

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

MARIA PAULA BUENO COLLETTI

Efeitos das variações do binômio tempo/temperatura sobre embriões da linhagem mutante *ts/* Viena 8 de *Ceratitis capitata* (Wiedmann, 1824) (Díptera: Tephritidae).

Piracicaba
2007

MARIA PAULA BUENO COLLETTI

Efeitos das variações do binômio tempo/temperatura sobre embriões da linhagem mutante *ts*/ Viena 8 de *Ceratitis capitata* (Wiedmann, 1824) (Díptera: Tephritidae).

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de mestre em ciências.

Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente.
Orientador: Prof. Dr. Julio Marcos Melges Walder.

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

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

Colletti, Maria Paula Bueno

Efeitos das variações do binômio tempo/temperatura sobre Embriões da linhagem mutante *ts*/ Viena 8 de *Ceratitidis capitata* (Wiedmann, 1824) (Díptera: Tephritidae) / Maria Paula Bueno Colletti; orientador Julio Marcos Melges Walder - Piracicaba, 2007.

79 f. : fig.

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

1. Controle biológico de vetores 2. Sensibilidade letal a temperatura 3. Técnica do inseto estéril 4. Tratamento térmico de embriões I. Título

CDU 632.939.1

Dedicatória

*A meus pais, Regina e Luiz, com
amor, admiração, gratidão,
compreensão, carinho, presença e
grande apoio ao longo do período de
elaboração deste trabalho.*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Julio Marcos Melges Walder, que nesse período me ensinou, contribuindo para o meu crescimento científico e intelectual.

Ao Centro de Energia Nuclear e Agricultura “CENA”, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A Técnica de Laboratório Maria de Lourdes Zaniboni Costa pela amizade, paciência e apoio durante meu processo de orientação.

Ao Técnico de Laboratório Luis Anselmo Lopes, pela amizade e apoio durante meu processo de orientação.

A Thiago de Araújo Mastrangelo pela realização da análise estatística.

A meu namorado Renato, aos meus irmãos Mia e Luizito e a minha família, pelo amor, carinho, alegria e compreensão em todos os momentos dessa etapa, principalmente os mais difíceis.

A minha amiga Cristina pelo carinho, amizade e dedicação.

A Daiana, Lieni, Queliabe e Rafael pela amizade durante nosso tempo de convivência.

Aos meus amigos e colegas de Pós-graduação pela convivência e apoio durante meu curso de mestrado.

Aos meus amigos pela amizade e diversão.

COLLETTI, M.P.B. **Efeitos das variações do binômio tempo/temperatura sobre embriões da linhagem mutante *ts/* Viena 8 de *Ceratitis capitata* (Wiedmann, 1824) (Díptera: Tephritidae).** 2007. 79f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

As moscas-das-frutas são consideradas importantes pragas da fruticultura mundial, causando perdas significativas à produção e ao livre trânsito de frutas. Com a preferência por alimentos com baixos níveis de agrotóxicos, pesquisas estão buscando alternativas ecológica, social e econômica viáveis para o controle destas pragas. A Técnica do Inseto estéril (TIE) é uma técnica onde os insetos são criados, esterilizados e liberados em áreas infestadas, reduzindo a fertilidade da população selvagem, além de ser um método não poluente e não agressivo ao ambiente. Com o desenvolvimento de novos estudos da metodologia da TIE, foi introduzida uma nova linhagem mutante a Sensibilidade a Letal Temperatura (*ts/*) Viena-8, cujas fêmeas são sensíveis à alta temperatura, podendo ser eliminadas já na fase embrionária, no início da criação massal, agregando mais benefícios a este método de controle e/ou supressão de praga. Com diferentes testes de incubação de ovos da linhagem *ts/*, com temperaturas e tempos combinados e variados, comprovou-se a extrema sensibilidade às mudanças de temperatura. A temperatura ideal para a incubação dos ovos dessa linhagem está entre 24°C a 26°C pelo período de 24 a 48 horas. Deve-se tomar o máximo de cuidado com a elevação da temperatura acima de 26°C durante a manutenção e multiplicação dessa linhagem em condições de laboratório ou massalmente. Acima de 26°C, há sérios riscos de comprometer a qualidade dos insetos produzidos. O curto período de 6 horas a uma temperatura de 34°C, já é suficiente para alterar negativamente a proporção de fêmeas de ovos tratados termicamente.

Palavras-chave: *Ceratitis capitata*, Técnica do Inseto Estéril, Sensibilidade Letal a Temperatura.

COLLETTI, M.P.B. **Effects of the variations of the binomial time/temperature on embryos of the *ts/* Vienna 8 strain of *Ceratitis capitata* (Wiedmann, 1824) (Diptera: Tephritidae).** 2007. 79f. Dissertation (Master of Science) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

The fruit flies are considered important pests of the world horticulture, causing significant losses to the production and the free traffic of fruits. With the preference for foods with low levels of pesticides, researches are looking for alternatives ecological, social and economical viable for the control of these pests. The Sterile Insect Technique (SIT) is a technique where the insects are reared, sterilized and release in infested areas, reducing the fertility of the wild population, and is a method no pollutant and no aggressive to the environment. With the development of new studies of the methodology of SIT, a new mutation, Temperature Sensitive Lethal (*ts/*) Vienna 8, whose females are sensitive to the high temperature, could already be eliminated in the embryonic phase, in the beginning of the mass-rearing, resulting in more benefits to the control/suppression this pests. Different tests of incubation with eggs of *ts/* strain, with variation of time and temperature was done and proved a very sensitive to temperature changes. The ideal temperature for the incubation of the eggs is among 24°C to 26°C by the period from 24 to 48 hours. The maximum of care should be taken with the elevation of the temperature above 26°C during the maintenance and multiplication in laboratory conditions or mass-rearing. Above this temperature it can commit the quality of the produced insects. The short period of 6 hours with temperature to 34°C, is enough to change negatively the proportion of females of eggs in the thermal treatment.

Keywords: *Ceratitis capitata*, Sterile Insect Technique, Temperature Sensitive Lethal.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 4 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 3.1 TÉCNICA DO INSÉTO ESTÉRIL – TIE | 5 |
| 3.2 SENSIBILIDADE A LETAL TEMPERATURA | 7 |
| 3.3 FILTRO – FILTER REARING SYSTEM | 9 |
| 3.4 IDENTIFICAÇÃO DE RECOMBINANTES | 10 |
| 3.5 INCUBAÇÃO DE OVOS | 11 |
| 4. MATERIAL E MÉTODO | 13 |
| 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 13 |
| 4.2 COLETA E INCUBAÇÃO DE OVOS | 16 |
| 4.3 DIETA LARVAL | 18 |
| 4.4 COLETAS DE LARVAS | 19 |
| 4.5 SEPARAÇÃO DE PUPAS | 19 |
| 4.6 PARÂMETROS DE CONTROLE DE QUALIDADE | 20 |
| 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 20 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 21 |
| 5.1 TESTE A | 21 |
| 5.2 TESTES B | 31 |
| 5.3 TESTE C | 41 |
| 5.4 TESTE D | 47 |
| 5.5 TESTE E | 57 |
| 5.6 TESTE F | 66 |
| 6. CONCLUSÃO | 73 |
| 7. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 74 |

1. INTRODUÇÃO

A família Tephritidae inclui cerca de 4448 espécies arranjadas em 484 gêneros. É a maior família da Ordem Díptera e a mais importante economicamente. É representada em todas as regiões do mundo, exceto em áreas desérticas e árticas; cada espécie tem uma limitada distribuição natural, e sua maior diversidade ocorre nos trópicos. (WHITE; ÉLSON-HARRIS, 1992; THOMPSON, 1998; NORRBON, 2007). Aproximadamente 861 espécies ocorrem no continente americano (HERNANDEZ-ORTIZ; ALUJA, 1993).

As moscas-das-frutas são consideradas importantes pragas da fruticultura mundial, causando perdas significativas à produção e limitando o livre trânsito de frutas devido às restrições impostas pelos países importadores (MALAVASI, 2000). Atacam mais de 200 espécies frutíferas (CHRISTENSON; FOOTE, 1960), e em alguns países é uma praga quarentenária, ainda não se estabeleceu, daí a razão da não importação de frutos suscetíveis de infestação dos países exportadores que abrigam esta mosca (CÁCERES, 1990).

As espécies de moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil pertencem a quatro gêneros: *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis* e *Rhagoletis*. Os gêneros *Bactrocera* e *Ceratitis* estão representados no Brasil por uma única espécie – a mosca-da-carambola, *Bactrocera carambolae* Drew & Hancock e a mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (Wied.). O gênero *Rhagoletis* é representado por quatro espécies e o gênero *Anastrepha* é conhecido até agora por 94 espécies no Brasil. Do ponto de vista agrícola, apenas *Ceratitis capitata* e sete espécies de *Anastrepha* são as moscas-das-frutas economicamente importantes no Brasil (ZUCCHI, 2000).

O Brasil sendo o terceiro maior produtor de frutas frescas do mundo, produzindo cerca de 35 milhões de toneladas anualmente e aproximadamente 4 milhões de empregos diretos (MOURA; MOURA, 2006), deve se preocupar com as moscas-das-frutas uma vez que as mesmas causam prejuízos diretos consideráveis, elevando os custos de produção, além de limitar o mercado internacional (SILVA, 1990; FREIRE et al., 2005). Aliando as novas exigências dos consumidores, que buscam alimentos com níveis reduzidos de agrotóxicos, com a conscientização da população, dos riscos ambientais que esses produtos podem causar, a pesquisa científica vem buscando alternativas ecológica, social e econômica viáveis para o controle destes insetos-praga (CARVALHO et al., 2000).

A Técnica do Inseto estéril (Sterile Insect Technique - SIT) é uma técnica onde os insetos são criados, esterilizados e liberados em massa em áreas infestadas com número conhecido de insetos selvagens. Quando os machos estéreis acasalam com fêmeas selvagens não ocorre descendência, decrescendo o potencial reprodutivo da população selvagem. Com a liberação por um longo período e em número considerável, pode acontecer a erradicação da praga (KNIPLING, 1955). Além disso, é um método não poluente e não agressivo ao ambiente (PATTON, 1982; HENDRICHS et al., 1982; HENTZE; MATA, 1988).

Com a evolução da metodologia da Técnica do Inseto Estéril na supressão e até mesmo na erradicação de moscas-das-frutas, introduziu-se o conceito da liberação de somente machos estéreis, eliminando-se as fêmeas durante a fase inicial do ciclo da praga. Isto trouxe maior eficiência e economia e a metodologia. Em 1994, Franz e colaboradores introduziram uma linhagem mutante de *Ceratitis capitata*, cujas fêmeas são sensíveis a alta temperatura. Desta forma, as fêmeas podem ser eliminadas já na fase embrionária, no início da criação massal, agregando mais

benefícios a este método de controle e/ou supressão de praga em programas de área ampla.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo determinar os efeitos do binômio tempo/temperatura em embriões da linhagem mutante de *Ceratitis capitata* (*tsl*-Viena 8) através da qualidade dos insetos produzidos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Técnica do Inseto Estéril – TIE

É considerada um tipo de controle autocida ou genético, onde a praga é empregada para o seu próprio controle. O uso de insetos estéreis para controlar ou erradicar uma população de inseto, foi uma iniciativa revolucionária na entomologia moderna (WALDER, 1990).

De acordo com a International Plant Protection Convention (IPPC) (FAO 2005), a TIE é definida como um método de controle de pragas usando liberações inundativas de insetos estéreis em uma área ampla para reduzir a fertilidade da população selvagem de uma mesma espécie, envolvendo uma produção massal da praga-alvo (KLASSEN; CURTIS, 2005; KLASSEN, 2005). Esta produção massal é exposta a radiação gama para induzir a esterilidade sexual (ROBINSON, 2005; KLASSEN, 2005). É uma tecnologia estabelecida para a supressão e/ou erradicação de uma determinada praga (TAN, 2000).

O início para este bem sucedido manejo de praga em área ampla, integrando a TIE foi na década de 50. Começou para livrar o sudoeste Americano da mosca varejeira *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), um parasita de criação de gados. Durante 43 anos a tecnologia foi usada para erradicar essa praga dos Estados Unidos, México e América Central (VARGAS-TERÁN, 2005).

Com o sucesso da TIE na erradicação da mosca da varejeira, houve um estímulo para o seu uso contra espécies de moscas-das-frutas (BOLLER, 1987). Na década de 70 iniciou-se o primeiro programa em larga-escala com a *Ceratitidis capitata*, estabelecido para bloquear sua disseminação na América Central e sul do México (HENDRICHS et al., 1983; KRAFSUR et al., 1998). Em 1980 e 1990 a TIE foi

implementada no Japão para erradicar a mosca-do-melão *Bactrocera cururbitae* (Coquillett) e em 1995 o Chile se tornou um país livre de *Ceratitidis capitata* (KLASSEN; CURTIS, 2005).

Dentre todos os programas de erradicação e/ou supressão populacional de moscas-das-frutas, é importante destacar o Programa MOSCAMED (*Ceratitidis capitata*) realizado no México e Guatemala. Este programa começou após a detecção da mosca-do-mediterrâneo na Guatemala em 1976 e no México em janeiro de 1977. Nesse mesmo ano, foi assinado um acordo bilateral com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), com o apoio da organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e a Agencia Internacional de Energia Atômica (IAEA). A TIE foi escolhida como o principal método de controle dentro do programa global de manejo integrado da praga (PATTON, 1982).

A TIE pode ser melhorada com a liberação de somente machos. Após a criação e a esterilização, os insetos são liberados dentro de uma determinada área onde os machos estéreis se acasalam com as fêmeas selvagens prevenindo sua reprodução (KNIPLING, 1955), resultando em descendentes inviáveis. Se fêmeas estéreis também forem liberadas, elas podem minimizar a eficiência de controle, acasalando com os machos estéreis, e conseqüentemente não contribuindo com transferência de esterilidade para a população selvagem. Conseqüentemente, as liberações simultâneas de ambos os sexos são geralmente menos econômicas e menos efetivas do que a liberação de somente machos (ROBINSON et al., 1999). A técnica requer que apenas machos estéreis sejam liberados (KNIPLING, 1955; FISHER, 2000; FRANZ, 2005). Depois de repetidas liberações de insetos estéreis, a população selvagem é suprimida, podendo até ser erradicada (HENDRICHS, 2000).

Com a introdução de técnicas genéticas tornou-se possível a separação dos sexos de *Ceratitis capitata* nas fases imaturas do inseto, (FRANZ et al., 1994). Estas linhagens são conhecidas por GSS (Sistemas de Sexagem Genética), como apenas o macho contribui para a indução de esterilidade. Esses sistemas foram baseados em translocações cromossômicas entre os cromossomos determinantes de macho e um autossomo carregando um tipo de marcador seletivo, como, por exemplo, pupas de coloração diferente (WALDER, 1990; CÁCERES et al., 1993; FRANZ, 1994).

Atualmente, a linhagem chamada *tsl* (Sensibilidade Letal a Temperatura) é a mais utilizada pelas biofábricas de *Ceratitis capitata* no mundo, por ser sensível a uma determinada temperatura (ROBINSON et al., 1999), eliminando todos os embriões fêmea através de um tratamento térmico de ovos imersos em água por 24 horas a 34°C (FISHER; CÁCERES, 2000; CÁCERES et al., 2000; FRANZ, 2005) e viabilizando apenas os machos, trazendo economia e eficiência no controle da praga.

3.2 Sensibilidade Letal a Temperatura (Temperature Sensitive Lethal- *tsl*)

Ceratitis capitata tsl, sensíveis a alta temperatura, são linhagens mutantes onde as fêmeas são mortas no estágio de embriões com a aplicação de altas temperaturas por um determinado tempo (CÁCERES et al., 2002).

A *tsl* foi desenvolvida no laboratório da Agência Internacional de Energia Nuclear (IAEA) em Seibersdorf, Áustria, e introduzida em processo de criação massal. Ela promoveu a evolução da TIE eliminando as fêmeas no processo de produção massal. O tratamento térmico dos ovos elimina as fêmeas devido à presença do gene recessivo a temperatura letal no cromossomo X que exerce essa dominância na fêmea (XX) (TWEEN, 2002). Os machos são resistentes às altas temperaturas e

emergem de pupas marrons, enquanto as fêmeas são sensíveis às altas temperaturas e emergem de pupas brancas (CÁCERES, 2002).

Essa mutação foi mapeada no braço direito do autossomo 5 e é associada a outra mutação, a de coloração das pupas, pupas brancas (*wp*) (FRANZ et al., 1994; FRANZ, 2005). A *wp* é também incluída no sistema de sexagem genética para monitorar parâmetros genéticos importantes durante a criação massal. A falta de *wp* após o tratamento térmico pode ser usada para verificar que a produção é precisa e que o sistema é mantido na configuração apropriada. A *wp* (pupa branca) é usada como marcador em relação ao sexo (CÁCERES, 2002). Isto tem resultado no baixo nível de recombinação, mantendo a estabilidade quando criados em grande número (FRANZ et al., 1994).

A *tsl* gera economia no processo de produção, como economia de dieta, maior espaço na criação, menor mão de obra, reduz custos de detecção/identificação e elimina a oviposição desnecessária de fêmeas estéreis. Além disso, a ausência de fêmeas estéreis também elimina o acasalamento de machos estéreis com fêmeas estéreis e conseqüentemente 100% dos espermatozoides estéreis podem ser dedicados para acasalamentos com fêmeas selvagens (TWEEN, 2002).

A primeira *tsl*-GSS foi criada no começo dos anos 90 (FRANZ et al., 1994). Representou a maior inovação e um aumento na eficiência da TIE em mosca-do-mediterrâneo desde a separação de sexo até a fase de ovo. Esse tipo de sistema carrega duas mutações, *wp* e *tsl*, sendo perfeitamente testado o comportamento sexual, a competitividade e a efetividade no campo. A linhagem Vienna 42, e seus “sucessores” foram testadas em todos os níveis em laboratório, em gaiolas de campo e em campo aberto (CÁCERES et al., 2002).

Para a produção de *ts/* é necessário o desenvolvimento de um Sistema de Criação em Filtro (Filter Rearing System - FRS) para minimizar o grau de recombinação. (CÁCERES, 2002; FRANZ, 2005). A recombinação ou a tendência de reverter o cromossomo modificado para o cromossomo padrão deve ser efetivamente gerenciada no processo de criação massal. O filtro envolve a separação física das pupas pela sexagem genética, onde os adultos que emergem das pupas brancas são fêmeas de *ts/* e de pupas marrons são machos de *ts/*. Na recombinação ocorre a emergência de fêmea em pupa marrom e emergência de macho em pupa branca (TWEEN, 2002; CÁCERES, 2002; FRANZ, 2005).

3.3 Filtro (Filter Rearing System – FRS)

O “filtro” é o componente chave da criação massal. Seu objetivo é a detecção de recombinantes e a sua eliminação. Pois em uma criação massal a ocorrência de recombinação, mesmo que em pequena quantidade, desestabilizará o sistema de sexagem. É uma colônia de tamanho pequeno e seguida de 3 ou 4 gerações de amplificação de material, podendo ser produzidos machos para esterilização, liberação e o restabelecimento da colônia (CÁCERES, 2002; TWEEN, 2002; FRANZ, 2005). O número de machos estéreis necessários no campo determina o número de passos de amplificação (geração) e o tamanho do filtro. Cada geração constitui uma colônia independente e todas são mantidas em condições abaixo das condições ambientais (CÁCERES, 2002).

Nenhum inseto que esteja no processo de criação massal pode retornar ao filtro. E outra observação importante sobre o filtro, os insetos permanecem em condições de baixo stress para que sua qualidade seja mantida, e também permite que o processo de substituição da colônia seja simplificado (CÁCERES, 2002).

No filtro o procedimento para a redução de fêmeas recombinantes (*wp ts/+*) é baseado na diferença da velocidade do desenvolvimento de larva de *ts/* e larva de *ts/+*, onde *ts/+* (machos de pupas marrons) se desenvolvem mais rápido do que larvas de *ts/* (fêmeas de pupas brancas). Como as pupas são coletadas diariamente, as primeiras coletas consistirão de machos e as últimas coletas consistirão de fêmeas. As fêmeas *wp ts/+* aparecerão nas primeiras coletas junto com os machos. Se nas primeiras coletas obtiveram apenas machos e nas últimas coletas apenas fêmea, a seleção estará muito efetiva (CÁCERES, 2002; IAEA/FAO, 2001; FRANZ, 2005).

3.4 Identificação de Recombinantes

Na estrutura da GSS há a ausência de recombinação em machos. Mas pode ocorrer recombinação em fêmeas, em duas regiões do autossomo, a primeira recombinação as fêmeas são resistentes ao calor e emergem de pupas marrons e machos sensíveis ao calor emergem de pupas brancas. É fácil de remover esse tipo de recombinantes, no filtro, após a emergência de um indivíduo, de pupa marrom ou branca, é anotado o sexo do adulto, e machos emergidos de pupas brancas e fêmeas emergidas de pupas marrons, são descartados antes que uma nova geração seja estabelecida. O segundo tipo de recombinação é mais difícil de eliminar, pois os machos recombinantes continuam emergindo de pupas marrons, mas eles são homozigotos para *ts/*, sendo assim, sensíveis às altas temperaturas, e o principal, as fêmeas recombinantes emergem de pupas brancas, são *ts/* heterozigotos e são resistentes às altas temperaturas. Se fêmeas com esse genótipo são incluídas na criação massal e no tratamento térmico final, elas serão liberadas junto com os machos. Esses indivíduos recombinantes não podem ser removidos apenas pela

checagem de sexo (pupas marrons machos e pupas brancas fêmeas). Na teoria, eles podem ser removidos pelo resultado de cruzamento de cada geração e depois checando a temperatura resposta dos descendentes. Em larga escala esse procedimento não é viável. Isso pode ser resolvido, baseado no fato de que os indivíduos homozigotos para *ts/* têm seu desenvolvimento mais lento do que heterozigoto (FISHER, 2000; CÁCERES, 2002; FRANZ, 2005).

Como machos recombinantes, homozigotos para *ts/*, desenvolvem mais lentamente do que os machos não recombinantes, eles podem ser eliminados pelo filtro a cada geração usando apenas machos emergidos de pupas marrons da primeira coleta. E as fêmeas recombinantes, heterozigotos para *ts/*, podem ser eliminadas usando apenas fêmeas das últimas coletas de pupas brancas (CÁCERES, 2002), terceira e quarta coletas. Nesse caso a chance que os recombinantes são incluídos no FRS é extremamente pequena (CÁCERES, 2002).

3.5 Incubação de Ovos

Os ovos são incubados em água (porcentagem de v/v de 1:20), em garrafa plástica e são oxigenados por aerador de aquário por 48 horas, e depois colocados em dieta larval. No sistema normal de manutenção da colônia numa criação massal, os ovos são oxigenados a 24 °C por 48 horas (IAEA/FAO, 2003).

Para a eliminação das fêmeas, é feito o tratamento nesta etapa, com a elevação da temperatura a 34°C. A exatidão do tratamento é próxima de 100%. A qualidade e a quantidade de machos não são afetadas pelo tratamento (FRANZ, 2005).

No entanto, há um forte efeito maternal associado com a mutação de *ts/* e o tratamento térmico dos embriões a 34°C durante as primeiras 24 horas de vida embrionária e, isto ocorrendo, embriões de machos também são eliminados

(FISHER, 2000; CÁCERES, 2002; FRANZ, 2005). Assim, para obter o máximo de machos viáveis depois do tratamento térmico, os ovos são oxigenados a 24°C na primeira 24 horas e a 34°C apenas na segunda 24 horas de desenvolvimento (FISHER, 2000; IAEA/FAO, 2003; FRANZ, 2005).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia (LIARE) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Piracicaba, São Paulo.

A linhagem mutante de *Ceratitis capitata* utilizada foi a *tsl* - Viena 8 (*tsl*-V8), criada nos laboratórios do LIARE/CENA.

4.1 Delineamento Experimental

Foram realizados seis experimentos contemplando variações de temperatura e tempos de incubação.

Teste A: temperaturas diferentes de incubação por período fixo de 24 horas. Os tratamentos foram:

- A1) 24°C/24h
- A2) 26°C/24h
- A3) 28°C/24h
- A4) 30°C/24h
- A5) 32°C/24h
- A6) 34°C/24h
- A7) 24°C/48 h (Padrão)

Teste B: temperaturas diferentes de incubação por período fixo de 48 horas. Os tratamentos foram:

- B1) 24°C/48h (Padrão)
- B2) 26°C/48h
- B3) 28°C/48h

B4) 30°C/48h

B5) 32°C/48h

B6) 34°C/48h

Teste C: temperaturas diferentes de incubação por período de 24 horas, seguidos de tratamento térmico fixo em 34°C por mais 24 horas, totalizando 48 horas de incubação. Os tratamentos foram:

C1) 24°C/24 h + 34°C/24 h (tratamento térmico para produção de machos)

C2) 26°C/24 h + 34°C/24 h

C3) 28°C/24 h + 34°C/24 h

C4) 30°C/24 h + 34°C/24 h

C5) 32°C/24 h + 34°C/24 h

C6) 34°C/24 h + 34°C/24 h

C7) 24°C/24 h + 24°C/24 h (Padrão)

Teste D: temperaturas diferentes de incubação por período fixo de 24 horas, seguidos de tratamento térmico fixo em 24°C por mais 24 horas, totalizando 48 horas de incubação. Os tratamentos foram:

D1) 24°C/24 h + 24°C/24 h (Padrão)

D2) 26°C/24 h + 24°C/24 h

D3) 28°C/24 h + 24°C/24 h

D4) 30°C/24 h + 24°C/24 h

D5) 32°C/24 h + 24°C/24 h

D6) 34°C/24 h + 24°C/24 h

Teste E: temperatura constante a 24°C nas primeiras 24 horas, seguindo-se de um aumento de temperatura por mais 24 horas, totalizando 48 horas de incubação.

Os tratamentos foram:

- E1) 24°C/24 h + 24°C/24 h (Padrão)
- E2) 24°C/24 h + 26°C/24 h
- E3) 24°C/24 h + 28°C/24 h
- E4) 24°C/24 h + 30°C/24 h
- E5) 24°C/24 h + 32°C/24 h
- E6) 24°C/24 h + 34°C/24 h (tratamento para produção de machos)

Teste F: Mantendo somente as duas temperaturas (24°C e 34°C) usuais e variando o tempo de ação das mesmas sobre os ovos/embriões num total de 48 horas. Os tratamentos serão:

- F1) 24°C/48 h (Padrão)
- F2) 24°C/42 h + 34°C/6 h
- F3) 24°C/36 h + 34°C/12 h
- F4) 24°C/30 h + 34°C/18 h
- F5) 24°C/24 h + 34°C/24 h (tratamento para produção de machos)
- F6) 24°C/18 h + 34°C/30 h
- F7) 24°C/12 h + 34°C/36 h
- F8) 24°C/6 h + 34°C/42 h
- F9) 34°C/48 h

4.2 Coleta e incubação dos ovos

Os ovos foram coletados em calhas com água, localizadas nas laterais das gaiolas de adultos por um período de 5 horas (9 horas até 14 horas), para confirmar a fase de desenvolvimento embrionário dentro destas poucas horas. O volume de ovos coletados (2 mL ~ 47 000 ovos) foi dividido igualmente entre os tratamentos.

Após a coleta os ovos foram colocados em solução de benzoato de sódio a 0,03% por aproximadamente 5 minutos e depois lavados com água filtrada em carvão ativado.

Volumentricamente, utilizando-se de uma pipeta graduada de 1 mL, foram colocados 0,2 mL de ovos em recipientes de polietileno (250 mL) contendo 200mL de água filtrada, onde se deu a oxigenação.

A oxigenação dos ovos é uma das etapas mais importantes da criação massal de *Ceratitís capitata*. Ela é essencial para ativar o processo embrionário que estava paralisado, uma vez que o ovo encontrava-se imerso em água, portanto em estado de anoxia. A oxigenação foi feita por borbulhamento através de aeradores apropriados para aquário (Figura 1).

É durante o período de oxigenação que é aplicado o tratamento térmico nos embriões. Os recipientes foram colocados em equipamentos de banho-maria com diferentes temperaturas (Figura 2), variando a temperatura de 24°C a 34°C, conforme o teste. As temperaturas do banho-maria foram mantidas por circuladores de água com termostato digital (ISCO modelo GTR 190).



Figura 1 – Sistema de bombas de ar para aquário utilizadas no processo de oxigenação dos ovos para ativar o processo embrionário durante o período de incubação.



Figura 2 – Sistema de banho-maria com os recipientes para oxigenação utilizados na incubação dos ovos em diferentes temperaturas.

Após o período de incubação, para cada tratamento e repetição foram retiradas amostras de aproximadamente 100 ovos para controle de qualidade dos mesmos. Foram verificados, sobre papel filtro umidecido e após incubação por 4 dias em placas de petri, a $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, o número de ovos hialinos, danificados, cório e o número de larvas, resultando no índice de viabilidade dos ovos. Os demais ovos, ao final do tratamento, foram transferidos para bandejas, na forma de semeadura,

contendo dieta para larvas (WALDER, 2002), obedecendo a proporção de 1,5 kg de dieta para cada mL de ovos.

4.3 Dieta Larval

Foi utilizado 300 g de dieta para cada 0,2 mL de ovos em bandejas de poliestireno (18,0 cm x 24,0 cm x 4,0 cm de altura) (Figura 3).

Após a incubação, os ovos/larvas foram separados por peneiramento em tecido “voil” e transferidos para a dieta. Imediatamente após esta semeadura, foi adicionado sobre eles 3 mL de solução de benzoato de sódio a 0,03% para melhor distribuição no meio e evitar contaminação por microrganismos. As bandejas foram transferidas para caixas maiores (41,0 cm x 34,0 cm x 13,5 cm) com tampa telada (Figura 4) com vermiculita ao fundo, para esperar as larvas “pularem” da dieta para o meio de empupação e realizar as cinco coletas previstas de larvas. Todo este processo de desenvolvimento do ciclo da mosca deu-se em sala climatizada a 23-24°C e 75-80% UR.



Figura 3 – Dieta com larvas de *C. capitata* em bandeja de poliestireno sobre camada de vermiculita como meio de empupação.

4.4 Coletas de larvas

As coletas foram iniciadas após 10 a 11 dias da semeadura dos ovos na dieta. Durante cinco dias seguidos, pela manhã, a vermiculita das caixas era peneirada para a remoção das pupas e/ou larvas presentes. Estas foram colocadas em copos plásticos (500 mL) com tampas perfuradas contendo também vermiculita para completa empupação e desenvolvimento pupal (Figura 4).



Figura 4 – Caixa contendo vermiculita para coleta de larvas e meio de empupação.

4.5 Separação de pupas

No quinto ou sexto dia da fase pupal, as pupas foram recuperadas por peneiramento, medidas volumetricamente, contadas e separadas pela coloração branca ou marrom. Amostras de até 100 pupas por repetição foram retiradas e transferidas para copos plásticos (300 mL) com tampa ventilada para se aguardar a emergência dos adultos (Figura 5).



Figura 5 – Recipientes utilizados para desenvolvimento pupal e emergência de adultos de *C. capitata*.

4.6 Parâmetros de Controle de Qualidade

Baseando-se nas normas de controle de qualidade preconizadas pela FAO/IAEA/USDA (2002), foram avaliados os seguintes parâmetros entomológicos de desenvolvimento da linhagem *tsl*-Viena 8 de *Ceratitis capitata*: viabilidade de ovos, número de pupas recuperadas, viabilidade de pupas, razão sexual; porcentagem de machos e fêmeas em função da seqüência de coleta de larvas

4.7 Análise Estatística

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado contendo cada tratamento quatro repetições. Para a viabilidade dos ovos foi utilizado o teste de Dunnet (α 0,05%) e os demais (número e porcentagem de pupas, porcentagem de emergência e razão sexual) foram submetidos à análise de variância com aplicação do teste de Tukey (α 0,05%) para as médias, todos pelo programa estatístico SAS 9.1 (2003).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Teste A: Variação de temperatura (24°C a 34°C) de incubação dos ovos por um tempo fixo de 24 horas.

5.1.1 Viabilidade de ovos

Na Tabela 1, constam os resultados de viabilidade dos ovos de *Ceratitis capitata* linhagem *tsl*-Viena 8 (*tsl*-V8), do tratamento padrão (A7) e dos demais, incubados por 24 horas em diferentes temperaturas.

Tabela 1 – Viabilidade de ovos de *Ceratitis capitata* *tsl*-Viena 8, incubados em diferentes temperaturas.

| Tratamentos (°C/h) | Viabilidade média (%) |
|--------------------|-----------------------|
| A1 (24/24) | 64,2 |
| A2 (26/24) | 70,0 |
| A3 (28/24) | 56,3 |
| A4 (30/24) | 56,1 |
| A5 (32/24) | 61,7 |
| A6 (34/24) | 23,5 |
| A7 (24/48) | 76,4 |

A análise das médias de viabilidade dos ovos foi realizada pelo teste de Dunnet (α 0,05), uma vez que se buscou saber a diferença dos valores obtidos dos tratamentos em relação ao tratamento padrão – A7 (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise estatística pelo teste de Dunnet (α 0,05) dos valores médios de viabilidade de ovos dos diferentes tratamentos térmicos de incubação em relação ao tratamento padrão (A7).

| Tratamentos | Diferença entre médias | Intervalo de confiança (95%) | |
|-------------|------------------------|------------------------------|--------|
| A2 – A7 | -6,4 | -32,2 | 19,8 |
| A1 – A7 | -12,3 | -38,5 | 13,9 |
| A5 – A7 | -14,7 | -40,9 | 11,5 |
| A3 – A7 | -20,2 | -46,4 | 6,1 |
| A4 – A7 | -20,4 | -46,6 | 5,9 |
| A6 – A7 | -52,9 | -79,2 | -26,7* |

* Diferença significativa a 5%. CV = 22,6%

Pelos resultados, verifica-se que somente o tratamento A6, de incubação na temperatura mais alta (34°C/24h), foi diferente do tratamento padrão A7 (24 °C/48h). A incubação à temperatura mais elevada (34°C) teve perda significativa de 68,75% na viabilidade em comparação ao tratamento padrão. Essa diferença em viabilidade foi provavelmente devida à alta temperatura (34°C) uma vez que não só os embriões fêmea *ts/* são sensíveis a alta temperatura, mas também os machos nesta fase inicial de desenvolvimento, caracterizado pelas primeiras 24 horas de incubação, fenômeno este denominado efeito maternal (FISHER, 2000; CÁCERES, 2002; FRANZ, 2005).

5.1.2 Número de pupas

Os valores médios de pupas, as porcentagens de pupas marrons (machos) e brancas (fêmeas) recuperadas em cada tratamento térmico por seqüência de coleta (de primeira a quinta), assim como a análise estatística (Tukey) são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores médios (N = 4) do número e porcentagem de pupas marrons (machos) e pupas brancas (fêmeas) dentro de cada coleta.

| Tratamento (°C/hora) | Coletas | Pupas brancas (F) | | Pupas marrons (M) | |
|-------------------------|---------|-------------------|---------|-------------------|----------|
| | | Nº médio | % | Nº médio | % |
| Primeira | | | | | |
| A1 (24/24) | | 5 | 3,1 | 50 ab | 96,9 a |
| A2 (26/24) | | 72 | 42,3 | 365 ab | 89,4 a |
| A3 (28/24) | | 2 | 30,4 | 7 b | 69,6 a |
| A4 (30/24) | | 39 | 12,2 | 205 ab | 62,8 a |
| A5 (32/24) | | 3 | 0,7 | 257 ab | 99,3 a |
| A6 (34/24) | | 1 | 33,5 | 153 ab | 66,5 a |
| A7 (24/48) | | 108 | 16,1 | 570 a | 83,9 a |
| | | SH | SH | CV=45,1 | CV=38,8 |
| Segunda | | | | | |
| A1 (24/24) | | 59 ab | 17,9 ab | 294 ab | 81,9 a |
| A2 (26/24) | | 230 a | 41,8 a | 263 ab | 58,2 a |
| A3 (28/24) | | 11 bc | 15,3 ab | 56 b | 84,7 a |
| A4 (30/24) | | 94 abc | 29,1 ab | 101 b | 70,9 a |
| A5 (32/24) | | 28 abc | 13,1 ab | 231 ab | 86,9 a |
| A6 (34/24) | | 1 c | 0,2 b | 93 b | 99,8 a |
| A7 (24/48) | | 411 a | 34,8 a | 721 a | 65,2 a |
| | | CV=34,6 | CV=32,5 | CV=28,1 | CV=41,6 |
| Terceira | | | | | |
| A1 (24/24) | | 190 ab | 54,5 a | 176 a | 45,5 abc |
| A2 (26/24) | | 169 b | 71,4 a | 80 a | 28,6 bc |
| A3 (28/24) | | 64 bc | 37,8 a | 128 a | 62,2 ab |
| A4 (30/24) | | 78 bc | 52,1 a | 79 a | 47,9 abc |
| A5 (32/24) | | 55 bc | 49,8 a | 68 a | 50,2 abc |
| A6 (34/24) | | 6 c | 4,3 b | 108 a | 95,7 a |
| A7 (24/48) | | 410 a | 78,7 a | 122 a | 21,3 c |
| | | CV=29,8 | CV=20,6 | CV=49,7 | CV=21,2 |
| Quarta | | | | | |
| A1 (24/24) | | 111 ab | 79,1 ab | 27 a | 20,9 bc |
| A2 (26/24) | | 64 ab | 81,3 a | 14 a | 18,7 bc |
| A3 (28/24) | | 85 ab | 58,7 b | 62 a | 41,4 ab |
| A4 (30/24) | | 39 b | 86,9 a | 12 a | 13,0 c |
| A5 (32/24) | | 38 b | 80,4 ab | 10 a | 19,6 bc |
| A6 (34/24) | | 11 b | 22,7 c | 21 a | 77,3 a |
| A7 (24/48) | | 200 a | 92,2 a | 21 a | 7,8 c |
| | | CV=41,2 | CV=18,9 | CV=38,8 | CV=24,2 |
| Quinta | | | | | |
| A1 (24/24) | | 21 ab | 78,9 a | 6 a | 21,0 a |
| A2 (26/24) | | 15 ab | 78,7 a | 5 a | 21,3 a |

Continua

| Conclusão | | | | |
|------------|---------|---------|----------|---------|
| A3 (28/24) | 33 ab | 83,3 a | 11 a | 16,7 a |
| A4 (30/24) | 13 ab | 85,8 a | 3 a | 14,2 a |
| A5 (32/24) | 17 ab | 98,3 a | 2 a | 1,7 a |
| A6 (34/24) | 3 b | 26,4 b | 3 a | 23,6 a |
| A7 (24/48) | 66 a | 92,2 a | 7 a | 7,8 a |
| | CV=28,6 | CV=24,1 | CV= 51,1 | CV=35,0 |

SH - Sem Homocedasticidade. CV - valores em porcentagem. Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Verifica-se que na primeira coleta de larvas houve grande variabilidade de valores no número de pupas brancas (fêmeas) recuperadas não apresentando, portanto, homocedasticidade para uma análise estatística. Quanto ao número pupas marrons (macho) apenas o tratamento A3 (28 °C/24h), com baixíssima recuperação (7 pupas), apresentou diferença em relação ao tratamento padrão A7 (570 pupas). Apesar da grande variação entre os valores não houve diferença entre os demais. A porcentagem de pupas marrons (macho) em relação às brancas manteve-se alta conforme o esperado na primeira coleta (CÁCERES, 2002) apresentando valores superiores a 62 % e não foram diferentes entre si.

Na segunda coleta, em relação ao tratamento padrão, baixo número de pupas brancas foi recuperado nos demais tratamentos, mas diferenças estatísticas em relação ao padrão foram verificadas somente tratamentos A3 (28°C/24h) e A6 (34°C/24h). A recuperação de pupas marrons também teve queda acentuada (A3, A4 e A6) em relação ao tratamento padrão. Quanto às porcentagens de pupas marrons (machos), estas se mantiveram altas (>58%) em relação às pupas brancas (fêmeas) em todos os tratamentos.

Na terceira coleta, verificou-se que em todos os tratamentos, o número de pupas recuperadas foi menor do que o obtido no tratamento padrão (A7), com exceção do A1 (24°C/24h), o que era esperado, uma vez que a temperatura de

incubação foi igual ao do padrão, variando somente o tempo de oxigenação que foi menor em 24 horas. Quanto aos valores de porcentagem de pupas brancas (fêmeas) ocorridas nesta terceira coleta, o único tratamento diferente dos demais foi o A6 (34°C/24h) demonstrando, mais uma vez, a severidade da alta temperatura (34°C) neste período embrionário. Não houve diferença entre os tratamentos quanto ao número de pupas marrons (machos) recuperado, mas as porcentagens em relação às pupas fêmeas sofreram alterações e diferenças por se tratar de terceira coleta onde a ocorrência de fêmeas começa a aumentar (CÁCERES, 2002) Verificou-se também uma maior porcentagem (95,7%) de pupas marrons (machos) no tratamento A6 devido a quase total eliminação dos embriões fêmea na fase de incubação.

Na quarta coleta, o número e a porcentagem de pupas brancas (fêmeas) recuperadas aumentou conforme o esperado, com exceção do tratamento A6 (24°C/24h). Em relação ao tratamento padrão (24°C/48h) somente os tratamentos A4 (30°C/24h), A5 (32°C/24h) e A6 (34°C/24h) diferiram, por apresentarem as maiores temperaturas de incubação que interferem na viabilidade do embrião fêmea. Não houve diferença entre nenhum tratamento com relação ao número de pupas machos embora as porcentagens obtidas nos tratamentos A3 (28°C/24h) e A5 (32°C/24h) tenham diferido dos demais.

Normalmente a quinta coleta de larvas apresenta resultados não satisfatórios quanto à qualidade dos insetos e por isto mesmo num sistema de cria massal ela é desprezada. Nesta coleta normalmente ocorre quase que somente pupas fêmeas e muito raramente pupas machos, de baixíssima qualidade (Julio Walder - informação pessoal). No presente trabalho, verificou-se mais uma vez um baixo número de pupas fêmeas no tratamento A6 (34°C/24h), único a diferir do padrão.

De um modo geral o que se destacou neste teste A foi o efeito negativo da alta temperatura (34 °C) sobre os embriões fêmea durante as primeiras 24 horas de incubação. Também era esperado que os tratamentos com 30°C (A4) e 32 °C (A5) apresentassem resultados negativos diferentes do tratamento padrão (A) uma vez que a partir de 30°C começa a mortalidade de embriões fêmea *ts/* (FRANZ, 2005), mas isto não ocorreu regularmente provavelmente pelo tempo curto de 24 horas.

Com os valores de número de pupas recuperadas dentro das diferentes coletas de larvas, elaborou o gráfico da Figura 6.

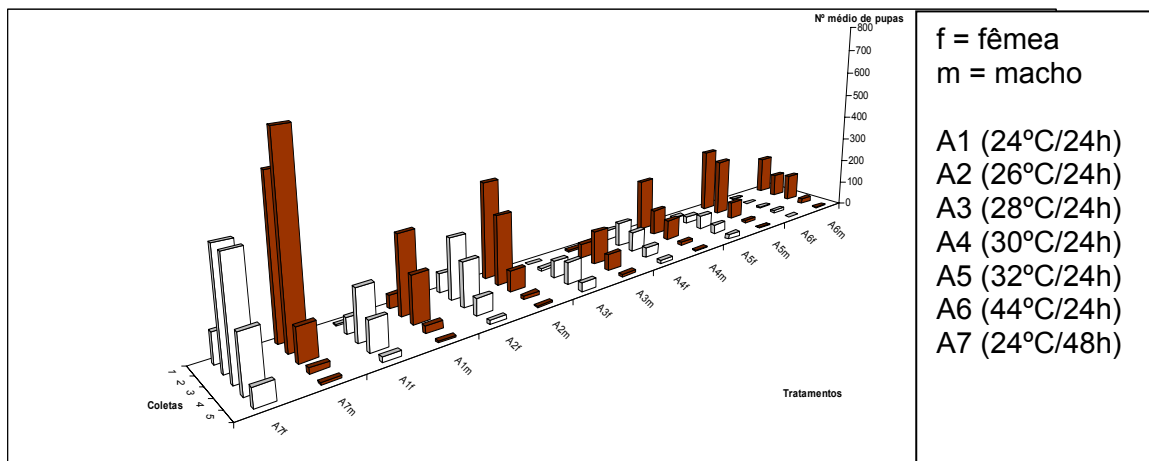


Figura 6. Número de pupas brancas (fêmeas) e pupas marrons (machos) em função das diferentes temperaturas de incubação por 24 horas (tratamentos) e por seqüência de coleta de larvas (5).

Em primeiro plano estão os valores do tratamento padrão (24°C/48h) seguido dos demais tratamentos. Pelo gráfico pode-se comparar o número de pupas machos e pupa fêmea nas cinco coletas de cada tratamento, onde na primeira e segunda coleta há predominância de pupas machos, na terceira coleta há um balanço entre pupas macho e fêmea (50% machos e 50% fêmeas), na quarta coleta se observa o aumento de pupas fêmeas e a diminuição de pupas machos e na quinta coleta a quase ausência de pupas machos.

Observa-se que com o aumento da temperatura entre os tratamentos há uma diminuição do número de pupas tanto de fêmea como de macho, indicando o efeito negativo da alta temperatura nos embriões de *Ceratitis capitata*, linhagem *tsI-V* 8. Segundo Franz et al., 1996, isso se dá por um forte efeito materno associado com a mutação de *tsI* e o tratamento térmico dos embriões a 34°C durante as primeiras 24 horas de vida embrionária matando também embriões de machos.

Com os valores da porcentagem entre pupas brancas (fêmeas) e pupas marrons (machos) elaborou-se o gráfico da Figura 7.

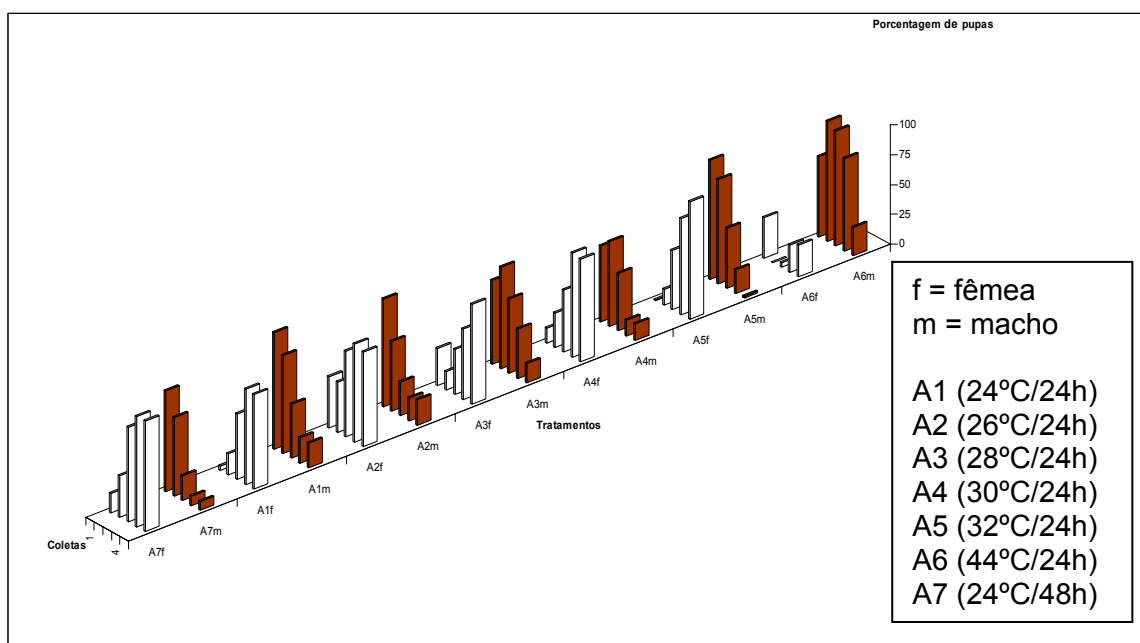


Figura 7. Relação (%) entre pupas brancas (fêmeas) e pupas marrons (machos) recuperadas por tratamento e sua distribuição entre as diferentes coletas de larvas.

Observa-se que de um modo geral a distribuição porcentual de pupas fêmeas e pupas machos dentro das distintas coletas seguiu um mesmo padrão com pequenas diferenças nos tratamentos A2 e A3, com relação às pupas fêmeas. Mais uma vez, pode-se notar o efeito negativo da alta temperatura (34°C) do tratamento

A6, sobre os embriões fêmea, reduzindo a recuperação de pupas brancas e inviabilizando-as na segunda e terceira coletas.

5.1.3 Porcentagem de emergência de adultos e Razão sexual

A média da porcentagem de adultos emergidos e a razão sexual são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores médios de porcentagem de emergência de adultos e razão sexual.

| Tratamento (°C/h) | % Emergência | | Razão sexual |
|----------------------|--------------|-----------|--------------|
| | Fêmea | Macho | (Média) |
| A1 (24/24) | 64,6 a | 59,4 a | 0,61 b |
| A2 (26/24) | 57,1 a | 57,3 a | 0,58 b |
| A3 (28/24) | 63,4 a | 68,9 a | 0,57 b |
| A4 (30/24) | 63,1 a | 58,2 a | 0,62 b |
| A5 (32/24) | 55,5 a | 57,9 a | 0,91 a |
| A6 (34/24) | 29,4 b | 64,3 a | 0,93 a |
| A7 (24/48) | 75,5 a | 52,8 a | 0,53 b |
| | CV= 24,1% | CV= 51,7% | CV=2,25% |

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Em relação aos valores da Tabela 4 verifica-se que houve diferença significativa entre a emergência de adultos somente para fêmeas no tratamento A6. Portanto a incubação de ovos a diferentes temperaturas, variando de 24°C a 34°C pelo período de 24 horas, afetou somente a emergência de fêmeas no final do ciclo evolutivo, quando os embriões foram incubados com temperatura de 34°C por 24 horas.

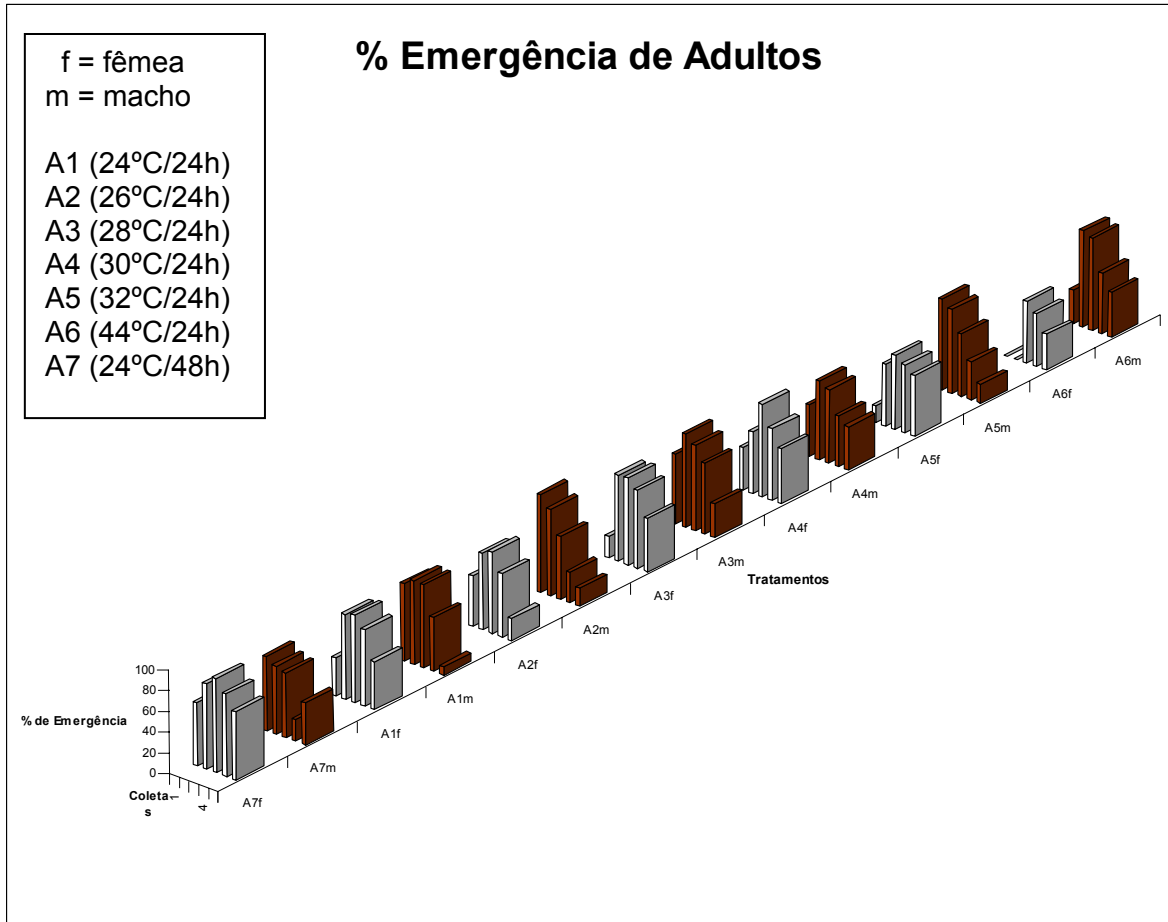


Figura 8 – Gráfico ilustrativo comparando as porcentagens de emergência de adultos em função dos tratamentos térmicos para cada seqüência de coleta realizada.

Quanto à razão sexual, apenas os tratamentos A5 (32°C/24h) e A6 (34°C/24h) diferiram de todos os outros. Neste caso, como pode-se verificar que as temperaturas mais elevadas (32°C e 34°C) eliminaram quase que totalmente os embriões fêmea motivo pelo qual a razão sexual verificada nestes tratamentos apresentou valores de próximos de 1 que seria a ocorrência se somente machos (Figura 9).

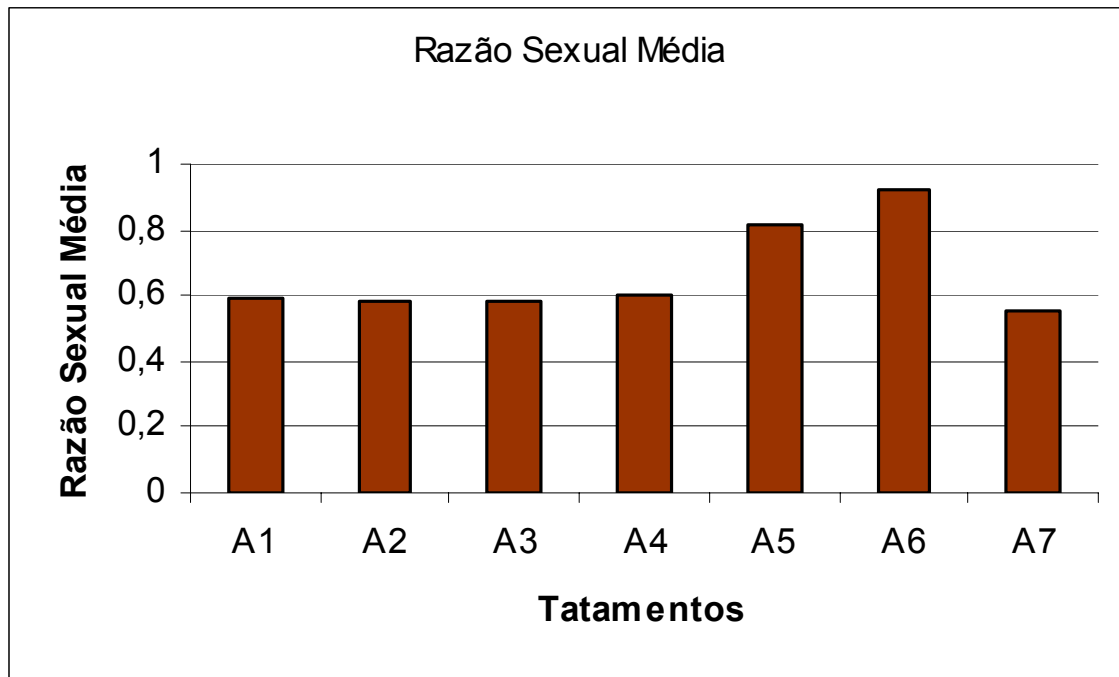


Figura 9. Razão sexual $[m/(m+f)]$ em função da incubação embrionária em diferentes temperaturas (24°C a 34°C) por período fixo de 24 horas.

5.2. Teste B: Temperaturas diferentes de incubação por período fixo de 48 horas.

5.2.1 Viabilidade de ovos

Na Tabela 5, constam os resultados de viabilidade dos ovos de *Ceratitis capitata* linhagem *tsl-V8*, do tratamento padrão B1 e dos demais incubados por 48 horas em diferentes temperaturas.

Tabela 5 - Viabilidade de ovos de *Ceratitis capitata* *tsl-Viena 8*, incubados em diferentes temperaturas.

| Tratamentos (°C/h) | Viabilidade média (%) |
|--------------------|-----------------------|
| B1 (24/48) | 65,9 |
| B2 (26/48) | 52,5 |
| B3 (28/48) | 44,2 |
| B4 (30/48) | 47,9 |
| B5 (32/48) | 38,2 |
| B6 (34/48) | 3,0 |

A análise das viabilidades dos ovos foi realizada pelo teste de Dunnet (α 0,05), uma vez que se buscou saber a diferença dos valores obtidos dos tratamentos em relação ao padrão (Tabela 6).

Tabela 6 – Análise estatística pelo teste de Dunnet (α 0,05) dos valores médios de viabilidade de ovos dos diferentes tratamentos térmicos de incubação em relação ao tratamento padrão.

| Tratamentos | Diferença entre médias | Intervalo de confiança 95% | |
|-------------|------------------------|----------------------------|-------|
| B2 – B1 | -13,4 | -38,5 | 11,7 |
| B4 – B1 | -17,9 | -43,0 | 7,2 |
| B3 – B1 | -21,6 | -46,7 | 3,5 |
| B5 – B1 | -27,7 | -52,8 | -2,6* |
| B6 – B1 | -34,8 | -59,9 | -9,7* |

* Diferença significativa a 5%. CV = 27,6%

Os tratamentos B5 (32°C/48h) e B6 (34°C/48h) obtiveram resultados diferentes do tratamento padrão B1 (24°C/48h). Esses tratamentos tiveram perda de viabilidade de 42% e 52,8%, respectivamente. Como comentado anteriormente, essa diferença foi devido à alta temperatura uma vez que não só os embriões fêmea *ts/* são sensíveis a alta temperatura, mas também os machos nesta fase inicial de desenvolvimento, caracterizado pelas primeiras 24 horas de incubação, conforme demonstrado os trabalhos de Fisher, 2000, Cáceres, 2002 e Franz, 2005.

5.2.2 Número de Pupas

Os valores médios de pupas, as porcentagens de pupas marrons (machos) e brancas (fêmeas) recuperadas em cada tratamento térmico por seqüência de coleta (de primeira a quinta), assim como a análise estatística (Tukey) são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores médios (N = 4) do número e porcentagem de pupas marrons (machos) e pupas brancas (fêmeas) dentro de cada coleta.

| Tratamento (°C/hora) | Coletas | Pupas brancas (F) | | Pupas marrons(M) | |
|-------------------------|---------|-------------------|----------|------------------|---------|
| | | Nº médio | % | Nº médio | % |
| Primeira | | | | | |
| B1 (24/48) | | 14 | 5,3 | 123 a | 94,6 a |
| B2 (26/48) | | 202 | 13,4 | 913 a | 86,6 a |
| B3 (28/48) | | 24 | 6,0 | 201 a | 93,9 a |
| B4 (30/48) | | 26 | 4,1 | 389 a | 95,9 a |
| B5 (32/48) | | 1 | 0,1 | 189 a | 99,8 a |
| B6 (34/48) | | 0 | 0,2 | 62 a | 99,8 a |
| | | SH | SH | CV=44,6 | CV=12,6 |
| Segunda | | | | | |
| B1 (24/48) | | 60 abc | 16,9 abc | 205 a | 79,1 bc |
| B2 (26/48) | | 305 a | 57,4 a | 190 a | 26,7 d |
| B3 (28/48) | | 72 abc | 26,9 ab | 197 a | 71,8 c |
| B4 (30/48) | | 103 ab | 26,8 ab | 189 a | 64,3 c |
| B5 (32/48) | | 4 bc | 2,9 bc | 91 a | 96,1 ab |
| B6 (34/48) | | 0 c | 0 c | 148 a | 100 a |

Continua

| Conclusão | CV=44,9 | CV=15,6 | CV=25,9 | CV=19,9 |
|------------|---------|---------|---------|---------|
| Terceira | | | | |
| B1 (24/48) | 192 a | 48,5 a | 251 a | 51,5 bc |
| B2 (26/48) | 297 a | 70,9 a | 185 a | 29,0 c |
| B3 (28/48) | 146 ab | 48,6 a | 142 a | 51,5 bc |
| B4 (30/48) | 169 a | 50,8 a | 110 a | 49,3 bc |
| B5 (32/48) | 14 bc | 13,1 b | 62 a | 86,9 ab |
| B6 (34/48) | 0 c | 0,5 c | 191 a | 99,5 a |
| | CV=26,5 | CV=16,8 | CV=17,1 | CV=29,1 |
| Quarta | | | | |
| B1 (24/48) | 154 a | 59,8 a | 101 ab | 40,1 bc |
| B2 (26/48) | 14 a | 78,4 a | 46 b | 21,6 c |
| B3 (28/48) | 101 ab | 50,1 ab | 72 ab | 49,9 bc |
| B4 (30/48) | 102 ab | 50,3 ab | 45 ab | 43,5 bc |
| B5 (32/48) | 13b c | 19,4 bc | 30 b | 80,6 ab |
| B6 (34/48) | 0 c | 0,0 c | 139 a | 100 a |
| | CV=29,5 | CV=26,9 | CV=16,0 | CV=33,4 |
| Quinta | | | | |
| B1 (24/48) | 89 a | 64,9 a | 43 ab | 26,9 c |
| B2 (26/48) | 77 a | 81,2 a | 21 b | 18,8 c |
| B3 (28/48) | 66 ab | 59,1 ab | 37 ab | 40,9 bc |
| B4 (30/48) | 56 ab | 71,9 a | 19 ab | 28,1 c |
| B5 (32/48) | 11 bc | 28,5 b | 22 ab | 71,5 ab |
| B6 (34/48) | 1c | 1,3 c | 84 a | 98,7 a |
| | CV=23,4 | CV=18,6 | CV=21,7 | CV=33,0 |

SH - Sem Homocedasticidade. CV - Valores em porcentagem. Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Na primeira coleta de larvas houve grande variabilidade de valores no número de pupas brancas (fêmea) recuperadas não apresentando, portanto, homocedasticidade para uma análise estatística. Em relação ao número de pupas marrons recuperadas (macho) não houve diferença entre nenhum tratamento em relação ao padrão B1. A porcentagem de pupas marrons (machos) em relação às brancas manteve-se alta conforme o esperado na primeira coleta (CÁCERES, 2002), apresentando valores superiores a 86,6 % e não foram diferentes entre si.

Na segunda coleta de pupas brancas recuperadas (fêmeas) observa-se que tanto em número de pupas e porcentagem, apenas os tratamentos B5 (32°C/48h) e

B6 (34°C/48h) tiveram diferenças estatísticas em relação ao padrão B1 (24°C/48h). Em pupas marrons recuperadas (macho) não houve diferença entre nenhum tratamento em relação ao padrão B1. Quanto à porcentagem, mesmo que o tratamento B2 (26°C/48h) teve diferença estatística em relação ao padrão, as pupas marrons (macho) continuam maiores do que pupas brancas (fêmeas), machos > 64%.

Por se tratar de uma terceira coleta observa-se o aumento do número de pupas brancas (fêmea) recuperadas (CÁCERES, 2002), e tanto em número de pupas como em porcentagem apenas os tratamentos B5 (32°C/48h) e B6 (34°C/48h) diferenciam-se do tratamento padrão B1 (24/48), demonstrando a severidade da alta temperatura (32°C e 34°C) no período de incubação. Em pupas marrons recuperadas (macho) não houve diferença entre nenhum tratamento em relação ao padrão B1. Já na porcentagem dos tratamentos B5 (32°C/48h) e B6 (34°C/48h) houve diferenças significativas em relação ao padrão B1 (24°C/48h), confirmando o efeito maternal nas primeiras 24 horas da embriogênese (FISHER, 2000; CÁCERES, 2002; FRANZ, 2005). .

Na quarta coleta de pupas brancas recuperadas (fêmeas) observa-se que em número de pupas e porcentagem apenas os tratamentos B5 (32/48) e B6 (34/48) diferenciam-se do tratamento padrão B1(24/48), devido à alta temperatura. E em pupas marrons (macho) observa-se a diminuição do número de pupas recuperadas em relação ao padrão B1 (24/48) e observa-se que a porcentagem do tratamento B6 (34°C/48h) obteve uma porcentagem maior (100%), devido ao efeito negativo da alta temperatura nos embriões fêmea.

Na quinta coleta o número de pupas brancas recuperadas (fêmea) e porcentagem diferenciaram os tratamentos B5 (32°C/48h) e B6 (34°/48h) do

tratamento padrão B1 (24°C/48h), pois a baixa qualidade das pupas somada ao efeito da alta temperatura inviabilizou esta coleta. Na coleta de macho apenas as porcentagens dos tratamentos B5 (32°C/48h) e B6 (34°C/48h) diferenciaram-se do tratamento padrão B1 (24°C/48h), devido a total eliminação dos embriões fêmea na fase de incubação, principalmente a 34°C.

O que se destacou neste teste B foi o efeito negativo das temperaturas de 32°C e 34°C sobre os embriões fêmea durante as 48 horas de incubação. Neste teste B a temperatura de 30 °C não afetou o desenvolvimento dos embriões fêmea, como o esperado, pois como já citado, a partir de 30 °C começa a mortalidade de embriões fêmea *ts/* (FRANZ, 2005),

Com os valores de número de pupas recuperadas dentro das diferentes coletas de larvas, elaborou-se o gráfico da Figura 10.

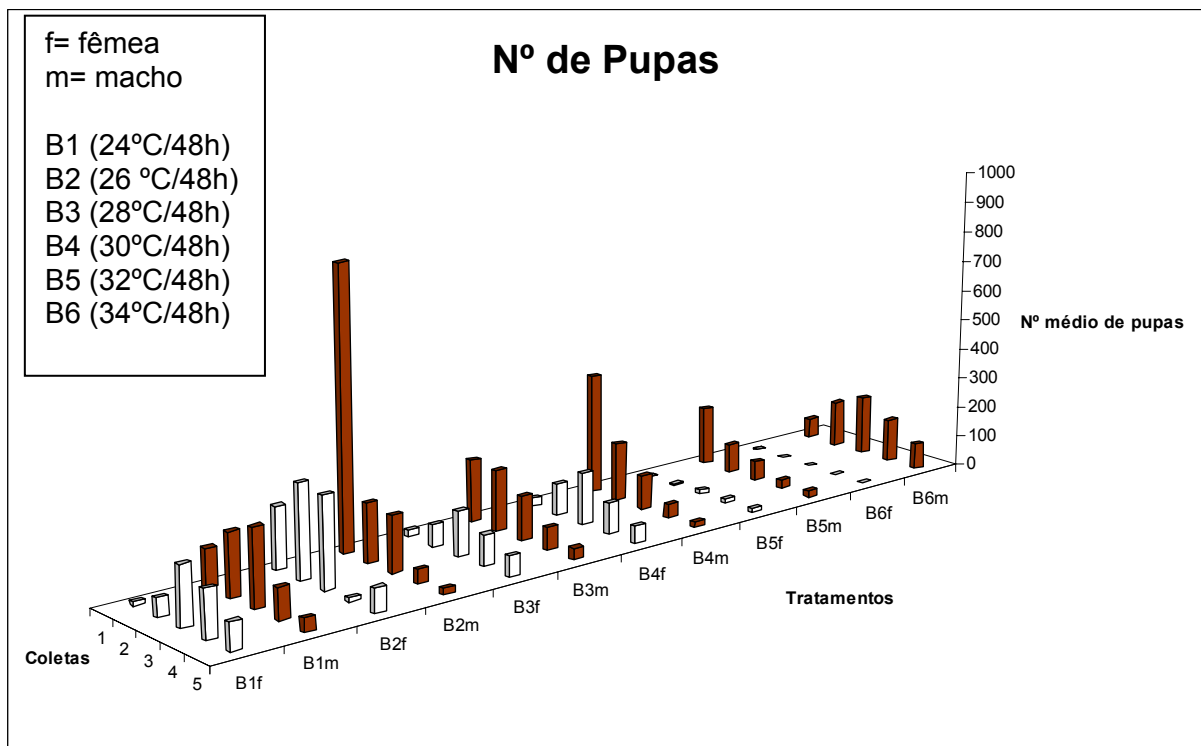


Figura 10. Número de pupas brancas (fêmeas) e pupas marrons (machos) em função das diferentes temperaturas de incubação por 48 horas (tratamentos) e por seqüência de coleta de larvas (5).

Em primeiro plano estão os valores do tratamento padrão (24°C/48h) seguido dos outros tratamentos. Pelo gráfico pode-se comparar o número de pupas machos e pupas fêmeas nas cinco coletas de cada tratamento, onde na primeira e segunda coleta houve predominância de pupas machos, na terceira coleta há um balanço entre pupas macho e fêmea (50% machos e 50% fêmeas), na quarta coleta se observa o aumento de pupas fêmeas e a diminuição de pupas machos e na quinta coleta a quase ausência de pupas machos.

Observa-se que com o aumento da temperatura entre os tratamentos há a diminuição do número de pupas tanto de fêmea como de macho, o que indica o efeito negativo da alta temperatura nos embriões de *Ceratitidis capitata*, linhagem *tsl-V8*, principalmente pelo longo período de 48 horas de incubação. Mais uma vez comprova-se o efeito maternal nos embriões de machos nas primeiras 24 horas de vida embrionária (FISHER, 2000; CÁCERES, 2002; FRANZ, 2005).

Com os valores da porcentagem entre pupas brancas (fêmeas) e pupas marrons (machos) elaborou-se o gráfico da Figura 11.

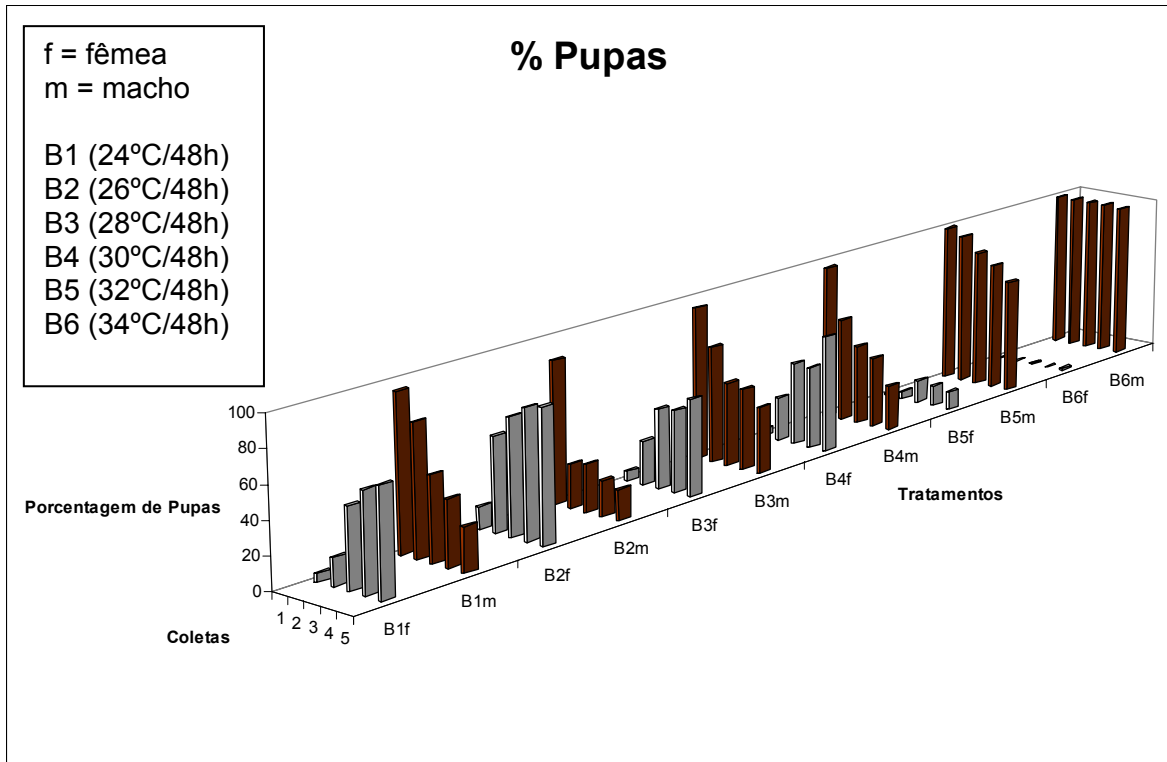


Figura 11. Relação (%) entre pupas brancas (fêmeas) e pupas marrons (machos) recuperadas por tratamento e sua distribuição entre as diferentes coletas de larvas.

Pelo gráfico da Figura 11 pode-se notar que a distribuição porcentual de pupas fêmeas e pupas machos dentro das distintas coletas seguiu um mesmo padrão, com exceção das fêmeas nos tratamentos B5 e B6, podendo-se notar o efeito negativo das altas temperaturas (32°C e 34°C). Houve redução quase que total na recuperação de pupas brancas em B5 e inviabilizando-as em B6, com a predominância de pupas marrons nas cinco coletas de B6 (34°C/48h). Isso foi devido a total eliminação de embriões fêmea nessa fase de incubação.

5.2.3 Porcentagem de emergência e Razão sexual

A média da porcentagem de adultos emergidos e a razão sexual estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores médios de porcentagem de emergência de adulto e razão sexual.

| Tratamento (°C/h) | % Emergência | | Razão Sexual |
|----------------------|--------------|----------|--------------|
| | Fêmea | Macho | Média |
| B1 (24/48) | 73,8 a | 71,3 a | 0,59 cd |
| B2 (26/48) | 70,3 a | 51,3 a | 0,56 d |
| B3 (28/48) | 79,9 a | 76,3 a | 0,64 c |
| B4 (30/48) | 52,9 a | 70,4 a | 0,66 cd |
| B5 (32/48) | 51,9 a | 78,3 a | 0,91 b |
| B6 (34/48) | 18,4 b | 82,0 a | 0,99 a |
| | CV=39,4% | CV=30,0% | CV=4,4% |

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Com relação aos valores da Tabela 8 verifica-se que não houve diferença significativa entre a emergência de adultos na quase totalidade dos tratamentos. Somente fêmeas do tratamento B6, tiveram a emergência afetada pela incubação embrionária a alta temperatura. Nos demais tratamentos, a incubação de embriões a diferentes temperaturas, variando de 24°C a 32°C pelo período de 48 horas, não afetou a emergência dos adultos no final do ciclo evolutivo (Figura 12).

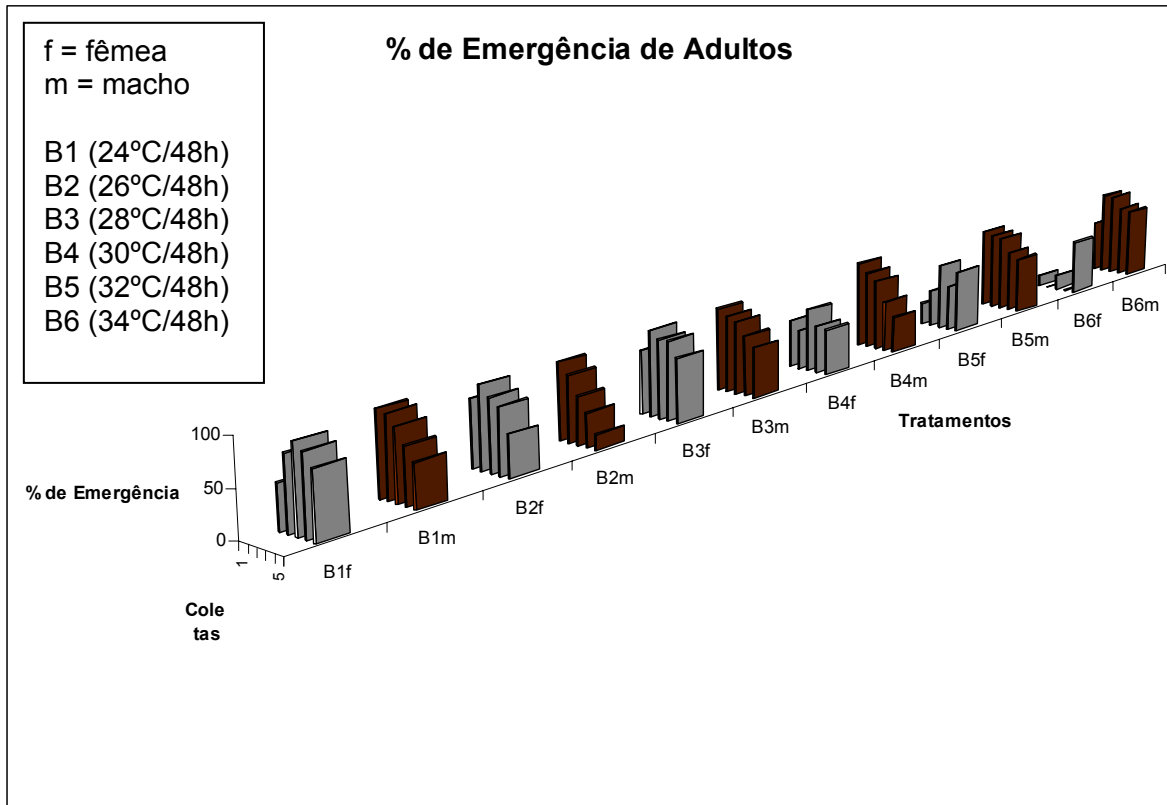


Figura 12. Gráfico ilustrativo comparando as porcentagens de emergência de adultos em função dos tratamentos térmicos para cada seqüência de coleta realizada.

Quanto à razão sexual, apenas os tratamentos B5 (32°C/24h) e B6 (34°C/24h) diferiram de todos os outros. Neste caso, como se pode verificar, que as temperaturas mais elevadas (32°C e 34°C) eliminaram quase que totalmente os embriões fêmea motivo pelo qual a razão sexual verificada nestes tratamentos apresentou valores de próximos de 1 que seria a ocorrência se somente machos (Figura 13).

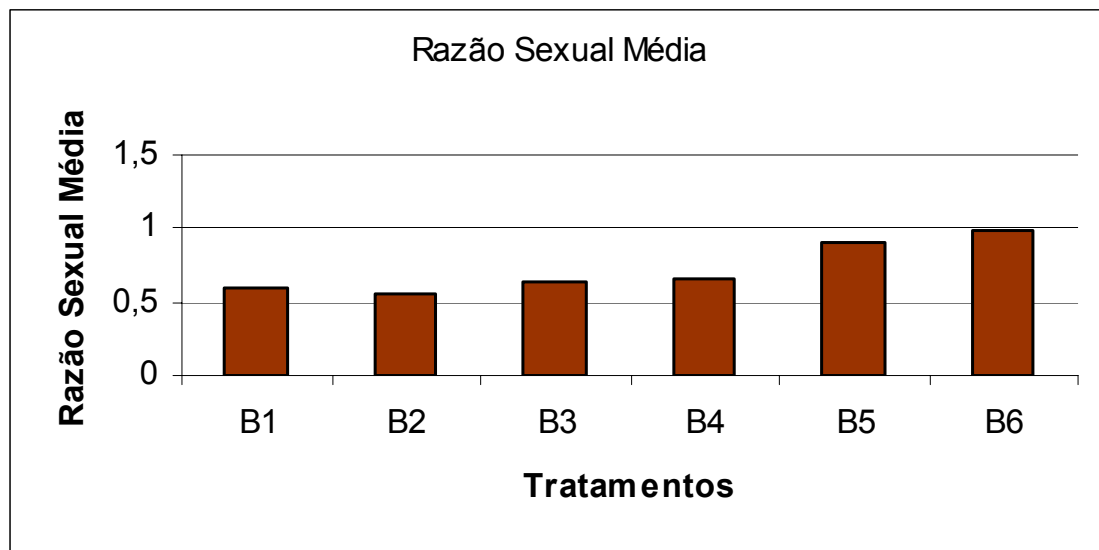


Figura 13. Razão sexual $[m/(m+f)]$ em função da incubação embrionária em diferentes temperaturas (24°C a 34°C) por período fixo de 48 horas.

5.3 Teste C: Temperaturas diferentes de incubação por período de 24 horas, seguidos de tratamento térmico fixo em 34°C por mais 24 horas, totalizando 48 horas de incubação.

5.3.1 Viabilidade de ovos

Na Tabela 9, constam os resultados de viabilidade dos ovos de *Ceratitis capitata* linhagem *tsl-V8*, do tratamento padrão e dos demais incubados por 24 horas em diferentes temperaturas.

Tabela 9 - Viabilidade de ovos de *Ceratitis capitata* *tsl-Viena 8*, incubados em diferentes temperaturas.

| Tratamentos (°C/h) | Viabilidade média (%) |
|--------------------|-----------------------|
| C1 (24/24+34/24) | 39,8 |
| C2 (26/24+34/24) | 31,2 |
| C3 (28/34+34/24) | 24,8 |
| C4 (30/24+34/24) | 43,4 |
| C5 (32/24+34/24) | 32,6 |
| C6 (34/24+34/24) | 28,8 |
| C7 (24/48) | 42,8 |

A análise das viabilidades dos ovos foi realizada pelo teste de Dunnet (α 0,05), uma vez que se buscou saber a diferença dos valores obtidos dos tratamentos em relação ao padrão (Tabela 10).

Tabela 10 - – Análise estatística pelo teste de Dunnet (α 0,05) dos valores médios de viabilidade de ovos dos diferentes tratamentos térmicos de incubação em relação ao tratamento padrão (C7).

| Tratamentos | Diferença entre médias | Intervalo de confiança 95% | |
|-------------|------------------------|----------------------------|------|
| C 1 – C7 | -5,3 | -35,9 | 46,4 |
| C 4 – C 7 | -4,04 | -45,2 | 37,1 |
| C 5 – C 7 | -14,2 | -55,4 | 26,9 |
| C 2 – C 7 | -14,9 | -56,1 | 26,2 |
| C 6 – C 7 | -19,02 | -60,2 | 22,1 |
| C 3 – C 7 | -20,9 | -62,1 | 20,2 |

* Diferença significativa a 5%. CV = 46,7%

Verifica-se que não houve diferença estatística das médias de viabilidade de ovos obtidas nos diferentes dos tratamentos de incubação em relação ao tratamento padrão (C7).

5.3.2 Número de pupas

Com os valores de número de pupas recuperadas dentro das diferentes coletas de larvas, elaborou o gráfico da Figura 14.

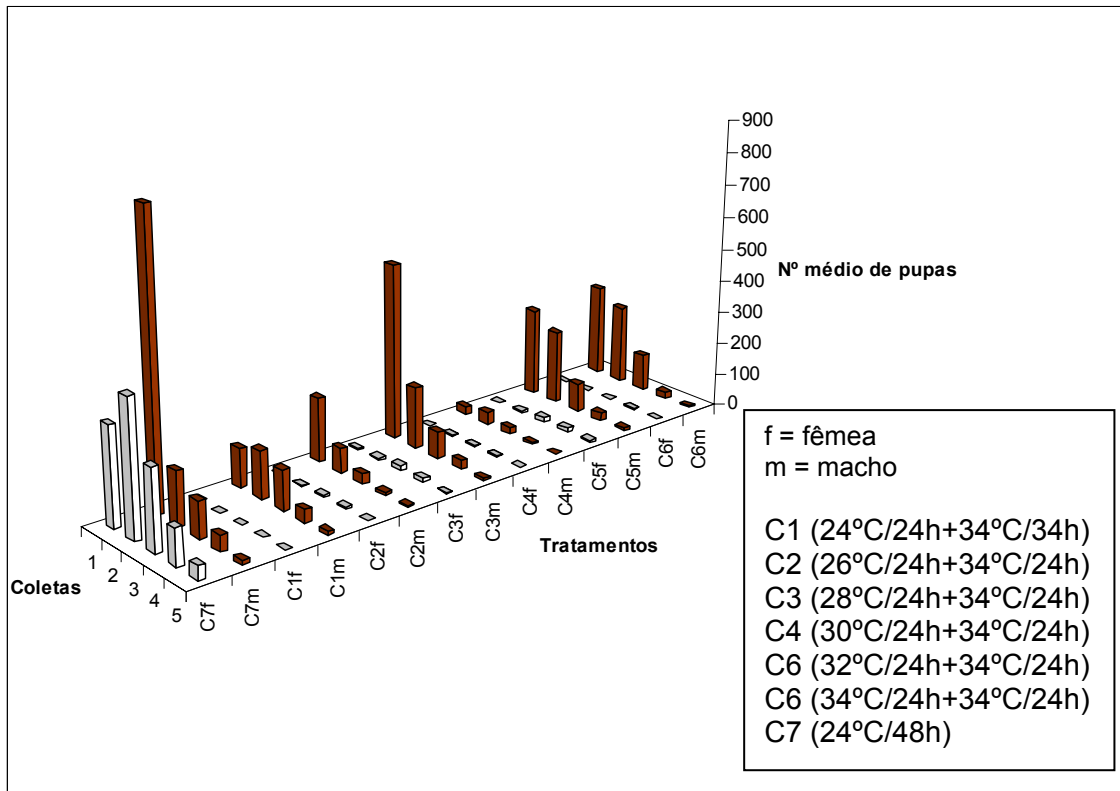


Figura 14. Número de pupas brancas (fêmeas) e pupas marrons (machos) em função das diferentes temperaturas de incubação por 48 horas (tratamentos) e por seqüência de coleta de larvas (5).

Com o aumento da temperatura entre os tratamentos houve a total diminuição do número de pupas brancas (fêmea) e marrons (macho), levando a sua inviabilidade. Isso é causado pela alta temperatura de incubação na primeira fase do desenvolvimento do embrião de *ts/V8*, confirmando o efeito maternal ocorrido durante as primeiras 24 horas de vida embrionária matando também embriões de machos (FISHER, 2000; CÁCERES, 2002; FRANZ, 2005).

Com os valores da porcentagem entre pupas brancas (fêmeas) e pupas marrons (machos) elaborou o gráfico da Figura 15.

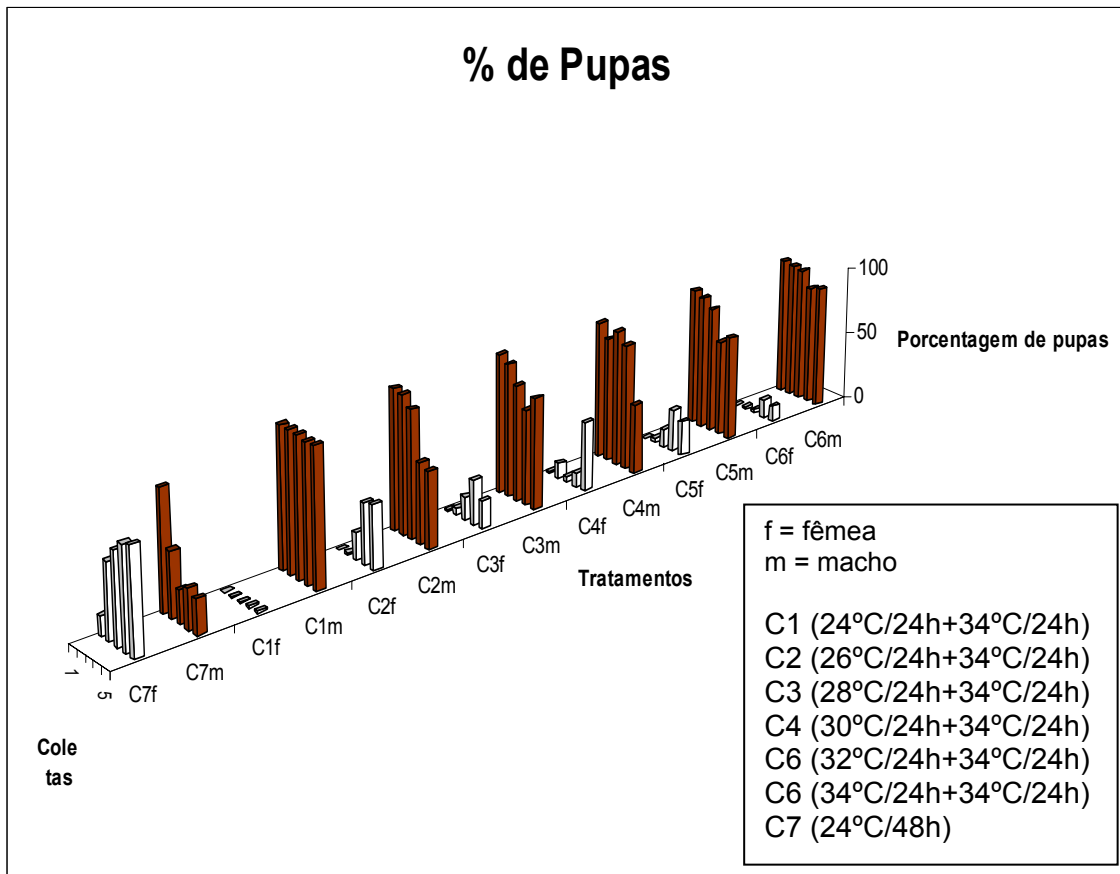


Figura 15. Relação (%) entre pupas brancas (fêmeas) e pupas marrons (machos) recuperadas por tratamento e sua distribuição entre as diferentes coletas de larvas.

Em relação à porcentagem de pupas verificou-se a diminuição de pupas brancas (fêmea) nos tratamentos C2 (26°C/24h + 34°C/24h), C3 (28°C/24h + 34°C/24h), C4 (30°C/24h + 34°C/24h) e C5 (32°C/24h + 34°C/24h) e a ausência de pupas brancas (fêmea) nos tratamentos C1 (24°C/24h + 34°C/24h) e C6 (34°C/24h + 34°C/24h), em relação ao tratamento padrão C7 (24°C/48h). E em pupas marrons (macho) há uma maior porcentagem devido à eliminação dos embriões fêmea na fase de incubação.

5.3.3 Porcentagem de emergência de adultos e Razão Sexual

Com os valores da porcentagem de emergência elaborou-se o gráfico da Figura 16.

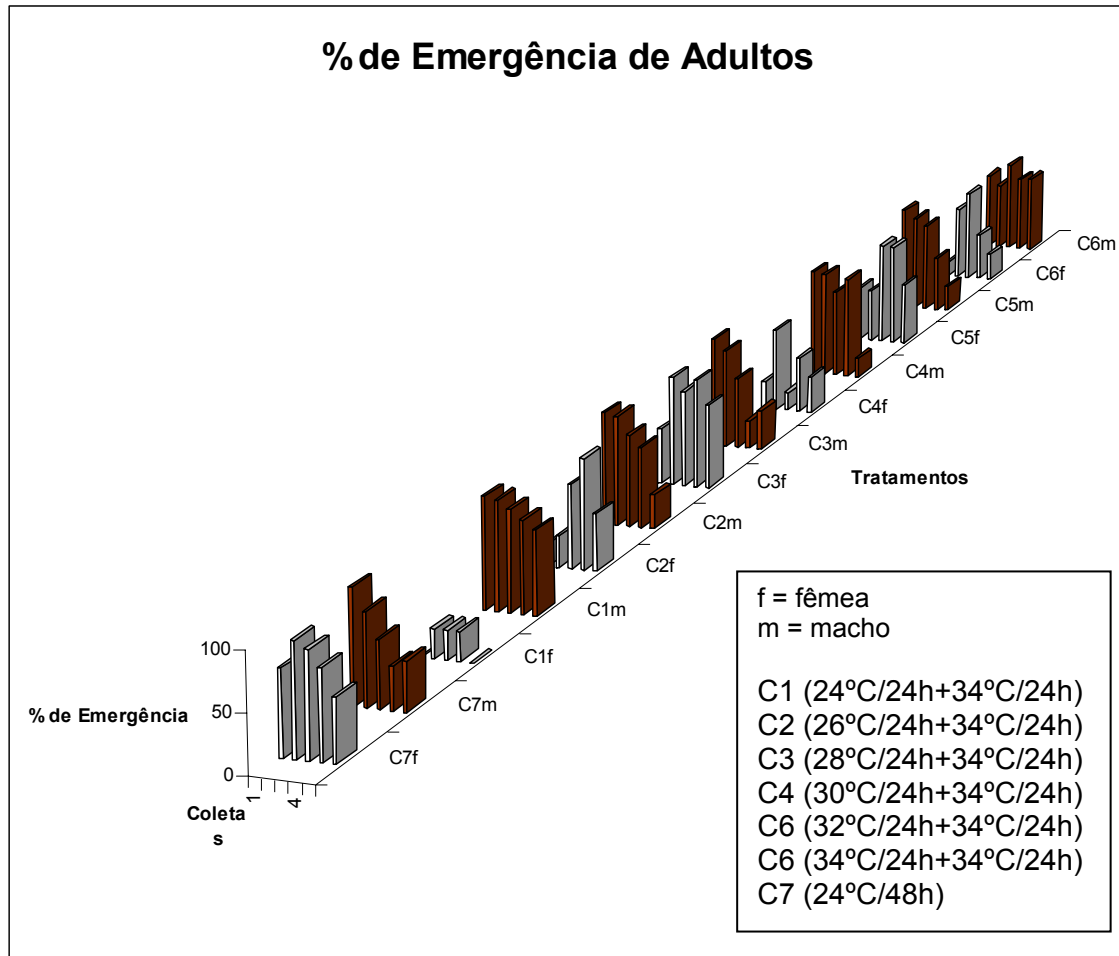


Figura 16. Gráfico ilustrativo comparando as porcentagens de emergência de adultos em função dos tratamentos térmicos para cada seqüência de coleta realizada.

Observa-se no gráfico da Figura 16 que as poucas pupas brancas (fêmeas) que foram recuperadas deram origem a adultos. Verificou-se uma maior queda na emergência nas fêmeas do tratamento C1 (24°C/24h + 34°C/24h), o que era esperado, pois esse tratamento é usado como tratamento térmico para a liberação de somente machos na TIE, estando de acordo com Cáceres, 2002.

Tabela 11 – Razão Sexual.

| Tratamentos (°C/h) | Razão Sexual (média) |
|------------------------|----------------------|
| C1 (24°C/24h+34°C/24h) | 0,99 a |
| C2 (26°C/24h+34°C/24h) | 0,89 a |
| C3 (28°C/24h+34°C/24h) | 0,96 a |
| C4 (30°C/24h+34°C/24h) | 0,93 a |
| C6 (32°C/24h+34°C/24h) | 0,95 a |
| C6 (34°C/24h+34°C/24h) | 0,99 a |
| C7 (24°C/48h) | 0,54 b |

Médias seguidas das mesmas letras, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Quanto à razão sexual todos os tratamentos diferenciaram do tratamento padrão C7 (24°C/48h). Assim, verificou-se que a temperatura elevada de 34°C eliminou quase que totalmente os embriões fêmea motivo pelo qual a razão sexual verificada nestes tratamentos apresentou valores de próximos de 1 que seria a ocorrência se somente machos (Figura 17).

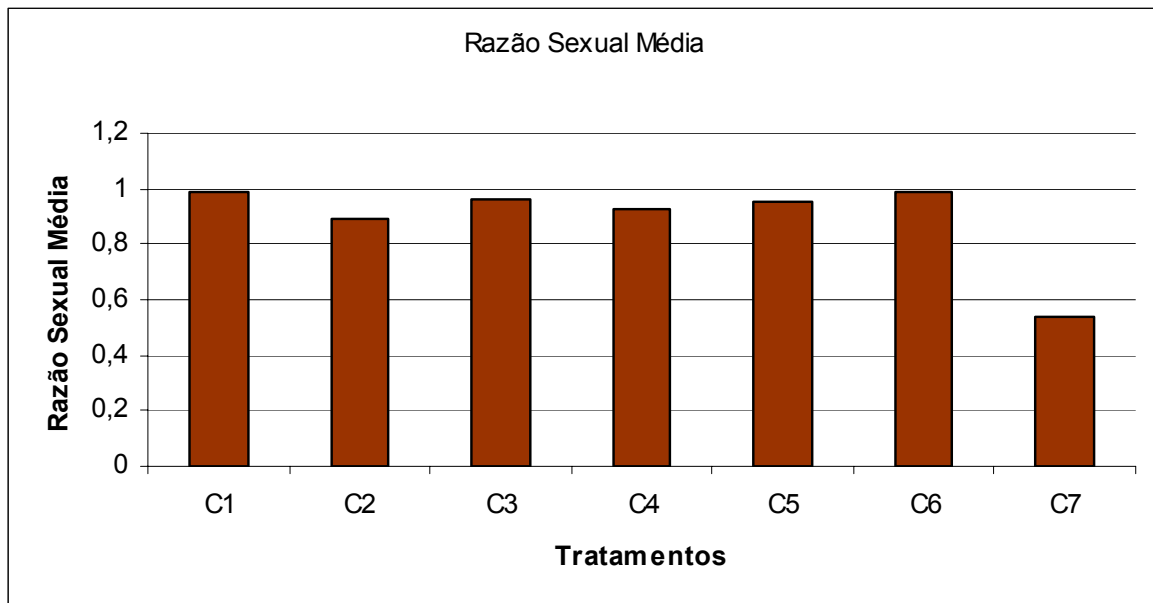


Figura 17. Razão sexual $[m/(m+f)]$ em função da incubação embrionária a diferentes temperaturas (24°C a 34°C) nas primeiras 24 horas, seguidos de tratamento térmico fixo em 34°C por mais 24 horas, totalizando 48 horas de incubação.

5.4 Teste D: Temperaturas diferentes de incubação por período fixo de 24 horas, seguidos de tratamento térmico fixo em 24°C por mais 24 horas, totalizando 48 horas de incubação.

5.4.1 Viabilidade de ovos

Na Tabela 12, constam os resultados de viabilidade dos ovos de *Ceratitis capitata* linhagem *tsl-Viena 8*, do tratamento padrão (D1) e dos demais incubados por 24 horas em diferentes temperaturas, seguidos de tratamento térmico fixo em 24 °C por mais 24 horas, totalizando 48 horas de incubação.

Tabela 12 - Viabilidade de ovos de *Ceratitis capitata tsl- V8*, incubados em diferentes temperaturas.

| Tratamentos (°C/h) | Viabilidade média (%) |
|--------------------|-----------------------|
| D1 (24/24+24/24) | 81,3 |
| D2 (26/24+24/24) | 57,8 |
| D3 (28/24+24/24) | 60,0 |
| D4 (30/24+24/24) | 40,3 |
| D5 (32/24+24/24) | 42,3 |
| D6 (34/24+24/24) | 45,8 |

A análise das viabilidades dos ovos foi realizada pelo teste de Dunnet (α 0,05), uma vez que se buscou saber a diferença dos valores obtidos dos tratamentos em relação ao padrão (Tabela 13).

Tabela 13 - Análise estatística pelo teste de Dunnet (α 0,05) dos valores médios de viabilidade de ovos dos diferentes tratamentos térmicos de incubação em relação ao tratamento padrão.

| Tratamentos | Diferença entre média | Intervalo de confiança 95% | |
|-------------|-----------------------|----------------------------|--------|
| D 3 – D 1 | -21,3 | -44,9 | 2,3 |
| D 2 – D 1 | -23,5 | -47,1 | 0,13 |
| D 6 – D 1 | -35,6 | -59,1 | -12,0* |
| D 5 – D 1 | -39,0 | -62,6 | -15,5* |
| D 4 – D 1 | -41,1 | -64,7 | -17,5* |

* Diferença significativa a 5%. CV = 22,1%

Os tratamentos D4, D5 e D6, temperaturas de incubação de incubação 30°C/24h + 24°C/24h, 32°C + 24°C/24h e 34°C + 24°C/24h, respectivamente, diferenciaram do tratamento padrão D1 (24°C/24h + 24°C/24h). Esses resultados estão de acordo com Franz (2005), pois a partir de 30°C começa o efeito negativo da viabilidade dos embriões fêmea de *tsl*, e esses dados também conferem com Fisher (2000), Cáceres (2002) e Franz (2005) em relação ao efeito maternal em embriões macho na primeira 24 horas da vida embrionária.

5.4.2 Número de pupas

Os valores médios de pupas, as porcentagens de pupas marrons (machos) e brancas (fêmeas) recuperadas em cada tratamento térmico por seqüência de coleta (de primeira a quinta), assim como a análise estatística (Tukey), são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Valores médios (N = 4) do número e porcentagem de pupas marrons (machos) e pupas brancas (fêmeas) dentro de cada coleta.

| Tratamento (°C/hora) | Coletas | Pupas brancas (F) | | Pupas marrons (M) | |
|-------------------------|---------|-------------------|----------|-------------------|----------|
| | | Nº médio | % | Nº médio | % |
| Primeira | | | | | |
| D1 (24/24+24/24) | | 110 a | 14,1 a | 695 a | 85,9 a |
| D2 (26/24+24/24) | | 210 a | 25,6 a | 717 a | 74,4 a |
| D3 (28/24+24/24) | | 77 a | 14,6 a | 267 b | 85,4 a |
| D4 (30/24+24/24) | | 94 a | 13,5 a | 377 a | 86,5 a |
| D5 (32/24+24/24) | | 9 b | 2,1 b | 309 ab | 97,9 a |
| D6 (34/24+24/24) | | 3 b | 1,6 b | 448 a | 98,4 a |
| | | CV= 34,1 | CV=31,1 | CV=46,8 | CV= 22,5 |
| Segunda | | | | | |
| D1 (24/24+24/24) | | 564 a | 80,1 ab | 102 a | 19,9 a |
| D2 (26/24+24/24) | | 621 a | 90,3 a | 76 a | 9,7 a |
| D3 (28/24+24/24) | | 279 ab | 59 abc | 136 a | 41 a |
| D4 (30/24+24/24) | | 234 ab | 55,7 abc | 71 a | 44,3 a |
| D5 (32/24+24/24) | | 46 bc | 24,1 bc | 51a | 75,9 a |
| D6 (34/24+24/24) | | 12 c | 10,4 c | 128 a | 89,6 a |
| | | CV=26,4 | CV=31,4 | CV=21,9 | CV= 39,7 |
| Terceira | | | | | |
| D1 (24/24+24/24) | | 182 a | 89,6 a | 23 a | 10,4 b |
| D2 (26/24+24/24) | | 126 a | 92,1a | 12 a | 7,9 b |
| D3 (28/24+24/24) | | 183 a | 73,5 ab | 110 a | 26,5 ab |
| D4 (30/24+24/24) | | 92 a | 70,6 ab | 49 a | 29,4 ab |
| D5 (32/24+24/24) | | 29 b | 44,9 bc | 22 a | 55,1a |
| D6 (34/24+24/24) | | 9 b | 23,5 c | 33 a | 76,5 a |
| | | CV=21,3 | CV=29,9 | CV=37,1 | CV=23,3 |
| Quarta | | | | | |
| D1 (24/24+24/24) | | 44 a | 90,3 a | 5 a | 9,7 c |
| D2 (26/24+24/24) | | 35 ab | 88,9 a | 5 a | 14,1 bc |
| D3 (28/24+24/24) | | 73 a | 81,1ab | 24 a | 18,9 bc |
| D4 (30/24+24/24) | | 62 a | 84,5 b | 17a | 12,5 c |
| D5 (32/24+24/24) | | 16 ab | 51,9 bc | 13 a | 48,0 ab |
| D6 (34/24+24/24) | | 5 b | 28,4 c | 15 a | 71,6 a |
| | | CV=31,8 | CV=29,2 | CV=53,5 | CV=20,5 |
| Quinta | | | | | |
| D1 (24/24+24/24) | | 12 a | 88,1a | 2 a | 11,9 ab |
| D2 (26/24+24/24) | | 8 a | 91,9 a | 1 a | 8,1 b |
| D3 (28/24+24/24) | | 15 a | 81,4 a | 3 a | 18,6 ab |
| D4 (30/24+24/24) | | 18 a | 88,5 a | 5 a | 11,6 ab |
| D5 (32/24+24/24) | | 6 a | 70,6 ab | 6 a | 29,4 ab |
| D6 (34/24+24/24) | | 2 a | 37,5 b | 2 a | 62,5 a |
| | | CV=14,1 | CV=24,0 | CV=19,8 | CV=54,5 |

CV – valores em porcentagem. Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

Na primeira coleta de pupas brancas (fêmea) recuperadas, houve baixa recuperação de pupas nos tratamentos D5 (32°C/24h+24°C/24h) e D6 (34°C/24h+24°C/24h), devido à sensibilidade de embriões fêmea de *ts/* a altas temperaturas, não houve diferença entre os demais tratamentos em relação ao padrão D1 (24°C/24h+24°C/24h), tanto em número de pupas como em porcentagem. Quanto ao número pupas marrons (macho) recuperadas apenas o tratamento D3 (28°C/24h+24°C/24h) apresentou menor números em relação aos demais. A porcentagem de pupas marrons (macho) em relação às pupas brancas (fêmea) se manteve em alta, com valores superiores a 74%.

Em relação a segunda coleta de pupas brancas (fêmea) recuperadas, os tratamentos D5 (32°C/24h+24°C/24h) e D6 (34°C/24h+24°C/24h) apresentaram menor recuperação de pupas fêmeas em relação ao padrão D1(24°C/24h+24°C/24h. Não houve diferença entre o número de pupas marrons (machos) recuperadas dentro dos tratamentos.

Nessa segunda coleta houve um aumento inesperado de pupas brancas (fêmea) em relação a pupas marrons (macho), pois as pupas brancas começam a aparecer em grande número a partir da terceira coleta (CÁCERES, 2002). Uma possível explicação para este fato é ter ocorrido falta de umidade na dieta e isto acelera o abandono das larvas do meio (Julio Walder - informação pessoal)

Na terceira coleta, a recuperação de pupas brancas (fêmea) foi bem menor nos tratamentos D5 (32°C/24h+24°C/24h) e D6 (34°C/24h+24°C/24h). Com relação a pupas marrons (macho) observou-se que nenhum tratamento afetou a recuperação das mesmas. Aqui também se observa um maior número de pupas brancas (fêmea) recuperadas em relação ao número de pupas marrons (macho),

mas por se tratar de uma terceira coleta de larvas, pode-se considerar normal, este aumento.

Na quarta coleta, observa-se mais uma vez o efeito negativo dos tratamentos de incubação com alta temperatura (D5 e D6) na recuperação de pupas brancas (fêmea). Não houve diferença entre os tratamentos quanto à recuperação de pupas marrons, embora com baixo número, o que é normal para a linhagem *tsl*.

Na quinta coleta, não foi verificada diferença na média de pupas brancas recuperadas entre os tratamentos, mas todos apresentando um baixo número de pupas. Quanto às pupas marrons (macho) recuperadas nenhum tratamento diferenciou do tratamento padrão.

De um modo geral o que se observou neste experimento, foi o efeito das altas temperaturas de 32°C e 34°C nas primeiras 24 horas de incubações dos ovos, reduzindo sobremaneira os embriões fêmea. Fato este muito bem observado quando comparadas às porcentagens de ocorrência de machos a partir da terceira seqüência de coleta de larvas. Normalmente, ocorre um predomínio de fêmeas de acordo com Cáceres, 2002.

Com os valores de número de pupas recuperadas dentro das diferentes coletas de larvas, elaborou o gráfico da Figura 18.

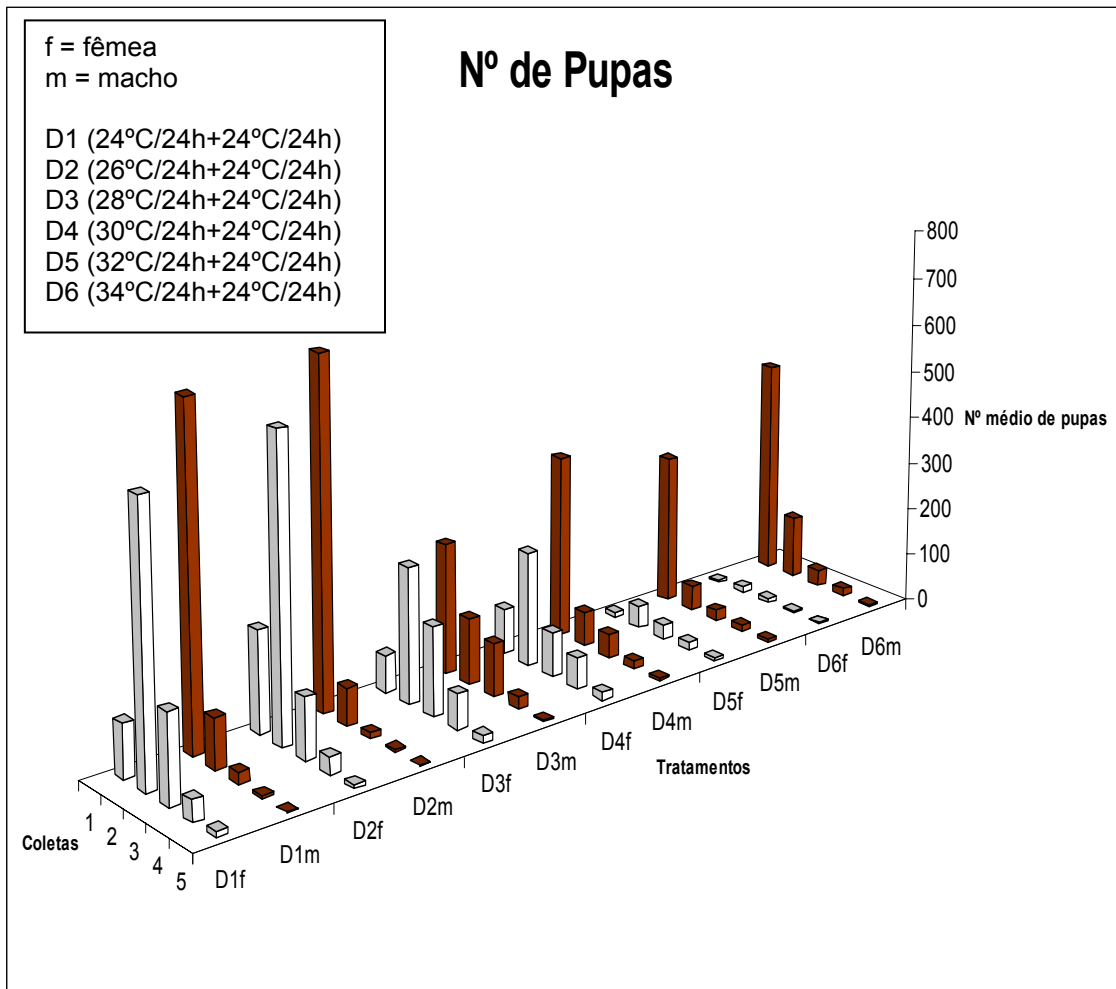


Figura 18. Número de pupas brancas (fêmeas) e pupas marrons (machos) em função das diferentes temperaturas de incubação por 48 horas (tratamentos) e por seqüência de coleta de larvas (5).

Em primeiro plano estão os valores dos tratamentos padrão D1 (24°C/24h + 24°C/24h) e D2 (26°C/24h + 24°C/24h) seguido dos demais. Observa-se que nestes dois primeiros tratamentos com temperaturas mais baixas de incubação (24°C e 26°C) nas primeiras 24 horas, o comportamento da linhagem *tsI-V8* foi normal quanto à recuperação e proporção de pupas foi normal. A partir do aumento da temperatura para 28°C, verificou-se uma diminuição na recuperação de pupas e principalmente uma eliminação das pupas brancas (fêmeas), sensíveis a alta temperatura.

A relação entre pupas brancas (fêmeas) e pupas marrons (machos), com valores em porcentagem, está representada graficamente na Figura 19.

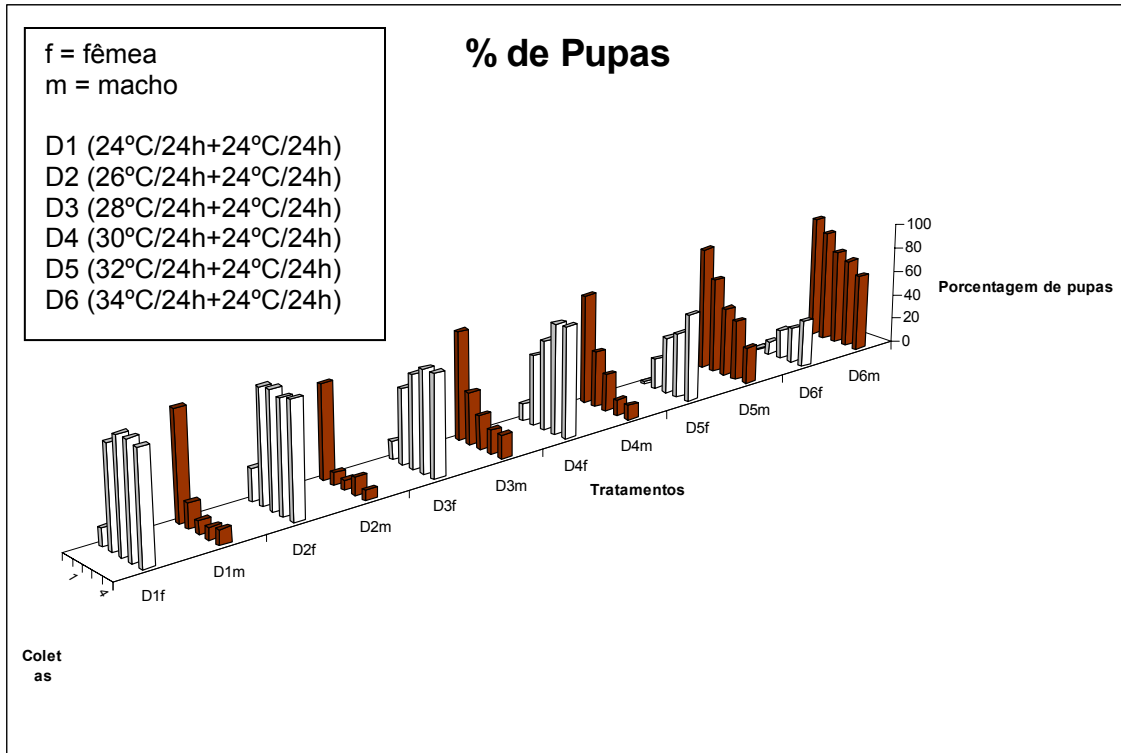


Figura 19. Relação (%) entre pupas brancas (fêmeas) e pupas marrons (machos) recuperadas por tratamento e sua distribuição entre as diferentes coletas de larvas.

Observa-se que nos tratamentos a distribuição porcentual de pupas fêmeas e pupas machos, dentro das distintas coletas, não seguiu o comportamento padrão. Percebe-se uma queda brusca, a partir da segunda coleta, na porcentagem de machos nos tratamentos D1 (24°C/24h + 24°C/24h) e D2 (26°C/24h + 24°C/24h), e pequenas diferenças no tratamento D3 (28°C/24h + 24°C/24h) e D4 (32°C/24h + 24°C/24h), com predominância de fêmeas nesses tratamentos. No tratamento D6 verificou-se uma maior porcentagem de pupas machos no tratamento devido à quase total eliminação dos embriões fêmea na fase de incubação.

5.4.3 Porcentagem de emergência de adultos e Razão Sexual.

As médias da porcentagem de adultos emergidos e a razão sexual estão apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15 - Valores médios de porcentagem de emergência de adultos e razão sexual.

| Tratamento (°C/h) | Emergência (%) | | Razão Sexual (média) |
|----------------------|----------------|----------|-------------------------|
| | Fêmea | Macho | |
| D1 (24/24+24/24) | 64,5 a | 46,7 a | 0,48 b |
| D2 (26/24+24/24) | 65,9 a | 39,6 a | 0,44 b |
| D3 (28/24+24/24) | 85,2 a | 69,5 a | 0,47 b |
| D4 (30/24+24/24) | 78,6 a | 63,4 a | 0,53 b |
| D5 (32/24+24/24) | 66,9 a | 67,8 a | 0,77 a |
| D6 (34/24+24/24) | 77,8 a | 78,5 a | 0,93 a |
| | CV=24,1% | CV=19,3% | CV=12,7% |

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Com relação aos valores da Tabela 15 verifica-se que não houve diferença entre os valores de emergência de adultos nos diferentes tratamentos. Portanto a incubação de embriões a diferentes temperaturas, variando de 24°C a 34°C nas primeiras 24 horas, não afetou a emergência dos adultos no final do ciclo evolutivo (Figura 20).

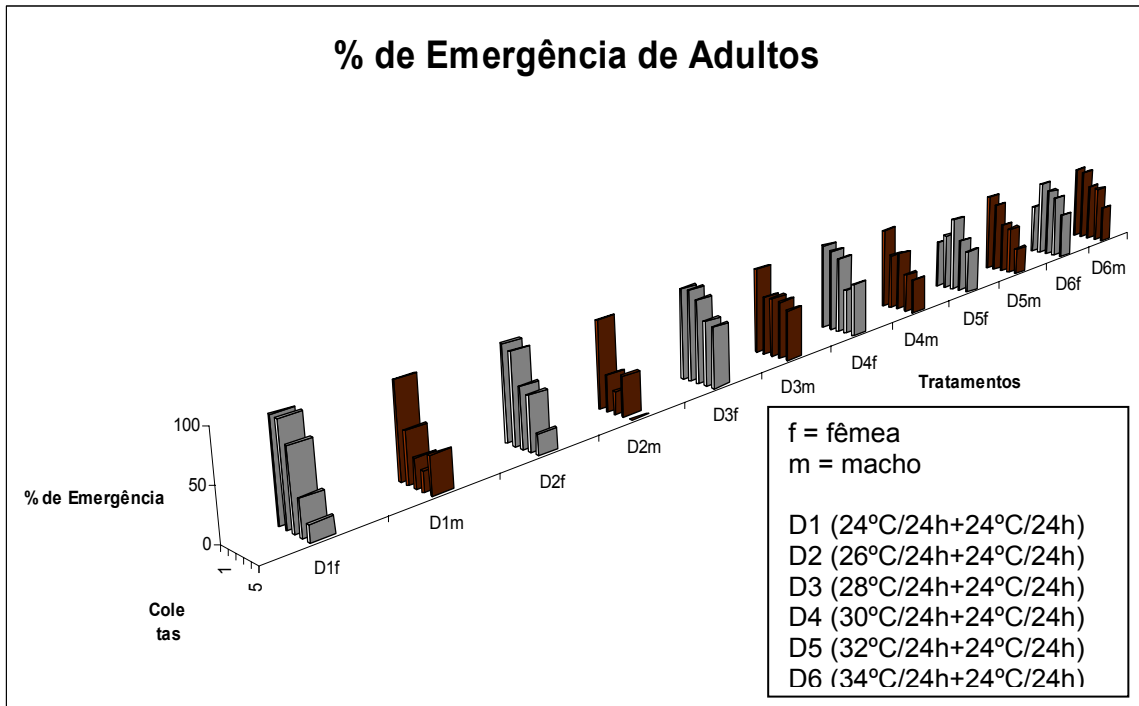


Figura 20. Gráfico ilustrativo comparando as porcentagens de emergência de adultos em função dos tratamentos térmicos para cada seqüência de coleta realizada.

Quanto à razão sexual, apenas os tratamentos D5 (32°C/24h + 24°C/24h) e D6 (34°C/24h + 24°C/24h) diferiram dos demais. Neste caso, como se pode verificar, as temperaturas mais elevadas (32°C e 34°C) eliminaram quase que totalmente os embriões fêmea motivo pelo qual a razão sexual verificada nestes tratamentos apresentou valores de próximos de 1 que seria a ocorrência se somente machos (Figura 21).

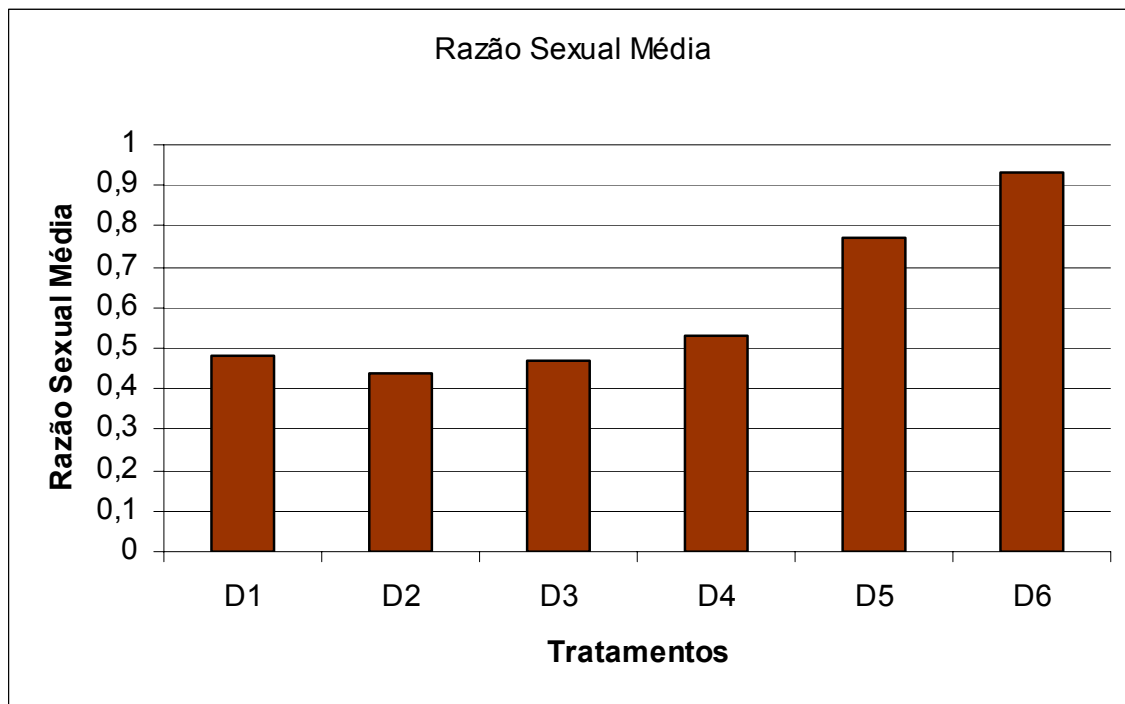


Figura 21. Razão sexual $[m/(m+f)]$ em função da incubação embrionária em diferentes temperaturas (24°C a 34°C) nas primeiras 24 horas, seguidas de mais 24 horas a 24°C.

5.5 Teste E: Temperatura constante a 24°C nas primeiras 24 horas, seguindo-se de aumento de temperatura (24°C a 34°C) por mais 24 horas, totalizando 48 horas de incubação.

5.5.1 Viabilidade de ovos

Na Tabela 16, constam os valores médios obtidos para viabilidade dos ovos de *Ceratitis capitata* linhagem *tsl-V8*, do tratamento padrão e dos demais, quando incubados em temperatura constante a 24°C nas primeiras 24 horas, e variável de 24°C a 34°C por mais 24 horas, totalizando 48 horas de incubação.

Tabela 16 – Viabilidade de ovos de *Ceratitis capitata* *tsl-V8*, incubados em diferentes condições térmicas.

| Tratamentos (°C/h) | Viabilidade média (%) |
|--------------------|-----------------------|
| E1 (24/24+24/24) | 70,0 |
| E2 (24/24+26/24) | 65,0 |
| E3 (24/24+28/24) | 65,2 |
| E4 (24/24+30/24) | 42,7 |
| E5 (24/24+32/24) | 51,0 |
| E6 (24/24+34/24) | 21,9 |

A análise dos valores médios de viabilidade dos ovos foi realizada pelo teste de Dunnet (α 0,05), uma vez que se buscou a diferença dos valores obtidos dos tratamentos em relação ao padrão (E1). O resultado encontra-se na Tabela 17.

Tabela 17 - Análise estatística pelo teste de Dunnet (α 0,05) dos valores médios de viabilidade de ovos dos diferentes tratamentos térmicos de incubação em relação ao tratamento padrão.

| Tratamentos | Diferença entre médias | Intervalo de confiança 95% |
|-------------|------------------------|----------------------------|
| E 2 – E 1 | -4,1 | 17,6 |
| E 3 – E 1 | -4,7 | 17,1 |
| E 5 – E 1 | -18,9 | 2,9 |
| E 4 – E 1 | -27,2 | -5,4* |
| E 6 – E 1 | -47,9 | -26,2* |

* Diferença significativa a 5%. CV = 21,1%

Verifica-se que o resultado obtido no tratamento padrão E1 (24°C/24h+24°C/24h) difere dos tratamentos E4 (24°C/24h+30°C/24h) e E6 período de incubação de (24°C/24h+34°C/24h. Valores estes traduzidos, respectivamente, em 38,9% e 68,5% de perda em viabilidade de ovos em relação ao tratamento padrão (E1). Essa redução da viabilidade se deve a incubação à alta temperatura uma vez que os embriões fêmea da linhagem *ts/* – V8, são sensíveis, resultando em morte embrionária (FISHER, 2000; IAEA/FAO, 2003; FRANZ, 2005).

5.5.2 Número de pupas

Os valores médios de pupas, as porcentagens de pupas marrons (machos) e brancas (fêmeas) recuperadas em cada tratamento térmico por seqüência de coleta (de primeira a quinta), assim como a análise estatística (Tukey) são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Valores médios (N = 4) do número e porcentagem de pupas marrons (machos) e pupas brancas (fêmeas) dentro de cada coleta.

| Tratamento (°C/hora) | Coletas Primeira | Pupas brancas (F) | | Pupas marrons(M) | |
|-------------------------|---------------------|-------------------|------|------------------|--------|
| | | Nº médio | % | Nº médio | % |
| E1 (24/24+24/24) | | 50 | 10,5 | 422 a | 89,6 a |
| E2 (24/24+26/24) | | 224 | 16,4 | 566 a | 83,6 a |
| E3 (24/24+28/24) | | 92 | 16,8 | 325 a | 83,1 a |

Continua

| Conclusão | | | | |
|------------------|-----|------|----------|----------|
| E4 (24/24+30/24) | 338 | 24,9 | 1045 a | 75,1 a |
| E5 (24/24+32/24) | 29 | 5,8 | 453 a | 94,2 a |
| E6 (24/24+34/24) | 1 | 0,9 | 295 a | 99,1 a |
| | SH | SH | CV= 45,4 | CV= 39,9 |

| Segunda | | | | |
|------------------|---------|---------|---------|---------|
| E1 (24/24+24/24) | 248a | 48,2 ab | 293 a | 51,8 ab |
| E2 (24/24+26/24) | 209 a | 52 ab | 236 a | 47,9 ab |
| E3 (24/24+28/24) | 198 a | 53,1 ab | 188 a | 46,8 ab |
| E4 (24/24+30/24) | 342 a | 83,2 a | 54 a | 16,8 b |
| E5 (24/24+32/24) | 89 a | 35,8 ab | 144 a | 64,3 ab |
| E6 (24/24+34/24) | 7 b | 10,5 b | 69 a | 89,5 a |
| | CV=16,2 | CV=31,5 | CV=17,8 | CV=46,7 |

| Terceira | | | | |
|------------------|---------|---------|---------|---------|
| E1 (24/24+24/24) | 188 a | 68,4 a | 97 a | 31,6 b |
| E2 (24/24+26/24) | 144 a | 72,1 a | 63 a | 27,9 b |
| E3 (24/24+28/24) | 124 a | 67,2 a | 67 a | 32,8 b |
| E4 (24/24+30/24) | 155 a | 87,0 a | 17 a | 12,9 b |
| E5 (24/24+32/24) | 68 a | 59,7 a | 43 a | 40,3 b |
| E6 (24/24+34/24) | 8 b | 21,8 b | 22,3 a | 78,3 a |
| | CV=35,3 | CV=22,3 | CV=24,3 | CV=37,9 |

| Quarta | | | | |
|------------------|---------|---------|---------|---------|
| E1 (24/24+24/24) | 146 a | 77,8 a | 35 a | 22,2 b |
| E2 (24/24+26/24) | 89 ab | 75,0 a | 18 a | 24,9 b |
| E3 (24/24+28/24) | 66 ab | 75,9 a | 15 a | 24,0 b |
| E4 (24/24+30/24) | 96 ab | 75,2 a | 11 a | 24,8 b |
| E5 (24/24+32/24) | 41b | 67,6 a | 14 a | 32,4 b |
| E6 (24/24+34/24) | 5 b | 37,7 b | 7 a | 62,3 a |
| | CV=33,6 | CV=19,2 | CV=31,9 | CV=41,3 |

| Quinta | | | | |
|------------------|---------|---------|---------|---------|
| E1 (24/24+24/24) | 35 a | 76,7 a | 6 a | 23,3 a |
| E2 (24/24+26/24) | 28 a | 80,9 a | 5 a | 19,0 a |
| E3 (24/24+28/24) | 20 a | 64,9 a | 4 a | 35,1 a |
| E4 (24/24+30/24) | 26 a | 60,5 a | 5 a | 39,5 a |
| E5 (24/24+32/24) | 15 a | 43,0 a | 6 a | 56,9 a |
| E6 (24/24+34/24) | 2 b | 39,6 a | 3 a | 60,4 a |
| | CV=28,9 | CV=44,3 | CV=31,4 | CV=41,5 |

SH - Sem Homocedasticidade. CV - valores em porcentagem. Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

De acordo com os valores de número e porcentagem, as pupas recuperadas na primeira coleta foram predominantemente marrons (macho), conforme o esperado. Da mesma forma, a porcentagem de pupas marrons (macho) em relação

às brancas manteve-se alta conforme o esperado na primeira coleta (CÁCERES, 2002), apresentando valores superiores a 75% e não foram diferentes entre si.

Na segunda coleta, quando começa o aparecimento de pupas brancas (fêmea), constata-se o efeito da temperatura de 34°C no segundo período de 24 horas da incubação dos ovos/embriões, pois verifica-se uma significativa redução no número de pupas brancas recuperadas, indicando mortalidade embrionária de fêmeas.

Na terceira coleta de pupas brancas (fêmeas) recuperadas apenas o tratamento E6 (24°C/24h+34°C/24h) diferenciou-se do tratamento padrão E1 (24°C/24h+24°C/24h), devido à alta temperatura (34°C). Quanto ao número de pupas marrons (macho) recuperadas não se verificou diferença entre os tratamentos. Pelos valores de porcentagem, verificou-se somente diferença entre pupas marrons, com alta porcentagem no tratamento E6 comprovando a eliminação significativa de embriões fêmea a esta temperatura. O mesmo padrão se repetiu nas coletas seguintes de larvas.

De um modo geral o que se destacou neste teste E foi à sensibilidade dos embriões fêmea a temperatura de 34°C no segundo período de 24 horas do tratamento térmico. Isto confere com o tratamento térmico utilizado para a produção de somente machos pela TIE (FISHER, 2000; IAEA/FAO, 2003; FRANZ, 2005).

Com os valores de número de pupas recuperadas dentro das diferentes coletas de larvas, elaborou o gráfico da Figura 22.

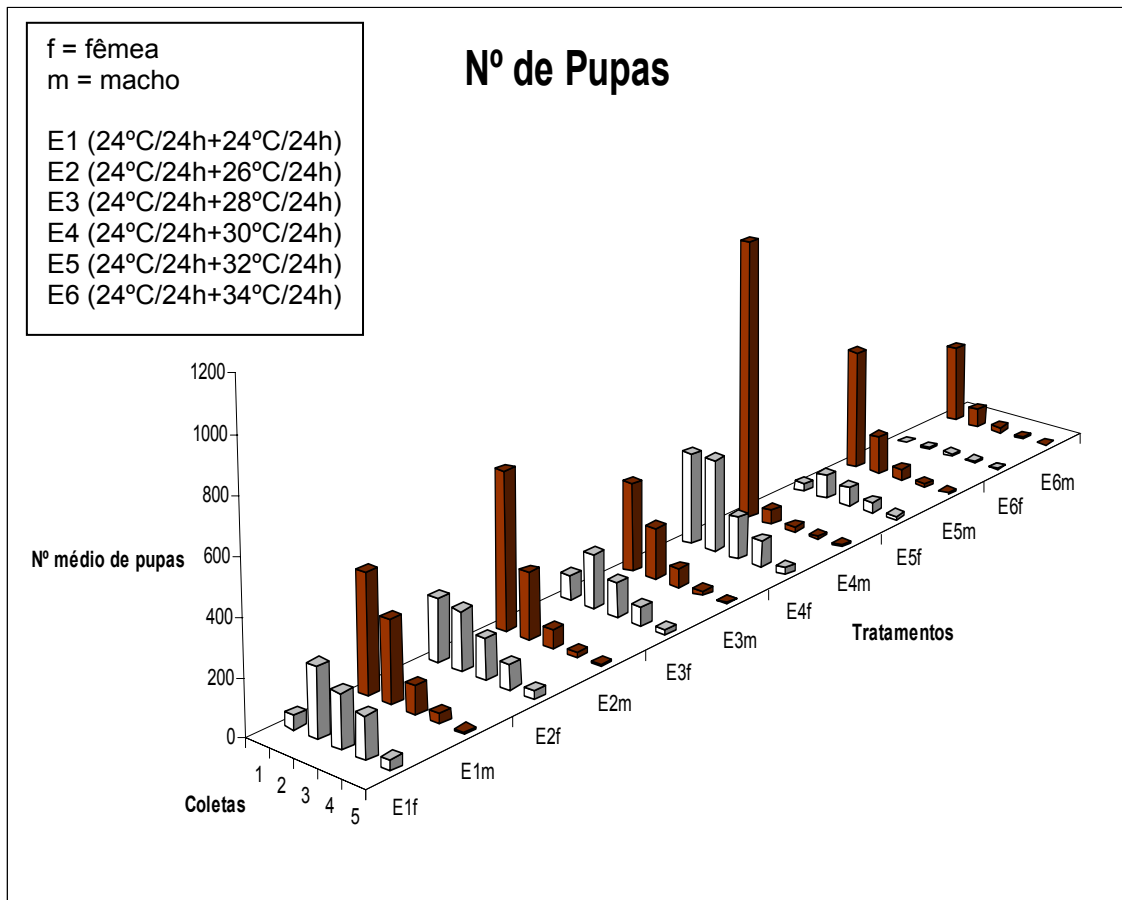


Figura 22. Número de pupas brancas (fêmeas) e pupas marrons (machos) em função da incubação de ovos por um período fixo de 24 horas a 24°C, seguidos de outro período de 24 h a diferentes temperaturas (24°C a 34°C) por seqüência de coleta de larvas (5).

Em primeiro plano estão os valores do tratamento padrão (24°C/48h) seguidos dos outros tratamentos. Pelo gráfico da Figura 22 pode-se verificar o número de pupas marrons (machos) e brancas (fêmeas) recuperado nas cinco coletas de cada tratamento, onde na primeira e segunda coleta, há predominância de pupas machos. Na terceira coleta há um balanço entre pupas macho e fêmea (50% machos e 50% fêmeas), na quarta coleta se observa o aumento de pupas fêmeas e a diminuição de pupas machos e, na quinta coleta, a quase ausência de pupas machos.

Observa-se que um segundo período de incubação por 24 horas a uma temperatura de 32°C eliminou quase que totalmente os embriões de fêmea e à

temperatura de 34°C inviabilizou os embriões fêmea, confirmando o efeito negativo da alta temperatura nos embriões fêmea de *Ceratitis capitata* (*tsl-V8*). Mais uma vez, os resultados do teste E estão de acordo com o tratamento térmico utilizado para a produção de somente macho na SIT (FISHER, 2000; IAEA/FAO, 2003; FRANZ, 2005).

Com os valores da porcentagem entre pupas brancas (fêmeas) e pupas marrons (machos) elaborou o gráfico da Figura 23.

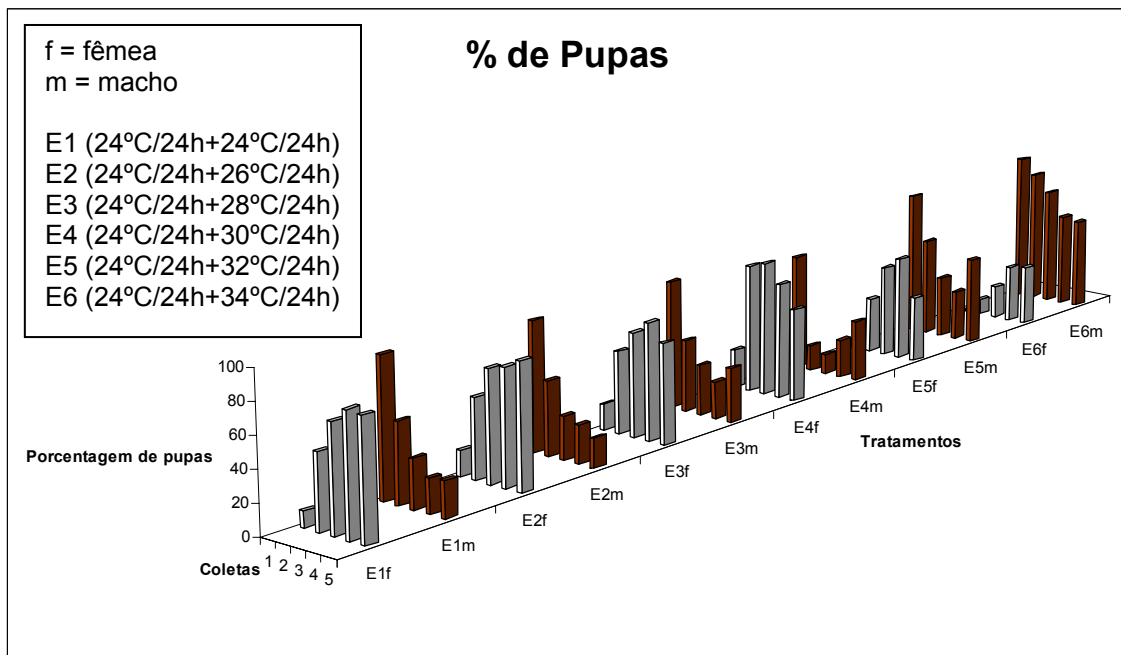


Figura 23. Relação (%) entre pupas brancas (fêmeas) e pupas marrons (machos) recuperadas por tratamento e sua distribuição entre as diferentes coletas de larvas.

Observa-se que de um modo geral a distribuição porcentual de pupas fêmeas e pupas machos, dentro das distintas coletas, seguiu um mesmo padrão com pequenas diferenças no tratamento E4 (24°C/24h+30°C/24h). Mais uma vez, pode-se notar o efeito negativo da alta temperatura (34°C) no tratamento E6

(24°C/24h+34°C/24h), sobre os embriões fêmea, reduzindo a recuperação de pupas brancas.

5.5.3 Porcentagem de emergência de adultos e Razão sexual

Os valores médios da porcentagem de adultos emergidos e da razão sexual são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Valores médios de porcentagem de emergência de adultos e razão sexual.

| Tratamento (°C/h) | % Emergência | | Razão sexual |
|----------------------|--------------|----------|--------------|
| | Fêmea | Macho | (Média) |
| E1(24/24+24/24) | 81,9 a | 71,1 a | 0,56 b |
| E2 (24/24+26/24) | 80,2 a | 58,7 a | 0,56 b |
| E3 (24/24+28/24) | 85,6 a | 68,5 a | 0,55 b |
| E4 (24/24+30/24) | 91,2 a | 46,9 a | 0,53 b |
| E5 (24/24+32/24) | 82,4 a | 76,8 a | 0,72 a |
| E6 (24/24+34/24) | 69,2 a | 67,0 a | 0,88 a |
| | CV=26,4% | CV=36,9% | CV=3,1% |

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Em relação aos valores da Tabela 19 verifica-se que não houve diferença significativa entre a emergência de adultos nos diferentes tratamentos. Portanto a incubação de embriões a diferentes temperaturas, variando de 24°C a 34°C, no segundo período de 24 horas, não afetou a emergência dos adultos no final do ciclo evolutivo (Figura 24).

Quanto à razão sexual, apenas os tratamentos E5 (24°C/24h + 32°C/24h) e E6 (24°C/24h + 34°C/24h) diferiram dos demais, inclusive do padrão. Neste caso, como se pode verificar, as temperaturas mais elevadas (32°C e 34°C) eliminaram quase que totalmente os embriões fêmea motivo pelo qual a razão sexual verificada

nestes tratamentos apresentou valores de próximos de 1 que seria a ocorrência se somente machos (Figura 25).

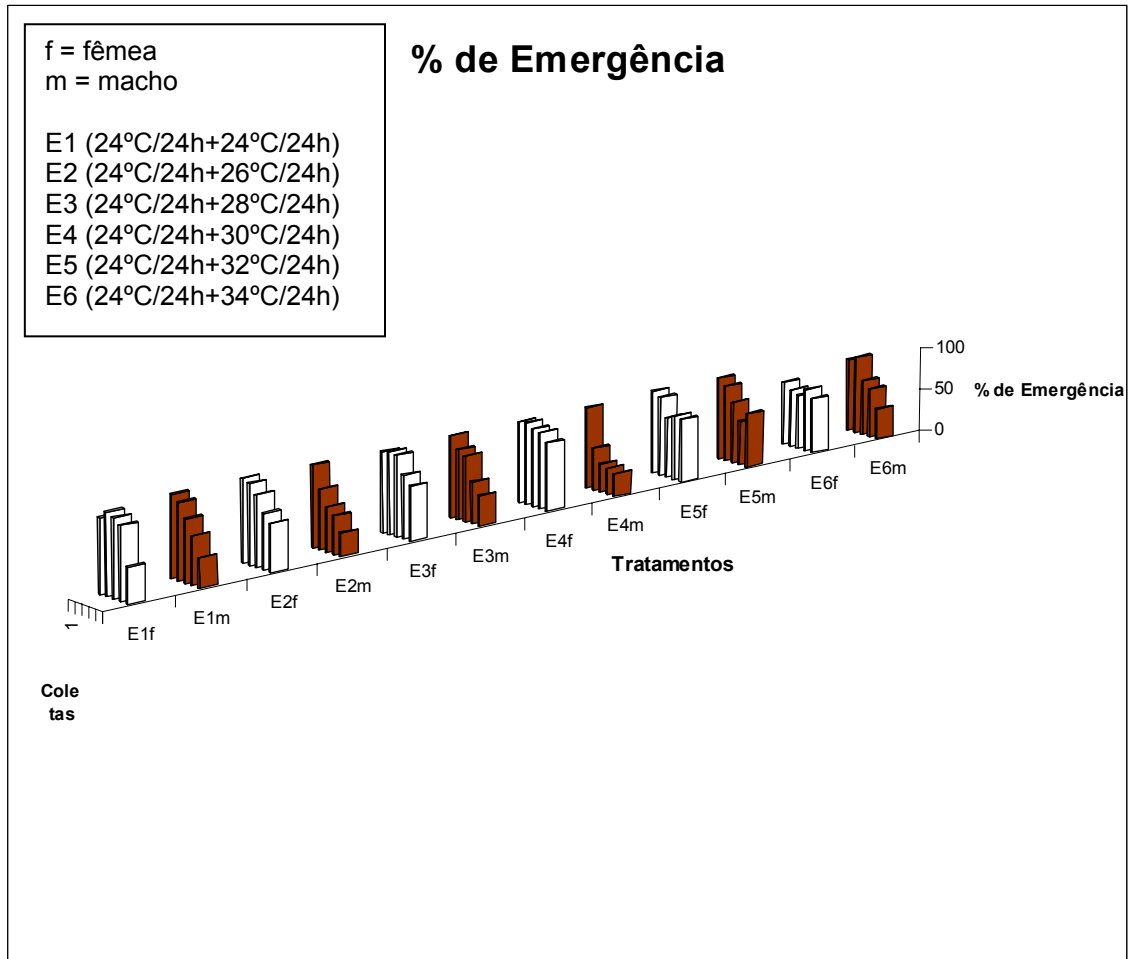


Figura 24. Gráfico ilustrativo comparando as porcentagens de emergência de adultos em função dos tratamentos térmicos para cada seqüência de coleta realizada.

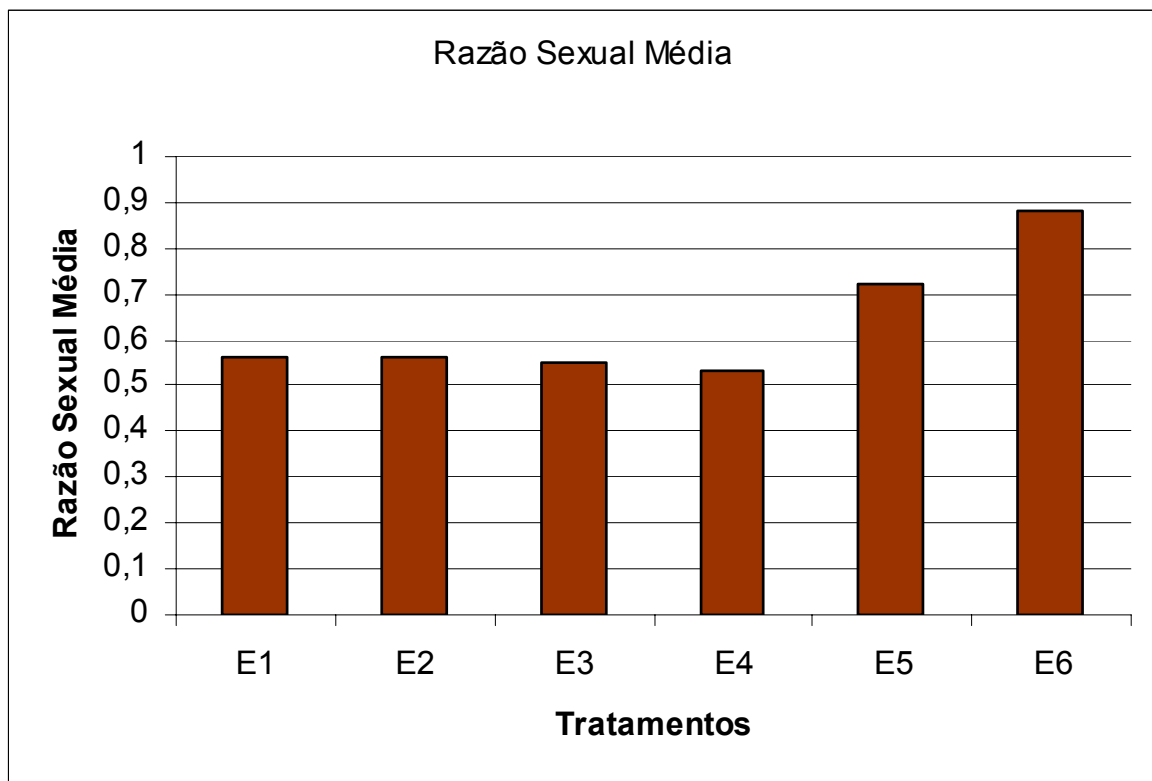


Figura 25. Razão sexual $[m/(m+f)]$ em função da incubação embrionária em temperatura constante a 24°C nas primeiras 24 horas, e variáveis (24°C a 34°C) por mais 24 horas, totalizando 48 horas de incubação.

5.6 Teste F: Mantendo somente as duas temperaturas (24°C e 34°C) usuais e variando o tempo de ação das mesmas sobre os ovos/embriões num total de 48 horas.

5.6.1 Viabilidade de ovos

Na Tabela 20, constam os valores médios de viabilidade dos ovos de *Ceratitis capitata* linhagem *tsl-V8*, do tratamento padrão e dos demais tratamentos incubados no período de 48 horas.

Tabela 20 – Viabilidade de ovos de *Ceratitis capitata* *tsl-Viena 8*, incubados em diferentes temperaturas.

| Tratamentos (°C/h) | Viabilidade média (%) |
|--------------------|-----------------------|
| F1 (24/48) | 64,7 |
| F2 (24/42 + 34/06) | 49,3 |
| F3 (24/36 + 34/12) | 47,2 |
| F4 (24/30 + 34/18) | 48,0 |
| F5 (24/24 + 34/24) | 38,9 |
| F6 (24/18 + 34/30) | 38,6 |
| F7 (24/12 + 34/36) | 47,1 |
| F8 (24/06 + 34/42) | 35,3 |
| F9 (34/48) | 30,7 |

A comparação dos valores obtidos de todos os tratamentos em relação ao tratamento padrão foi realizada pelo teste de Dunnet (α 0,05), e o resultado estatístico consta na Tabela 21.

Tabela 21. Análise estatística pelo teste de Dunnet (α 0,05) dos valores médios de viabilidade de ovos dos diferentes tratamentos térmicos de incubação em relação ao tratamento padrão.

| Tratamentos | Diferença entre médias | Intervalo de confiança 95% | |
|-------------|------------------------|----------------------------|-------|
| F 8 – F 1 | -15,4 | -46,1 | 15,4 |
| F 6 – F 1 | -17,4 | -48,2 | 13,4 |
| F 7 – F 1 | -17,5 | -48,3 | 13,3 |
| F 3 – F 1 | -17,5 | -48,3 | 13,3 |
| F 5 – F 1 | -25,7 | -56,5 | 5,1 |
| F 4 – F 1 | -26,1 | -56,9 | 4,7 |
| F 2 – F 1 | -29,3 | -60,1 | 1,5 |
| F 9 – F 1 | -33,9 | -64,7 | -3,2* |

* Diferença significativa a 5%. CV = 34,6%

Pelos resultados a análise, verifica-se que há evidência estatística de diferença somente entre os tratamentos extremos, isto é, entre o padrão F1 (24°C/48h) e tratamento F9 (34°C/48h), onde sabidamente há morte de embriões fêmea e macho. Todos os demais tratamentos apresentaram valores não diferentes do padrão.

5.6.2 Número de Pupas

Com os valores de número de pupas recuperadas dentro das diferentes coletas de larvas, elaborou o gráfico da Figura 26.

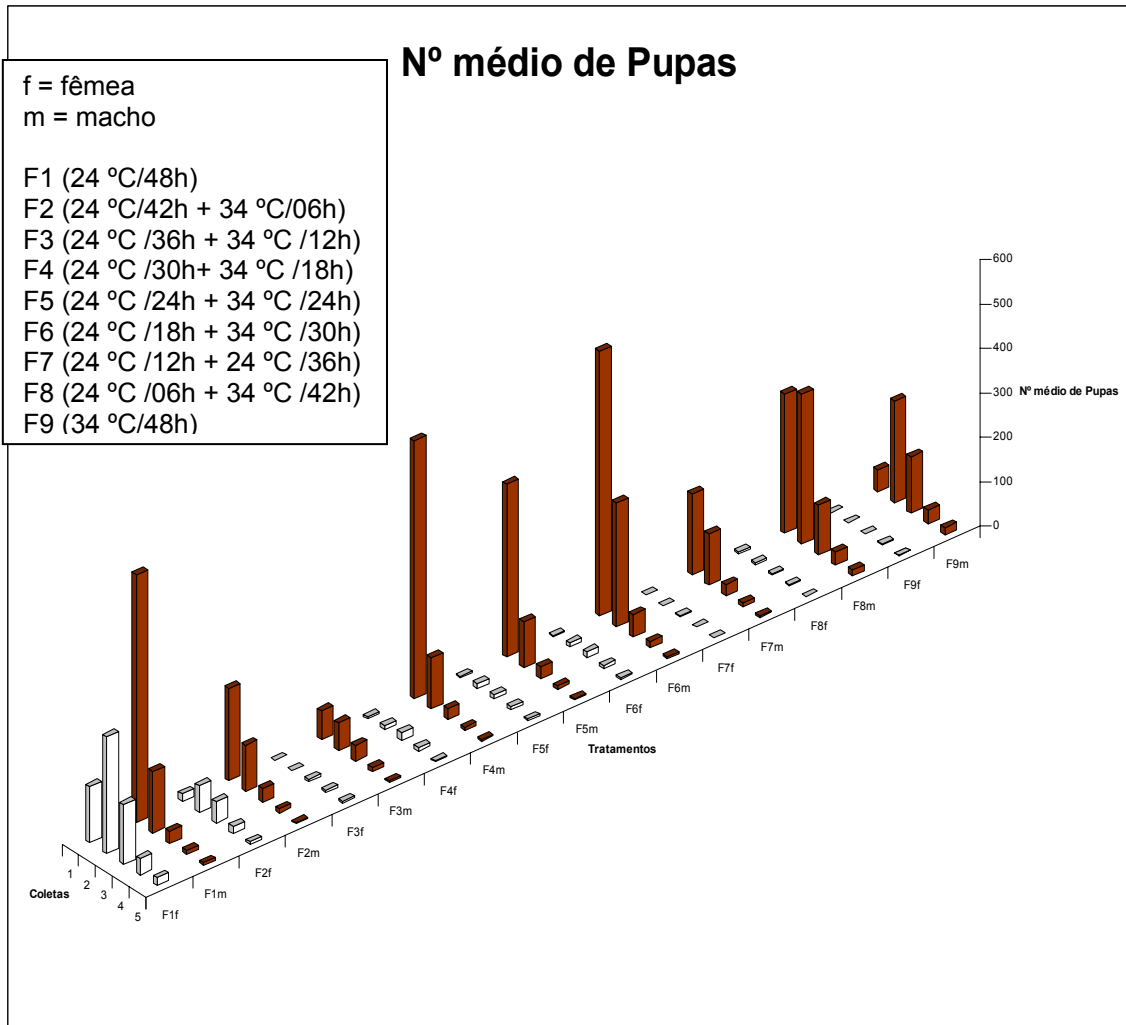


Figura 26. Número de pupas brancas (fêmeas) e pupas marrons (machos) em função da variação do tempo de incubação em duas diferentes temperaturas (24°C e 34°C).

Quanto maior o tempo de incubação à temperatura de 34 °C, menor é o número de pupas brancas (fêmea). Há apenas pupas brancas no tratamento padrão F1 (24°C/48h) e no tratamento F2 (24°C/42h + 34°C/06h). Nos demais tratamentos verificaram-se a quase total inviabilidade das fêmeas. Observou-se maior quantidade de pupas marrons (macho) na primeira, segunda e terceira coletas, devido à ausência de pupas brancas (fêmea) e a partir da quarta coleta observa-se o baixíssimo número de pupas. Não há explicação para a baixa produtividade de pupas marrons nos tratamentos F2 (24°C/42h + 34°C/06h) e F3 (24°C/36h + 34°C/12h).

Com os valores da porcentagem entre pupas brancas (fêmeas) e pupas marrons (machos) elaborou-se o gráfico da Figura 27.

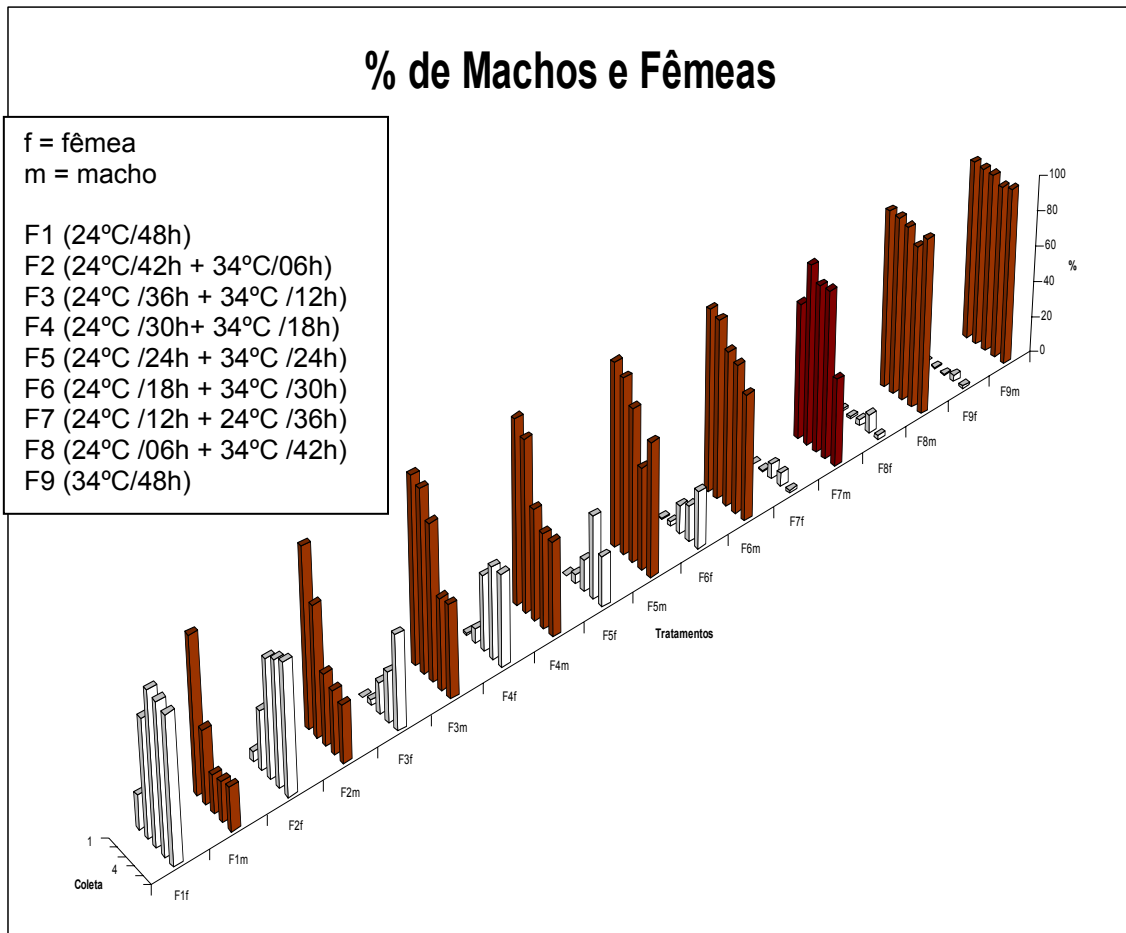


Figura 27. Relação (%) entre pupas brancas (fêmeas) e pupas marrons (machos) recuperadas por tratamento e sua distribuição entre as diferentes coletas de larvas.

Observa-se que a porcentagem de pupas brancas (fêmea) entre os tratamentos foi diminuindo em função do maior o tempo de exposição a 34 °C, chegando a total ausência de fêmeas no tratamento F9 (34°C/48h), comprovando a sensibilidade dos embriões fêmea na fase de incubação, mesmo em tempo inferior a 24 horas conforme o recomendado (CACERES, 2002) para o tratamento térmico num programa de aplicação da Técnica do Inseto Estéril.

5.6.3 Porcentagem de emergência de adultos e Razão sexual

No gráfico da Figura 28 estão representados os valores da porcentagem de emergência de adultos dos diversos tratamentos em função das coletas diárias de larvas.

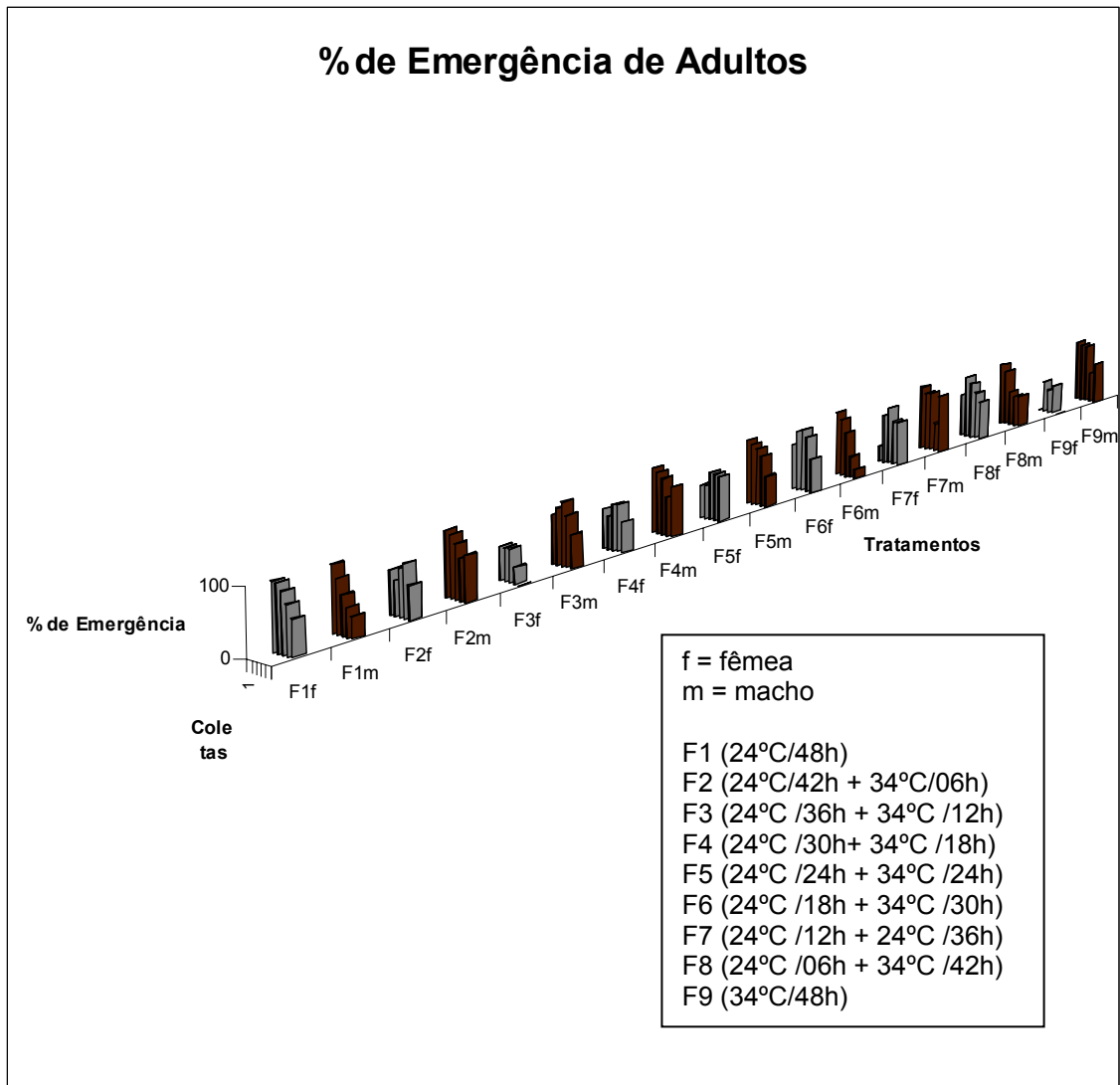


Figura 28. Gráfico ilustrativo comparando as porcentagens de emergência de adultos em função dos tratamentos térmicos para cada seqüência de coleta realizada.

Observa-se no gráfico da Figura 28 que mesmo com grande período de permanência numa alta temperatura de incubação (34°C), as poucas pupas brancas (fêmea) que foram recuperadas foram viáveis, sendo o tratamento F9 (34°C/48h) o mais prejudicial.

Na Tabela 22, estão valores médios da razão sexual, obtidos pela fórmula $[m/(m+f)]$.

Tabela 22. Valores médios da razão sexual, obtidos pela fórmula $[m/(m+f)]$, em função dos diferentes tratamentos de incubação de ovos de *Ceratitidis capitata*, linhagem *tsl-V8*.

| Tratamentos (°C/h) | Razão Sexual (média) |
|--------------------|----------------------|
| F1 (24/48) | 0,56 b |
| F2 (24/42 + 34/06) | 0,71 a |
| F3 (24/36 + 34/12) | 0,91 a |
| F4 (24/30 + 34/18) | 0,95 a |
| F5 (24/24 + 34/24) | 0,94 a |
| F6 (24/18 + 34/30) | 0,96 a |
| F7 (24/12 + 34/36) | 0,99 a |
| F8 (24/06 + 34/42) | 0,98 a |
| F9 (34/48) | 0,99 a |

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. CV = 6,78%

Quanto à razão sexual, todos os tratamentos que continham um período de incubação a 34°C, por menor que fosse (6 horas), prejudicou a emergência de fêmeas. Todos eles apresentaram valores de razão sexual próximos a 1, indicando alta prevalência de machos (Figura 29).

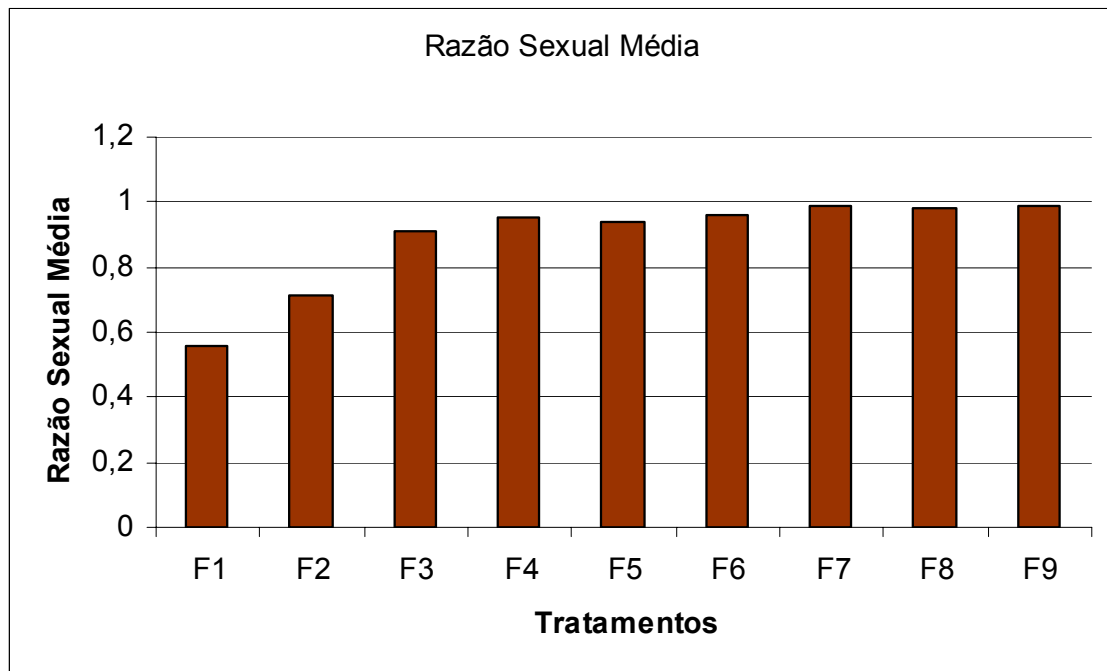


Figura 29. Razão sexual $[m/(m+f)]$ em função da incubação embrionária em diferentes temperaturas (24°C a 34°C) por períodos variáveis de até 48 horas.

6. CONCLUSÕES

Após a realização de diferentes testes de incubação de ovos de *Ceratitis capitata*, linhagem *tsl-Viena 8*, com temperaturas e tempos combinados e variados, pode-se chegar as seguintes conclusões:

- A linhagem *tsl-V8* é extremamente sensível às mudanças de temperatura;
- A temperatura ideal para a incubação dos ovos dessa linhagem está situada numa faixa de 24°C a 26°C pelo período de 24 a 48 horas;
- Temperaturas de incubação acima de 26°C acarretam distúrbios nas fases posteriores do desenvolvimento dos insetos, comprometendo a qualidade e estabilidade dos mesmos, principalmente nas primeiras 24 horas do processo;
- O curto período de 6 horas a uma temperatura de 34°C, já é suficiente para alterar negativamente a proporção de fêmeas de ovos tratados termicamente;
- Deve-se tomar o máximo de cuidado com a elevação da temperatura acima de 26°C durante a manutenção e multiplicação dessa linhagem em condições de laboratório ou massalmente, sob sérios riscos de comprometer a qualidade dos insetos produzidos.

7. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

BOLLER, E. F. Genetic control. In: BURN, A. J.; COAKER, T. H.; JERPSON, P. C. (Ed.). **Integrated pest management**. London: Academic Press, 1987. p. 167-187.

CÁCERES, C. Método genético de separação de machos e fêmeas da mosca do mediterrâneo, *Ceratitidis capitata* (Wiedmann, 1824) (Díptera: Tephritidae), baseado no dimorfismo sexual definido pela cor do pupário. 1990 46 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1990.

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

CÁCERES, C.; WALDER, J.; VICINO, S. Genetic method for separation of males and females of the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitidis capitata*, based on pupal color dimorphism for mass-rearing application. In: ALUJA, M.; LIEDO, P. (Ed.). **Fruit flies: Biology and management**. New York: Springer-Verlag, 1993. p. 81-84.

CÁCERES, C.; FISHER, K.; RENDON, P. Mass rearing of the Medfly temperature sensitive lethal genetic sexing strain in Guatemala. In: TAN, K. H. (Ed.). **Area-wide management of fruit flies and another major insect pests**. Penang: University Sans, 2000. p. 551-558.

CÁCERES, C. et al. Comparison of Mediterranean fruit fly (*Ceratitidis capitata*) (Tephritidae) bisexual and genetic sexing strains: development, evaluation and economics. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FRUIT FLIES OF ECONOMIC IMPORTANCE, 6., 2002, Stellenbosch, South Africa. **Proceedings...** Stellenbosch, 2002.

CARVALHO, R. S.; NASCIMENTO, A. S.; MATRANGOLO, W. J. R. Controle Biológico. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de**

importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2000. cap. 14, p. 113-117.

CHRISTENSON, L. D.; FOOTE, R. H. Biology on fruit flies. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v. 5, p. 171-192, 1960.

FAO. **Manual for product quality control and shipping procedures for sterile mass-reared Tephritidae fruit flies.** Vienna: FAO/IAEA/USDA, 2001. 39 p.

FAO. **Manual for product quality control and shipping procedures for sterile mass-reared Tephritidae fruit flies.** Version 5.0. Vienna: FAO/IAEA/USDA, 2003. 54 p.

FAO. **Provisional additions.** Glossary of phytosanitary terms. Rome: Secretary of the International Plant Protection Convention (IPPC), 2005. 51 p.

FISHER, K. Genetic sexing strains of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): Quality in mass-reared Temperature Sensitive Lethal Strains Treated at high temperatures. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 93, n. 2, p. 394-402, 2000.

FISHER, K.; CÁCERES, C. A filter system for mass reared genetic strains of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). In: TAN, K. H. (Ed.). **Area-wide management of fruit flies and another major insect pests.** Penang: University Sans, 2000. p. 543-550.

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

FRANZ, G. et al. Improved stability of genetic sex separation strains for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. **Genome**, Ottawa, v. 37, p. 72-82, 1994.

FREIRE, R. M. et al. Modelagem matemática aplicada ao controle biológico de *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) por *Diachasmimorpha longicaudata* Ashmed (Hymenoptera: Braconidae) em *Citrus*. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 281-289, 2005.

HENDRICHS, J. Use of the sterile insect technique against key insect pests. **Sustainable Development International**, Berkeley, v. 2, p. 75-79, 2000.

HENDRICHS, J. et al. Six years of successful Medfly program in Mexico and Guatemala. In: CEC/IOB INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FRUIT FLIES OF ECONOMIC IMPORTANCE, 1982. Athens, Greece. **Proceedings...** Athens, 1982. p. 353-365.

HENDRICHS, J. et al. Six years of successful Medfly program in Mexico and Guatemala. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FRUIT FLIES OF ECONOMIC IMPORTANCE, 1983, Balkema Rotterdam. **Proceedings...** Balkema Rotterdam, 1983. p. 353-365.

HENTZE, F.; MATA, R. Mediterranean fruit fly eradication programme in Guatemala. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MODERN INSECT CONTROL: NUCLEAR TECHNIQUES AND BIOTECHNOLOGY, 1987, Vienna. **Proceedings...** Vienna: IAEA, 1988. p. 533-539.

HERNANDES-ORTIZ, V.; ALUJA, M. Listado do genero neotropical *Anastrepha* (Diptera; Tephritidae) con natas sobre su distribución y plantas hospederas. **Folia Entomologica Mexicana**, México, v. 88, p. 89-105, 1993.

KLASSEN, W. Área-wide integrated pest management and the sterile insect technique. In: DYCK, V. A.; HENDRICHS, J.; ROBINSON, A. S. (Ed.). **Sterile insect technique**. Principles and practice in area-wide integrated pest management. Vienna: IAEA, 2005. p. 39-68.

KLASSEN, W.; CURTIS, C. F. History of the sterile insect technique. In: DYCK, V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. (Ed.). **Sterile insect technique**. Principles and practice in area-wide integrated pest management. Vienna: IAEA, 2005. p. 3-36.

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

KRASFUR, E. S. Sterile insect technique for suppressing and eradicating insect population: years and counting. **Journal of Agricultural Entomology**, London, v. 15, p. 303-317, 1998.

MALAVASI, A. Áreas-livres ou de baixa prevalência. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 23, p. 175-181.

MOURA, A. P.; MOURA, D. C. M. Espécies de moscas-das-frutas (Díptera: Tephritidae) associadas à cultura da goiabeira (*Psidium Guajava Linnaeus*) em Fortaleza, Ceará. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 65-71, 2006.

NORRBOM, A. L. **Fruit fly (Díptera: Tephritidae) classification and diversity**. Disponível em: <<http://www.sel.barc.usda.gov/diptera/tephriti/Tephclas.htm>>. Acesso em: 10 mar. 2007.

PATTON, P. Programa contra la mosca del mediterraneo en Mexico. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON STERILE INSECT TECHNIQUE AND THE USE RADIATION IN GENETIC INSECT CONTROL, 1987, Neuberger. **Proceedings....** Vienna: IAEA, 1982. p. 291-307.

ROBINSON, A. S. Genetic basis of the sterile insect technique. In: DYCK, V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. (Ed.). **Sterile insect technique**. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Vienna: IAEA, 2005. p. 95-114.

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

SAS INSTITUTE Inc. The SAS System for Windows. Release 9.1. Cary, NC, USA, 2003.

SILVA, E. B. da. Aspectos da dispersão da mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitidis capitata* (WIED. 1824) (Díptera: Tephritidae), marcada com ^{32}P em citros. 1990. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1990.

TAN, K-H. **Area-wide control of fruit flies and other insect pests**. Penang, Malaysia: Universiti Sains, 2000.

THOMPSON, F. C. Introduction. In: THOMPSON, F.C. (Ed.). **Fruit fly expert identification system and systematic information database**. Leyden: North American Dipterist`s Society, 1998. p. 5-6.

TWEEN, G. MOSCAMED-Guatemala – An evolution of ideas. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FRUIT FLIES OF ECONOMIC IMPORTANCE, 6., Stellenbosch, South Africa, 2002. **Proceedings...** Stellenbosch, 2002.

VARGAS-TERÁN, M. et al. Impact of Screwworm eradication programmes using the sterile insect technique. In: DYCK, V. A.; HENDRICHS, J.; ROBINSON, A. S. (Ed.). **Sterile insect technique**. Principles and practice in area-wide integrated pest management. Vienna: IAEA, 2005. p. 629-650.

WALDER, J. M. M. Genetic or mechanical sexing system for the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* (Wied.). In: **International Atomic Energy Agency**. Genetic sexing of the Mediterranean fruit fly. Vienna: IAEA, 1990, p. 99-105.

WALDER, J.M.M. Produção de moscas-das-frutas e seus inimigos naturais: associação de moscas estéreis e controle biológico. In: PARRA, et al. (Ed.).

Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. Barueri: Manole, 2002, cap. 11, p. 181-188.

WHITE, I. M.; ELSON-HARRIS, M. M. **Fruit flies of economic significance:** Their identifications and bionomics. Wallingford: CAB International, 1992. 601 p.

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