoide. Os JIs de *S. rarum* possuem em média 499 micrometros, enquanto JIs de *S. glaseri* 1.130 micrometros (DOUCET, 1986; POINAR, 1990; NGUYEN, 1995).

No processo de infecção dos JIs, o tamanho do nematoide deve ser considerado em relação ao tamanho de seu hospedeiro, em muitos testes de patogenicidade, este parâmetro pode acabar comprometendo o processo de infecção e multiplicação dos JIs hospedeiro (EHLERS, 2003), segundo Boff (2001) os NEPs respondem melhor quando possui tamanho inferior ao seu hospedeiro, e ainda em insetos menores a quantidade de geração dos JIs pode

ser reduzida. O tamanho das pupas de *D. suzukii* também apresenta as características do dimorfismo sexual, porém, não tão acentuada. As pupas dos machos são menores que os das fêmeas, tendo 2,90 x 0,90 mm para machos e 3,18 x 1,06 mm em fêmeas (WALSH et al., 2011; DAFF, 2013). Este processo pode comprometer a eficiência destes nematoides na infecção considerando que os JIs de *S. glaseri* são relativamente grandes se comparados ao tamanho das pupas de *D. suzukii*. Embora as pupas de *D. suzukii* sejam suscetível a *S. glaseri*, no presente estudo, os experimentos foram voltados à espécie *S. rarum* que foi altamente eficiente na mortalidade e virulência de JIs em pupa.

Outras espécies de NEPs foram avaliadas a pupas de *D. suzukii*, como *S. carpocapsae* IBCBn 02, *S. feltiae* IBCBn 47, *H. indica* IBCBn 05 e *H. amazonensis* IBCBn 24 em concentrações de 1000 JIs/ml. Neste trabalho de Brida et al. (2019), os NEPs causaram mortalidade abaixo de 50%, entretanto teve uma repercussão positiva com adultos, atingindo mortalidades de 80 a 84% com os respectivos isolados *H. amazonensis* IBCBn 02 e *S. carpocapsae* IBCBn 24.

Outras espécies foram testadas em pupas de *D. suzukii* como *S. kraussei* (Steiner, Travassos) que a 22 °C tiveram resultado de 33% de mortalidade, a 25°C 57 % de mortalidade. Já *S. feltiae* (Filipjev) na temperatura de 22 °C ocasionou 34% de mortalidade e 34% na temperatura de 25 °C. *S. carpocapsae* (Weiser) mortalidade a 22 °C teve 43% e a 25 °C com 52% mortalidade. Todas as espécies citadas foram testadas em concentrações altas de JIs, 10.000 JIs/mL (CUTHBERTSON et al., 2014; CUTHBERTSON; AUDSLEY, 2016).

Respostas de patogenicidade de *S. rarum* foram verificadas em estudos com outros dípteros como *Culex apicinus* (Diptera: culicidae) e se mostrou patogênico com 75% de mortalidade em larvas na concentração de 2000 JIs/mL à 25 °C (CAGNOLO; ALMIRÓN, 2010). Já no trabalho de Doucet (1999) *Culex pipens* não apresentou mortalidade, porém, os outros organismos testados *Musca domestica* L. e *Ceratitis capitata* apresentaram mortalidade de aproximadamente 60% na concentração de 500 JIs/ mL na temperatura de 25 °C.

Steinernema rarum PAM 25 foi isolado por Barbosa - Negrisoliet al. (2010) em áreas nativas do Rio Grande do Sul e correspondeu ao nematoide mais

encontrado nas amostras de solo (36,8%), com grande prevalência em solos arenosos em temperaturas médias de 25 °C e altitude de 700 a 1.100 m.

Embora *S. rarum* PAM 25 apresente ótimas exigências térmicas a 25°C no presente trabalho, as melhores taxas de mortalidade foram encontradas nas temperaturas de 14 e 22 °C, esta última considerada ótima para o desenvolvimento de *D. suzukii*. Na temperatura de 25°C houve uma grande emergência de adultos que variou de 60 a 76%, a mesma temperatura não mostrou grandes resultados para mortalidade das pupas.

Um fator importante a ser salientado são as influências causadas pelas temperaturas baixas no metabolismo dos insetos, vistos que a *D. suzukii* entra em períodos de diapausa, cessando suas atividades metabólicas e aumentando seu tempo no estágio de pupa que consequentemente prolonga seu período de exposição ao parasito. Deste modo, podemos explicar a alta taxa de mortalidade (72%) na temperatura mais baixa testada, 14 °C. Os JIs entre 8 e 20 °C conservam reservas lipídicas por mais tempo, logo, a capacidade do JIs de infectar é superior, pois carregam reservas energéticas possibilitando maior busca dos seus hospedeiros (ANDALÓ et al., 2011).

Segundo Meira (2018) *S. rarum* PAM 25 nas temperaturas de 22 °C teve uma rápida emergência de seus hospedeiros (4,75 dias), respondendo significativamente, que em temperaturas em torno de 22 °C os NEPs desta espécie apresenta maior atividade. Para Cagnolo e (2008), *S. rarum* mantém sua infectividade a 23 ± 2 °C. Entretanto no bioensaio de 25°C, a taxa de mortalidade variou de 18 a 30%, indicando que esta temperatura pode ser favorável a ambos, nematoide e inseto, porém sem promover altas taxas de mortalidade, consequentemente obtendo uma maior taxa de emergência de adultos de *D. suzukii*.

Os NEPs penetram o tegumento do inseto, e causam morte em 24 a 48h, entretanto, a emergência de adultos infectados indica a resistência do inseto à infecção durante o período de pupa (RODRIGUES-TRENTINI, 1996). A resistência de *D. suzukii* deve-se a sua rápida resposta imune com elevada produção de hemócitos, essa espécie é capaz de produzir cinco vezes mais em relação a *D. melanogaster*, o que a torna significativamente mais resistente ao parasitismo (KACSOH; SCHLENKE, 2012).

A inativação do patógeno presente no nematoide durante a fase de pupa e sua permanência no adulto indica a capacidade desses organismos de se manterem no inseto (NOMANO et al., 2015). Visto que em *D. suzukii* o tempo médio de pupa para adulto nas temperaturas de 14 °C é de 8,97 dias, 22 °C 10,10 dias, e a 25°C 9,53 dias (TOCHEN; WALTON, 2013), após a exposição de NEPs no presente trabalho, houve redução na longevidade de adultos de *D. suzukii* de 5,18 dias a 14°C, 6,26 dias a 22°C; e 6,79 dias a 25°C.

Foi constatada a repercussão de JIs de *S. rarum* em adultos de *D. suzukii* recém emergidos. Os NEPs reduziram a longevidade dos adultos, diminuindo o período de vida das moscas e conseqüentemente baixando a os danos que podem causar nos frutos. Embora a concentração inoculada de JIs seja de grande importância para o sucesso de infecção dos NEPs (BRIDA 2015), foi verificado no presente trabalho que independente da concentração ou temperatura, os JIs foram capazes de resistir ao sistema imunológico de *D. suzukii*, se perpetuando na fase adulta e ocasionando mortalidade em um curto período.

5. CONCLUSÃO

- *S. glaseri* 1J e *S. rarum* PAM 25 são patogênicas a pupas de *D. suzukii*;
- As temperaturas de 14 °C 4000 JIs/mL e 22°C 2000 JIs/mL, apresentam as maiores taxas de mortalidade de pupas de *D. suzukii*;
- *S. rarum* PAM 25 reduziu a longevidade de *D. suzukii* em 3,79 dias a 14°C, 3,84 dias a 22°C e 2,74 dias a 25°C.

6. REFERÊNCIAS

ALTIERI M., NICHOLLS C. Biodiversity and Pest Management in Agroecosystems. **Environment & Agriculture** 2nd edition. 253 p. 2018.

ANDALÓ, V.; MOINO, A.; MAXIMINIANO, C.; CAMPOS, V. P.; MENDONÇA, L. A.; Influence of temperature and duration of storage on the lipid reserves of entomopathogenic nematodes. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v. 37, n. 2, p. 203-209, 2011.

ANDALÓ, V.; NGUYEN, K.; MOINO JUNIOR, A. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. **Nematology**, Leiden, v.8, n.6, p. 853-867, 2006.

ARNÓ, J.; SOLÀ, M.; RIUDAVETS, J.; GABARRA, R. Population dynamics in noncrop hosts, and fruit susceptibility of *Drosophila suzukii* in Northeast Spain. **Journal of Pest Science**, v. 89, n. 3, p. 713–723, 2016.

BEERS, E. H.; STEENWYK, R. A. V.; SHEARER, P. W.; COATES, W. W.; GRANT, J. A. Developing *Drosophila suzukii* management programs for sweet cherry in the western United States. **Pest Management Science**, v. 67, p. 1386-1395, 2011.

BERRY, J. A. Pest Risk Assessment: *Drosophila suzukii*: spotted wing drosophila (Diptera: Drosophilidae) on fresh fruit from the USA. **MPI Technical Paper**. 5. ISBN: 978-0-478-38861-9. 2012.

BREWER, L. J.; WALTON, V.; DREVES, A.; SHEARER, P.; ZALOM, F.; WALSH, D. Biology and management of spotted wing drosophila on small and stone fruits: Year 2 reporting cycle. **Department of Horticulture**, Oregon State University. 2012.

BRIDA, A. L. **Levantamento de nematoides entomopatogênicos em áreas agrícolas e influência da temperatura e do substrato na sobrevivência** ,

multiplicação e armazenamento. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista “Julio de mesquita filho” Botucatu, 2015.

BRIDA, A. L., ROSA, J. M. O., OLIVEIRA, C. M. G., CASTRO, B.M.C., SERRÃO, J.E., ZANUNCIO, J.C., LEITE, L.G., WILCKEN, S.R.S. Entomopathogenic nematodes in agricultural áreas in Brazil. **Sci. Rep.** 2017.

BRIDA, A. L.; WILCKEN, S. R. S.; LEITE L. G. influência do substrato e da luminosidade na infecção de nematoides entomopatogênicos em *Galleria mellonella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE). **Revista Científica Rural**. P. 91 – 102. 2018

BRIDA, A. L.; WILCKEN, S. R. S.; LEITE, L. G.; GARCIA, F. R. M. Virulence of entomopathogenic nematode to pupae and adults of *Drosophila suzukii* in laboratory. **Revista científica Rural**. P. 123 – 136. 2019.

BOFF, M. I. C.; SMITS, P. H. Effects of density, age and host cues on the dispersal of *Heterorhabditis megidis*. **Biocontrol Science Technology**. 11, 505-514. 2001

BRUCK, D. J.; BOLDA, M.; TANIGOSHI, L.; KLICK, J.; KLEIBER, J.; D. FRANCESCO, J.; GERDEMAN, B.; SPITLER, H. Laboratory and field comparisons of insecticides to reduce infestation of *Drosophila suzukii* in berry crops. **Pest Management Science**, v. 67, p. 1357- 1385, 2011.

BURRACK, H. J.; ASPLEN, M.; BAHDER, L. Multistate comparison of attractants for monitoring *Drosophila suzukii*(Diptera: Drosophilidae) in blueberries and caneberries. **Environmental Entomology**, v. 1, n. 9, p. 1–9. . 2014.

CAGNOLO, S. R.; WALTER, R. A. Capacity of the terrestrial entomopathogenic nematode *Steinernema rarum* (Rhabditida: Steinernematidae) to parasite *Culex apicinus* larvae (Diptera: Culicidae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, Tucuman, p. 69, n. 1-2, p. 141-145, 2010.

CAGNOLO, S., CAMPOS, V. B. Effect of storage temperature on survival and infectivity of *Steinernema rorum* (OLI strain) (Rhabditida: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**. 98, 114–115. 2008.

CALABRIA, G.; MÁCA, J.; BÄCHLI, G.; SERRA, L.; PASCUAL, M. First records of the potential pest species *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Europe. **Journal of Applied Entomology**, v. 136, p. 139-147, 2012.

CAPRILE, J.; FLINT, M. L.; BOLDA, M. P.; GRANT, J. A.; STEENWYK, R. V.; HAVILAND, D. Spotted wing drosophila (*Drosophila suzukii*): Provisionary guidelines for management in home and garden. **Agriculture and Natural Resources**, University of California. 2014.

CHASTON, J.; GOODRICH-BLAIR, H. Common trends in mutualism revealed by model associations between invertebrates and bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v.34, n.1, 34, p. 41-58, 2010.

CINI, A.; IORIATTI, C.; ANFORA, G. A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. **Bulletin of Insectology**, v. 65, n. 1, p. 149-160, 2012.

CUTHBERTSON, A. G. S.; COLLINS, D. A.; BLACKBURN, L. S.; AUDSLEY, N.; BELL, H. A. Preliminary Screening of potential control products against *Drosophila suzukii*. **Insects**, v. 5, p. 488-498, 2014.

CUTHBERTSON, A.G.S.; AUDSLEY, N. Further screening of entomopathogenic fungi and nematodes as control agents for *Drosophila suzukii*. **Insects**. v.7, n.2, p.1– 9, 2016.

DAFF, Verification visit to the USA; *Drosophila suzukii*. Trip Report. Canberra: Plant Division, Department of Agriculture, **Fisheries and Forestry**. 2010.

DAFF. Final pest risk analysis report of *Drosophila suzukii*. Canberra> Department of Agriculture, **Fisheries and Forestry**, Australian Government. 2013.

DALTON, P.T.; WALTON, V.M.; SHEARER, P.W.; WALSH, D.B.; CAPRILE, J.; ISAACS, R. Laboratory survival of *Drosophilasuzukii* under simulated winter conditions of the Pacific Northwest and seasonal field trapping in five primary regions of small and stone fruit production in the United States. **Pest Management Science**. 2011.

DE DOUCET, M.M.A., BERTOLOTTI, M.A., GIAYETTO, A.L., MIRANDA, M.B.. Host range, specificity, and virulence of *Steinernema feltiae*, *Steinernema rarum*, and *Heterorhabditis bacteriophora* (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Argentina. **Journal Invertebrate Pathology**. 73, 237–242. 1999

DE DOUCET, M.M.A., GIAYETTO, A.L. Gama de hospedadores y especificidad em *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975 (Heterorhabditidae: Nematoda). **Nematology**. Mediterr. 22, 171–178. 1994.

DEL VALLE, E.E., DOUCET, M.E. Effects of *Galleria mellonella* cadavers infected with *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema rarum*, their macerates and dead infective juveniles on *Meloidogyne javanica* suppression. **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias** p. 46. 2014.

DEPRÁ, M.; POPPE, J. L.; SCHMITZ, H. J.; DE TONI, D. C.; VALENTE, V. L. S. The first records of the invasive pest *Drosophila suzukii* in South American Continent. **Journal of Pest Science**, v. 87, p. 379-383, 2014.

DIEPENBROCK, L. M.; SWOBODA-BHATTARAI K.A.; BURRACK, H. J. Ovipositional preference, fidelity, and fitness of *Drosophila suzukii* in a co-occurring crop and non-crop host system. **Journal of Pest Science**, 89:761–769. 2016.

DOLINSKI, C.; MOINO JR, A. Utilização de Nematoides Entomopatogênicos nativos ou exóticos: o perigo das introduções. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n.2, p. 139-149, 2006.

DOLINSKI, C.; MONTEIRO, C.; ANDALO, V.; LEITE, L. G. . Studies on entomopathogenic nematodes in Brazil: past and future. **NEMATODA**, v. 4, p. 1-14, 2017

DREVES, A. J.; RHODALACK, G. A. L. Protecting garden fruits from spotted wing *Drosophila*. Oregon State University. **Extension Service**. 2011.

DREVES, A. J.; WALTON, V.; FISHER, G. **A new pest attacking healthy ripening fruit in Oregon. Oregon State University Extension Service**. 2009. Available at: <<http://ir.library.oregonstate.edu/jspui/bitstream/1957/13090/1/em8991.pdf>>. Acesso em Junho de 2019.

EHLERS. R. U. Biocontrol nematodes. In: Hokkanen HMT, Hajek AE (eds) Environmental impacts of microbial insecticides. **Kluwer Academic Publishers**, The Netherlands, 177–220. 2003

FDACS, Plant Inspection Advisory: Update for spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii* and potential on blueberries. Florida **Department of Agriculture and Consumer Services**. 2010. Disponível em: http://www.doacs.state.fl.us/pi/plantinsp/images/pi_advisorydrosophila.pdf.>

FUNES, C. F.; KIRSCHBAUM, D. S.; ESCOBAR, L. I.; HEREDIA A. M. La mosca de las alas manchadas, *Drosophila suzukii*(Matsamura): Nueva plaga de las frutas finas en Argentina. **INTA Ediciones**. Tucumán, Argentina. 2018.

GARCIA, F. R. M. Fruit fly: Biological and ecological aspects. **Transworld Research Network**. 2009.

GARCIA, F. R. M.; BRIDA, A. L.; MARTINS, L. N.; ABEIJON, L. M.; LUTINSKI, J. C. Biological control of fruits flies of the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae): current status and perspectives, in: Lewis Davenport. (Org.).

Biological control: methods, applications and challenges. **Nova Science Publishers**, v. 13. 2017.

GARCIA, C. F.; HOCHMULLER, C. J. C.; VALENTE, V. L. S. SCHMITZ, H. J. Drosophilid assemblages at different urbanization levels in the city of Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 41, p. 32-41, 2012

GAUGLER, R.; CAMPBELL, J. F.; SELVAN, S.; LEWIS E. E.. Large-Scale Inoculative Releases of the Entomopathogenic Nematode *Steinernema glaseri*: Assessment 50 Years Later. **Biological control v. 2**. New Jersey, 1992.

GAUGLER, R.; HAN, R. Production technology. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**. New Jersey, CAB International, 2002.

GEORGIS R., DUNLOP, D. B., GREWAL, P. S. **Formulation of entomopathogenic nematodes**. Pp. 197–205 In: F. R. Hall, and J. W. Barry, eds. Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery. Washington, DC: American Chemical Society. pp. 197–205. 1995.

GEORGIS, R.; KOPPENHOFER, A. M.; LACEY, L. A.; BÉLAIR, G.; DUNCAN, L. W.; GREWAL, P. S.; SAMISH, M.; TAM, L.; TORR, P.; VAN-TOL, R. W. H. M. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. **Biological Control**, V. 38, p.103-123. 2006.

GLASER, R. W.. "Studies on *Neoaplectana glaseri*, a Nematode Parasite of the Japanese Beetle (*Popillia japonica*)," New Jersey, **Department of Agriculture** Circ.1932.

GLASER, R. W.. Continued culture of a nematode parasitic in the Japanese beetle. New Jersey, 1940.

GOODHUE R. E., BOLDA M., FARNSWORTH D., WILLIAMS J. C., ZALOM F. G. Spotted wing drosophila infestation of California strawberries and

raspberries: economic analysis of potential revenue losses and control costs.

Pest Management Science, v. 67, p. 1396-1402, 2011.

GREWAL, P. S. Anhydrobiotic potential and long term storage of entomopathogenic nematode (Rhabditida: Steinernematidae). **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.30,. 2000.

GREWAL, P. S. **Entomopathogenic nematodes as tools in integrated pest management**. Book: Integrated pest management principles and practice. Ohio, USA, 2012.

GREWAL, P. S.; NARDO, E. A. B.; AGUILLERA, M. M. Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America. **Neotrop. Entomol.** 30, 191-205. 2001.

GUTIÉRREZ. C. G.; GONZÁLEZ, M. M. Uso de bioinsecticidas para El control de plagas de hortalizas em comunidades rurales. **Ra-Ximhai**, v.6, n. 1, p17-22, 2010.

HAMBY, K. A.; BELLAMY, D.; CHIU, J. C.; LEE, J. C.; WALTON, V. M.; WIMAN, N. G.; YORK, R. M.; BIONDI, A. Biotic and abiotic factors impacting development, behavior, phenology, and reproductive biology of *Drosophila suzukii*. **Journal Pest Science** 89(3):605–619. 2016 (a).

HAMBY, K. A.; BECHER, P. G. Current knowledge of interactions between *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) and microbes, and their potential utility for pest management. **Journal Pest Science** 89(3):621–630. 2016 (b).

HAUSER, M. A historic account of the invasion of *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) in the continental United States, with remarks on their identification. **Pest Management Science**, v. 67, p. 2011.

HAUSER, M.; GAIMARI, S.; DAMUS, M. *Drosophila suzukii* new to North America. **Fly Times**, n. 43, p. 12-15, 2009.

HAYE T., GIROD P., CUTHBERTSON A. G. S., WANG X. G., DAANE K. M., HOELMER K. Current SWD IPM tactics and their practical implementation in fruit crops across different regions around the world. **Journal Pest Science** 89 643–651. 2016.

HOMINICK, W. M. Biogeography. In: GAUGLER, R. Ed. **Entomopathogenic Nematology**. CABI Publishing: New York, p. 115-143. 2002.

HOMINICK, W. M.; REID, A. P.; BOHAN, D. A.; BRISCOE, B. R. Entomopathogenic Nematodes: Biodiversity, Geographical Distribution and the Convention on Biological Diversity. **Biocontrol Science and Technology**, v. 6, n. 3, p. 317-332, 1996.

HÜBNER, A.; ENGLERT, C.; HERZ, A. Effect of entomopathogenic nematodes on different developmental stages of *Drosophila suzukii* in and outside fruits. **Biocontrol**, Darmstadt, Germany. 2017.

KANZAWA, T. Studies on *Drosophila suzukii* Mats. Kofu, Yamanashi Prefecture Agricultural Experiment Station Report. **Review of Applied Entomology**, v. 29, p. 622, 1939

KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review. Entomology**, Palo Alto, v. 38, p. 181-206, 1993

KENIS, M.; TONINA, L.; ESCHEN, R.; VAN DER SLUIS, B.; SANCASSANI, M.; MORI, N.; HAYE, T.; HELSEN, H. Non-crop plants used as hosts by *Drosophila suzukii* in Europe. **Journal of Pest Science**, v. 3, p. 735-748. 2016.

KIST, B. B. **Anuário brasileiro da fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 88 p. 2018.

KACSOH, B. Z.; SCHLENKE, T. A. High hemocyte load is associated with increased resistance against parasitoids in *Drosophila suzukii*, a relative of *D. melanogaster*. **Plos One**, v. 7. 2012.

LANDOLT, P. J.; ADAMS, T.; ROGG, H. Trapping spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae), with combinations of vinager and wine, and acetic acid and ethanol. **Journal of Applied Entomology**, v. 136, p. 148-154, 2011.

LEE, J. C.; BRUCK, D. J.; DREVES, A. J.; IORIATTI, C.; VOGT, H.; BAUFELD, P. In focus: Spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*, across perspectives. **Pest Management Science**, v. 67, p. 1349-1351, 2011.

LEE, J. C.; DREVES, A. J.; CAVE, A. M.; KAWAI, S.; ISAACS, R.; MILLER, J. C.; VAN TIMMEREN, S.; BRUCK, D. J. Infestation of wild and ornamental non crop fruits by *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 108, p. 117–129, 2015.

LEITE, L. G., et al. Instituto biológico. 12° Sincobiol. In: **simpósio de controle biológico: mudanças climáticas e sustentabilidade: quebrando paradigmas**, São Paulo, 2011.

LEITE, L.G., TAVARES, F.M., BUSSÓLA, R.A., AMORIM, D.S., AMBRÓS, C.M., HAKAKAVA, R. Virulência de nematoides entomopatogênicos (Nemata: Rhabditida) contra larvas da mosca-dos-fungos *Bradysia mabiuse* (Lane, 1959) e persistência de *Heterhorabdtis indica* Poinar et al. 1992 em substratos orgânicos. **Arq. Inst. Biol.** (Sao Paulo) 74, 337–342. 2007.

LENTEREN, J. C.; BOLCKMANS, K.; KOHL, J.; REVENBERG, W. J.; URBANEJA, A. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**. 2017.

LEWIS, E. E.; CAMPBELL, J. GRIFFIN, C.; KAYA, H.; PETERS, A. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**. v.38, n.1, p. 66–79, 2006.

LOPES, P. R. C.; OLIVEIRA, I. V. DE M.; SARMENTO, D. H. A. Introdução e produção de fruteiras de clima temperado em regiões tropicais. **Embrapa Semiárido**. 2016.

MARÍN, C. Herramientas para el control de *drosophilasuzukii*. Captura de *drosophilasuzuki* com suzukiitrap®: modo de acción y experiencias de campo. **PHYTOMA la revista profesional de sanidade vegetal**. Espana.269. p.18-19, 2015.

MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. M. *Drosophila* biology in the genomic age. **Genetics** 177: 1269- 1276. 2007.

MEIRA, B. H. **Efeito da temperatura no comportamento de nematoides entomopatogênicos**. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. 50f. 2018.

MILLER, M. E.; MARSHALL, S. A.; GRIMALDI, D. A. A Review of the Species of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) and Genera of Drosophilidae of Northeastern North America. **Canadian Journal of Arthropod Identification**. 2017.

NGUYEN, K. B. et al. *Steinernema brazilense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Mato Grosso, Brazil. **Journal of invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 103, n.1, p. 8 – 20, 2010.

NGUYEN, K. B. Methodology, morphology and identification. **Nematology monographs and perspectives**. V. 5. Leiden 2007.

NGUYEN, K. B., SHAPIRO, D. L., FUXA, J.R., WOOD, B.W., BERTOLOTTI, M.A., ADAMS, B. J. Taxonomic and biological characterization of *Steinernema rarum* found in the Southeastern United States. **Journal of Nematology** 38:28-40. 2006.

NOMANO, F. V.; MITSUI, H.; KIMURA, M. T. Capacity of Japanese *Asobara* species (Hymenoptera; Braconidae) to parasitize a fruit pest *Drosophila suzukii* (Diptera; Drosophilidae). **Journal of Applied Entomology**. v. 139, p. 105-113. 2015.

NUNES, A. M.; SCHLESENER, D. C. H.; de SOUZA, D. S.; NEUMANN, A. M.; GARCIA, F. R. M. Primeiros registros de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) em agroecossistemas na metade sul do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 2014. Anais Goiânia, 2014.

O'GRADY, P.M. New records for introduced Drosophilidae (Diptera) in Hawaii. **BISHOP Museum Occasional Papers**: Honolulu, Hawai'i 96839, USA No. 69. 2002

PAIVA, P. E. B.; GARCIA, J. F.; AGUILLERA, M. M. Ocorrência de nematoides entomopatogênico, *Heterorhabditis* Poinar, 1976, em área de citros no estado de São Paulo. In: **SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO**: São Pedro, v. 8, 2003. **Anais...**2003.

PARRA, J. R. P. et al. Controle biológico: uma visão inter e multidisciplinar. In: PARRA, J. R. P. et al. (eds.), **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Editora Manole, 2002.

PHAN, K. L. et al. *Heterorhabditis baujardi* n.sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Vietnam and morphometric data for *H. indica* populations. **Nematology**, Leiden, v. 5, n. 3, p. 367-382, 2003.

PIZANO, M. A. et al. Incidência de *Neoaplectana glaseri* Steiner, 1929 (Nematoda: Steinernematidae) parasitando ovo de *Migdolus fryanus* Weswood,

1863) (Coleoptera: Cerambycidae). **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 9, p. 9-10, 1985.

POINAR JR, G. O., GREWAL, P. S. History of entomopathogenic nematology. **Journal of Nematology**, v. 44, n. 2, p. 153-161, 2012.

POINAR JUNIOR, G. O. **Nematodes for biological control of insects**, Boca Raton: CRC Press, 1979.

POINAR JUNIOR, G. O. Taxonomy and biology of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*, p. 23-61. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K.(eds.), **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton, CRC Press, , 365 p. 1990.

RENKEMA, J. M.; CUTHBERTSON, A. G. S. Impact of multiple natural enemies on immature *Drosophila suzukii* in strawberries and blueberries. **BioControl**. 2018.

RITZINGER, C. H. S. P.; FANCELLI, M.; RITZINGER, R. Nematoides: Bioindicadores De Sustentabilidade E Mudanças Edafoclimáticas. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, SP, v. 32, n. 4, p. 1289-1296, 2010.

RODRÍGUEZ-SOLANO, R., ALMAZÁ-GARCÍA, C., ARMENDÁRIZ-GONZÁLEZ, I. Estudios preliminares con nematodos entomopatógenos para el control biológico de la mosca Del cuerno, *Haematobia irritans* L. (Diptera: Muscidae). **Vet. Mexico** 35, 339–350. 2004.

SANTOS, L. DOS A. ; MENDES, M. F. ; KRÜGER, ALEXANDRA P. ; BLAUTH, MONICA L. ; GOTTSCHALK, MARCO S. ; GARCIA, FLÁVIO R. M. . Global potential distribution of *Drosophila suzukii* (Diptera, Drosophilidae). **Plos one**, v. 12, p. e0174318, 2017.

SANTOS, R. S. S. dos. *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae) atacando frutos de morangueiro no Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, p. 4005-4011, 2014.

SCHLESENER, D. C. H. ; WOLLMANN, J. ; PAZINI, J. B. ; GRUTZMACHER, A. D. ; GARCIA, F. R. M. Effects of insecticides on adults and eggs of *Drosophila suzukii* (Diptera, Drosophilidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 43, p. 208-214, 2017(a).

SCHLESENER, D. C. H.; WOLLMANN, J.; NUNES, A. M.; CORDEIRO, J.; GOTTSCHALK, M. S.; GARCIA, F. R. M. *Drosophila suzukii*: nova praga para a fruticultura brasileira. **Biológico**, v. 77, n. 1, p. 47-54, 2015.

SCHLESENER, D. C. H.; WOLLMANN, J.; TEIXEIRA, C. M.; NUNES, A. M.; GOTTSCHALK M. S.; GARCIA F. R. M. *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera, Drosophilidae) : biology, ecology and control. Trad. Ana Raísa Paiva.- Pelotas : **Ed. Da Universidade Federal de Pelotas** [FAU - Fundação de Apoio Universitário], 2017(b).

SEAB. (Secretaria da Agricultura e do Abastecimento). 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: Junho. 2018.

SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). Mosca del vinagre de alas manchadas (*Drosophila suzukii* Matsumura). Dirección General de Sanidad Vegetal - **Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria**. México, D.F. Ficha Técnica.7: 22. 2013.<http://www.cesaveson.com/files/5f38648cf56c972708845af676756439.pdf> . Acesso em junho de 2019

SHAPIRO-ILAN, D.; GLAZER, I.; SEGAL, D. Trait stability and fitness of the heat tolerant entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* IS5 strain. **Biological Control**. v. 6, n. 2, p.238-244, 1996.

SUBRAMANIAN, S.; MUTHULAKSHMI, M. Entomopathogenic nematodes. In: OMKAR. **Ecofriendly Pest Management for Food Security**. London. 2016.

SWEENEY, M. Spotted wing drosophila (SWD) management in BC berry crops (Blueberries, Raspberries, Strawberries, Blackberries). 2014.

TAVARES, F.M., BATISTA, F.A., LEITE, L.G., TAVARES, G.M. Avaliação de isolados de nematóides entomopatogênicos sobre a mosca-dos-fungos, *Bradysia mabiusi* (Diptera: Sciaridae), praga em estufas. **BioAssay** (Piracicaba). 2012.

TOCHEN, V.; WALTON, S. Temperature-Related Development and Population Parameters for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) on Cherry and Blueberry. **Physiological Ecology**. 2013.

WALSH, D. B.; BOLDA, M. P.; GOODHUE, R. E.; DREVES, A. J.; LEE, J.; BRUCK, D. J.; WALTON, V. M.; O'NEAL, S. D.; ZALOM, F. G. *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): Invasive pest of ripening soft fruit expanding its geographic range and damage potential. **Journal of Integrates Pest Management**, p. 1-8, 2011

WHITE, G.F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**.v.66, 302– 303, 1927.

WOLTZ , J. M.; DONAHUE, K. M.; BRUCK, D. J.; LEE, J. C. Efficacy of commercially available predators, nematodes and fungal entomopathogens for augmentative control of *Drosophila suzukii*. **Journal of Applied Entomology**. Corvallis, OR, USA . 2014.

WOLTZ, J. M.; LEE, J.L. Pupation behavior and larval and pupal biocontrol of *Drosophila suzukii* in the field. **BiolControl**. 2017.

ZERVOS, S.; JOHNSON, S. C.; WEBSTE, M. Effect of temperature and inoculum size on reproduction and development of *Heterorhabditis heliothidis*

and *Steinernema glaseri* (Nematoda: Rhabditoidea) in *Galleria mellonella*. .
Can. J. Zool. Canada, 1990.

ZYL, C.V.; MALAN, A. P. The role of entomopathogenic nematodes as biological control agents of insect pests, with emphasis on the history of their mass culturing and *in vivo* production. **Entomological Society of Southern Africa**. 2014.