

JOÃO PAULO PEREIRA PAES

CONTROLE DE QUALIDADE DE PARASITOIDES MULTIPLICADOS EM *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

Botucatu

2018

JOÃO PAULO PEREIRA PAES

CONTROLE DE QUALIDADE DE PARASITOIDES MULTIPLICADOS EM *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Proteção de Plantas.

Orientadora: Prof. Dra. Regiane Cristina Oliveira de Freitas Bueno

Coorientador: Prof. Dr. Dirceu Pratissoli

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Paes, João Paulo Pereira, 1988-
P126c Controle de qualidade de parasitoides multiplicados em *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) / João Paulo Pereira Paes. - Botucatu: [s.n.], 2018
76 p.: fots., grafs. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2018
Orientador: Regiane Cristina Oliveira de Freitas Bueno
Coorientador: Dirceu Pratissoli
Inclui bibliografia

1. Broca-da-cana-de-açúcar. 2. Parasitoide larval. 3. Pragas agrícolas - Controle biológico. 4. Reação em cadeia da polimerase. 5. Microsporidio. I. Bueno, Regiane Cristina Oliveira de Freitas. II. Pratissoli, Dirceu. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA TESE: CONTROLE DE QUALIDADE DE PARASITÓIDES MULTIPLICADOS EM *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

AUTOR: JOÃO PAULO PEREIRA PAES

ORIENTADORA: REGIANE CRISTINA OLIVEIRA DE FREITAS BUENO


COORIENTADOR: DIRCEU PRATISSOLI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. REGIANE CRISTINA OLIVEIRA DE FREITAS BUENO
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu


Prof. Dr. PAULO CESAR BOGORNI
Pesquisa / Bug Agentes Biológicos


Profa. Dra. CAROLINA REIGADA MONTOYA
Ecologia e Biologia Evolutiva / UFSCAR - Universidade Federal de São Carlos


Prof. Dr. CARLOS FREDERICO WILCKEN
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas


Prof. Dr. MARCELO DE ALMEIDA SILVA
Depto de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP

Botucatu, 03 de agosto de 2018

*Aos meus pais, Paulo Roberto Paes e Joana
Darc Pereira da Cunha Paes, aos meus tios Lacy e
Marcia pelo esforço, apoio, incentivo, educação,
paciência e amor a mim dedicados durante essa
jornada, dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus Botucatu pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado.

A minha orientadora Prof. Dra. Regiane Cristina Oliveira de Freitas Bueno, pela confiança, atenção e amizade.

Ao professor Prof. Dr. Dirceu Pratissoli, pelas sugestões e amizade durante esta caminhada.

Aos meus pais Paulo Roberto Paes e Joana Darc Pereira da Cunha Paes, pela força e apoio incondicional.

A Laís Fernanda M. Pereira por todo apoio, amor, carinho e compreensão.

A Vanessa Rafaela de Carvalho pela parceria, ensinamentos e conselhos na execução desse trabalho.

Ao José Marcelo Soman por todos os conselhos e amizade durante esta caminhada.

Aos amigos do Agrimip pela amizade, apoio e convivência.

Aos meus amigos e funcionários do Departamento de Proteção de Plantas que estiveram presentes em todos os momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos que possibilitou a execução desse trabalho de pesquisa.

A todos meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

O sucesso na utilização de parasitoides no campo está diretamente relacionado à capacidade de busca do hospedeiro, que pode ser afetada por alterações nas características biológicas, morfológicas, comportamentais ou pela presença de patógenos dos insetos. Por isso, objetivou-se avaliar a qualidade dos parasitoides *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae), *Trichospilus diatraeae* (Cherian & Margabandhu) e *Palmistichus elaeisis* (Delvare & LaSalle) (Hymenoptera: Eulophidae) multiplicados em *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae). Para isso, foram realizadas avaliações das características biológicas, morfológicas, comportamento de voo e identificação molecular de microsporídios em populações de *C. flavipes* obtidas em seis biofábricas do Estado de São Paulo (A, B, C, D, E e F) e de quatro biofábricas do Brasil (São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Alagoas). Nos parasitoides *T. diatraeae* e *P. elaeisis* foi realizada a identificação molecular de microsporídios. As populações (A, B, C, D, E e F) diferiram nos parâmetros avaliados. As populações A, C, E e F apresentaram predominância de parasitoides fêmeas com razão sexual acima de 0,65, enquanto que as populações B e D apresentaram alta frequência de machos, média de 0,34. A população E destacou-se com tempo de sobrevivência mediana de 150 horas, no entanto, as fêmeas das populações B e C tiveram a menor sobrevivência, com tempo médio de 49 e 26 horas, respectivamente. Nos testes de voo houve predominância de parasitoides caminhadores em todas as populações, porém, a população D apresentou 37% de insetos voadores, diferindo das demais. Os parasitoides oriundos de biofábricas instaladas nos Estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Alagoas apresentaram características biológicas e morfológicas consideradas apropriadas para o agente de controle biológico. Houve a predominância de parasitoides caminhadores em todas as populações. Por meio de análise de PCR foi detectado parasitas intracelulares relacionados ao Filo Microsporidia em todas as populações de *C. flavipes* e nos parasitoides de pupa *T. diatraeae* e *P. elaeisis*. Os isolados obtidos dos parasitoides estão estreitamente relacionados com espécies de parasitas do clado *Nosema* sp./*Vairimorpha* sp., com base na análise filogenética foi considerado que os parasitas presentes em *C. flavipes* pertencem ao mesmo grupo taxonômico e possuem uma baixa diversidade genética. Assim, existe a necessidade de investigações detalhadas

do impacto desses parasitas nas populações de parasitoides multiplicados massalmente em *D. saccharalis* e o aprimoramento do controle de qualidade em criações massais do hospedeiro e dos parasitoides.

Palavras-chave: Parasitoide larval. Parasitoide de pupa. Controle biológico. PCR. Microsporídio.

ABSTRACT

The success in the use of parasitoids in the field is directly related to the capacity of search of the host, which can be affected by changes in the biological, morphological, behavioral characteristics or by the presence of insect pathogens. Therefore, the objective was to evaluate the quality of parasitoids *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae), *Trichospilus diatraeae* (Cherian & Margabandhu) and *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) multiplied in *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae). For this, evaluations of the biological parameters, morphological, flight behavior and molecular identification of microsporids in populations of *C. flavipes* obtained from six biofactories of the State of São Paulo (A, B, C, D, E and F) and four biofactories in Brazil (São Paulo, Paraná, Minas Gerais and Alagoas). In the *T. diatraeae* and *P. elaeisis* parasitoids, molecular identification of microsporidium was performed. The populations (A, B, C, D, E and F) differed in the parameters evaluated. Populations A, C, E and F had a predominance of female parasitoids with sex ratio above 0.65, while populations B and D presented a high frequency of males, mean of 0.34. Population E stood out with a median survival time of 150 hours, however, the females of populations B and C had the lowest survival, with an average time of 49 and 26 hours, respectively. In the flight tests, there was a predominance of parasitoid walkers in all populations, however, population D presented 37% of flying insects, differing from the others. The parasitoids from biofactories installed in the States of São Paulo, Paraná, Minas Gerais and Alagoas presented biological and morphological characteristics considered appropriate for the biological control agent. There was a predominance of parasitoid walkers in all populations. PCR analysis revealed intracellular parasites related to Filo Microsporidia in all populations of *C. flavipes* and pupae parasitoides *T. diatraeae* and *P. elaeisis*. The isolates obtained from the parasitoids are closely related to the parasite species of the clade *Nosema* sp./*Vairimorpha* sp., based on the phylogenetic analysis it is suggested that the parasites present in *C. flavipes* belong to the same taxonomic group and have a low genetic diversity. Thus, there is a need for detailed investigations of the impact of these parasites on populations of parasitoids massively multiplied in *D. saccharalis* and the improvement of quality control in host and parasitoid mass creations.

Keywords: Parasitoid larval. Pupal parasitoid. Biological control. PCR. Microsporidium.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	15
CAPÍTULO 1 - QUALIDADE DE <i>Cotesia flavipes</i> CAMERON (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) PRODUZIDA EM BIOFÁBRICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO	19
1.1 INTRODUÇÃO.....	20
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
1.2.1 Obtenção de amostras.....	22
1.2.2 Teste de voo.....	23
1.2.3 Padronização de amostras para identificação molecular.....	23
1.2.4 Extração de DNA genômico.....	24
1.2.5 PCR e Sequenciamento.....	24
1.2.6 Análise estatística.....	25
1.3 RESULTADOS.....	27
1.3.1 Características biológicas, morfológica e sobrevivência de <i>C. flavipes</i>	27
1.3.2 Teste de voo.....	31
1.3.3 PCR e Análise filogenética.....	32
1.4 DISCUSSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	37
CAPÍTULO 2 - QUALIDADE DE <i>Cotesia flavipes</i> CAMERON (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) PRODUZIDA DE FORMA MASSAL NO BRASIL	42
2.1 INTRODUÇÃO.....	43
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.2.1 Obtenção de amostras.....	45
2.2.2 Teste de voo.....	46
2.2.3 Padronização de amostras para identificação molecular.....	46
2.2.4 Extração de DNA genômico.....	47
2.2.5 PCR e Sequenciamento.....	47
2.2.6 Análise estatística.....	48
2.3 RESULTADOS.....	50
2.3.1 Características biológicas, morfológica e sobrevivência de <i>C. flavipes</i>	50
2.3.2 Teste de voo.....	52

2.3.3	PCR e análise filogenética.....	53
2.4	DISCUSSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS.....	57
CAPÍTULO 3 - INFECÇÃO DE PARASITAS DO CLADO		
Nosema/Vairimorpha (MICROSPORIDIA) EM PARASITOIDES		
	PUPAIS.....	61
3.1	INTRODUÇÃO.....	63
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	64
3.2.1	Criação do hospedeiro e parasitoides.....	64
3.2.2	Preparação de esfregaços.....	65
3.2.3	Extração de DNA genômico.....	65
3.2.4	PCR.....	66
3.2.5	Sequenciamento.....	66
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
	REFERÊNCIAS.....	69
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74

INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas do agronegócio brasileiro (KOHLHEPP, 2010), com produção estimada em torno de 647,6 milhões de toneladas de colmos na safra de 2017/2018 (CONAB, 2017). No Brasil, é cultivada em quase todo o país e ocupa posição de liderança na produtividade, tornando-se o maior produtor de açúcar e etanol de cana-de-açúcar do mundo (KOHLHEPP, 2010; CONAB, 2017).

Dentre os fatores limitantes que afetam a produção da cana-de-açúcar, o estresse biótico causado por insetos-pragas é responsável pelos maiores prejuízos observado no setor sucroalcooleiro (DINARDO-MIRANDA, 2008). A broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae), principal praga dessa cultura, é um lepidoptero que pode atacar todas as fases fenológicas, podendo ser extremamente destrutiva, afetando a produtividade e qualidade da matéria-prima (DINARDO-MIRANDA et al., 2013).

Os danos causados pela broca-da-cana são classificados em diretos e indiretos. Os danos diretos são decorrentes da alimentação do inseto, que abre galerias nos colmos e geram perda de biomassa. Os danos indiretos são ocasionados por fungos oportunistas, que desenvolvem podridões e prejudicam o processo de fermentação, afetando a produção de açúcar e álcool (BOTELHO et al., 1999; FONSECA et al., 2015). Calcula-se que a cada 1% de infestação, ocorre diminuição de 0,42% de açúcar, 0,21% de álcool e 1,14% na produção da matéria-prima (CANAESTE, 2013).

Devido às características biológicas desse inseto-praga, o controle nos cultivos é uma tarefa difícil pelo fato das lagartas se desenvolverem em local protegido, ou seja no interior do colmo, o que dificulta o contato e ação dos inseticidas. Fato que impulsionou a implementação do programa de controle biológico de *D. saccharalis* e a introdução do parasitoide de larvas *Cotesia flavipes* Cameron 1891 (Hymenoptera: Braconidae) (BOTELHO et al., 2002).

O manejo populacional da broca-da-cana é considerado um dos maiores programas de controle biológico em nível mundial e o mais eficiente em funcionamento no Brasil (PARRA, 2014). A fim de manter a população desse inseto-praga abaixo do nível de dano econômico, os principais inimigos naturais empregados em liberações inundativas são pertencentes ao grupo dos parasitoides.

Na supressão da população de *D. saccharalis*, destacam-se o parasitoide de ovos *Trichogramma galloi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e o parasitoide de larvas *C. flavipes* (PARRA, 2014). Os parasitoides de pupa *Trichospilus diatraeae* (Cherian & Margabandhu) e *Palmistichus elaeisis* (Delvare & LaSalle) (Hymenoptera: Eulophidae) apresentam potencial (PARON; BERTI-FILHO, 2000; CHICHERA et al., 2012), mas ainda não são encontrados comercialmente.

O parasitoide larval *C. flavipes* é o principal inimigo natural empregado no controle da broca-da-cana, por meio de liberações inundativas em 3,3 milhões de hectares de cana-de-açúcar anualmente (PARRA, 2014). Esse parasitoide pertencente a ordem Hymenoptera e a família Braconidae é um micro himenóptero que foi introduzido no Brasil na década de 1970 (BOTELHO; MACEDO, 2002) e em decorrência do estabelecimento, índices de infestação que eram de 11% na década de 80, reduziram para 2,8% no início do século XXI no Estado de São Paulo (POLANCZYK et al., 2004). No entanto, existe a preocupação quanto à qualidade dos inimigos naturais produzidos de forma massal (HIVIZI et al., 2009).

Nos programas de controle biológico aplicado, a qualidade do inimigo natural é fundamental para o sucesso da supressão da população de pragas em campo. Resultados insatisfatórios da tática de manejo podem comprometer todo o programa desenvolvido ao longo de muitos anos de pesquisa (PREZOTTI et al., 2002). Assim, o controle de qualidade é fundamental na produção de parasitoides, visando identificar problemas de produção, sinais de deterioração da linhagem ao longo das gerações e garantir aos usuários desse método a eficiência do produto adquirido (LEPPLA, 2003).

Os protocolos de controle de qualidade estabelecidos buscam avaliar características biológicas dos inimigos naturais criados de forma massal. A Organização Internacional de Controle Biológico (IOBC) estabelece que devem ser avaliados: a razão sexual, a longevidade, a emergência, a fecundidade, o parasitismo, o tamanho da tibia e o número de indivíduos produzidos por hospedeiro como características que garantam a qualidade e, conseqüentemente, o sucesso do inimigo natural na supressão da população dos insetos-praga (van LENTEREN, 2012). Aliado a essas características, avaliações de comportamento de voo, desempenho em campo e ocorrência de patógenos tem alertado para melhoria dos protocolos de controle de qualidade (PREZOTTI et al., 2002; BJØRNSON; SCHÜTTE, 2003; van LENTEREN, 2012).

Patógenos pertencentes a classe dos microsporídios (CORRADI; KEELING, 2009), podem comprometer o desempenho de inimigos naturais empregados em programas de controle biológico, causando aumento do tempo necessário para completar o desenvolvimento, redução da longevidade dos adultos, diminuição da taxa de emergência e da fecundidade, modificações comportamentais na busca do hospedeiro (SIMÕES et al., 2012; KERMANI et al., 2014), tamanho anormal do abdômen dos adultos (SIMÕES et al., 2015) e estresse energético (KURZE et al., 2016).

Esses organismos são parasitas intracelulares obrigatórios e necessitam de uma célula eucariota para completar o ciclo de vida (DEAN et al., 2016). O ciclo de um microsporídio tem início com a germinação dos esporos no lúmen do intestino médio dos insetos, injetando o aparelho infeccioso, composto de um tubo polar que penetra na membrana celular e permite que o esporoplasma seja transferido ao hospedeiro (BIGLIARDI; SACCHI, 2001). Na célula hospedeira, o parasita cresce e se multiplica dentro do citoplasma, utilizando organelas e produtos metabólitos como substrato para completar o ciclo. Após a multiplicação, novos esporos são formados e liberados por meio da lise celular para infectar outros tecidos ou serem liberados no ambiente (GISDER et al., 2011; DEAN et al., 2016).

A ocorrência de microsporídeos em criações massais de *D. saccharalis* é um dos principais problemas enfrentados pelas biofábricas no Brasil (SIMÕES et al., 2015). A associação desse patógeno com hospedeiro pode desencadear uma variedade de sintomas. Populações de *D. saccharalis* infestadas apresentam coloração esbranquiçada, alterações na duração e viabilidade dos estágios de larva e pupa, longevidade de adultos, peso de pupa e tabela de vida de fertilidade que podem prejudicar a eficiência do processo de multiplicação massal (SIMÕES et al., 2015). *C. flavipes* oriundas de lagartas infectadas também podem apresentar alterações na duração e viabilidade dos estágios de larva e pupa, na longevidade de adultos e no comportamento de busca do hospedeiro (SIMÕES et al., 2012). Mesmo diante dos impactos diretos causados pelo patógeno nos hospedeiros, não foram realizados estudos de prevalência de microsporídeos em populações de parasitoides empregados em liberações inundativas.

Dessa forma, o objetivo geral do trabalho foi avaliar características biológicas e morfológicas de populações de *C. flavipes* oriundas de diferentes biofábricas do Brasil, avaliar a capacidade de voo dos parasitoides e estabelecer um protocolo de

identificação molecular de microsporídios, visando aferir a qualidade dos inimigos naturais criados em *D. saccharalis*.

CAPÍTULO 1

Qualidade de *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) produzida em biofábricas do Estado de São Paulo

João Paulo Pereira Paes^{1*}, Vanessa Rafaela de Carvalho², Bruno Rossitto de Marchi³, José Romário de Carvalho⁴, Dirceu Pratisoli⁴, Regiane Cristina Oliveira de Freitas Bueno¹

¹Grupo de Pesquisas em Manejo Integrado de Pragas na Agricultura, Faculdade de Ciências Agrônômicas - Universidade Estadual Paulista (UNESP), R. José Barbosa de Barros, 1780, Fazenda Lageado, 18610-307, Botucatu, SP, Brasil.

²Laboratório de Genômica Funcional & Microbiologia de Vetores, Instituto de Biotecnologia - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Alameda das Tecomarias, S/N, Capão Bonito, 18607-440, Botucatu, SP, Brasil.

³Laboratório de Virologia Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônômicas - Universidade Estadual Paulista (UNESP), R. José Barbosa de Barros, 1780, Fazenda Lageado, 18610-307, Botucatu, SP, Brasil.

⁴Laboratório de Entomologia (NUDEMAFI), Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário s / n, CP 16, 29500-000, Alegre, ES, Brasil.

***Autor correspondente:** João Paulo P. Paes. E-mail: joaopauloppaes@hotmail.com

Resumo

A qualidade dos inimigos naturais empregados em liberações inundativas pode influenciar a eficácia da tática de manejo em campo. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar características biológicas, morfológicas, comportamento de voo e presença de patógenos em seis populações de *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) produzidas no Estado de São Paulo para o controle de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae). As populações (A, B, C, D, E e F) diferiram principalmente no número de insetos por massa de pupas, na razão sexual e na sobrevivência de fêmeas. As populações B e D apresentaram baixa frequência de fêmeas, média de 0,34. A população E destacou-se com tempo de sobrevivência mediana de 150 horas. Houve predominância de parasitoides caminhadores em todas

as populações, no entanto, a população D apresentou 37% de insetos voadores, diferindo das demais. Foi detectado a presença de microsporídeos relacionados ao clado *Nosema* sp. / *Vairimorpha* sp. em todas as amostras. A presença de parasitas intracelulares, aliado as variações biológicas e comportamentais observadas nas populações podem estar influenciando a qualidade das criações massais das biofábricas estudadas.

Palavras-chave: Controle biológico. Parasitoide larval. Microsporidia. PCR.

Abstract

The quality of the natural enemies employed in flood relief can influence the efficiency of the field management tactic. The objective of this study was to evaluate the biological, morphological, flight behavior and pathogen parameters of six populations of *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) produced in the State of São Paulo for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). The populations (A, B, C, D, E and F) differed mainly in the number of insects per pupal mass, in the sex ratio and in the survival of females. Populations B and D showed low frequency of females, mean of 0.34. The E population was detached with a median survival time of 150 hours. There was a predominance of walkers parasitoids in all populations, however, population D presented 37% of flying insects, differing from the others. The presence of microspores related to the *Nosema* sp./ *Vairimorpha* sp. in all samples. The presence of intracellular parasites, combined with the biological and behavioral variations observed in the populations, interfere with the quality of mass creations.

Keywords: Biological control. Larval parasite. Microsporidia. PCR.

1.1 INTRODUÇÃO

A broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae), é uma das principais pragas da cana-de-açúcar (BOTELHO, 1992; DINARDO-MIRANDA, 2008) e está amplamente distribuída no Hemisfério Ocidental, nas Américas do Norte, Central e do Sul (JOYCE et al., 2014). As larvas desse inseto-praga se alimentam do colmo, abrindo galerias que ocasionam perda de biomassa e

permitem a entrada de microrganismo, que reduzem a produção de açúcar e álcool (BOTELHO et al., 1999; FONSECA et al., 2015).

O hábito alimentar do inseto durante a fase jovem torna o controle populacional da broca-da-cana uma tarefa difícil, pelo fato das lagartas se desenvolverem em local protegido o que dificulta o contato dos inseticidas com o alvo, reduzindo a eficácia das moléculas (BOTELHO, 1992). Tais dificuldades impulsionaram, no Brasil, a implementação do programa de controle biológico da broca-da-cana e a introdução do parasitoide larval *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae), importado de Trinidad e Tobago em 1974 (MENDONÇA; RISCO; COSTA, 1977).

Nos primeiros 20 anos do programa de controle biológico da broca-da-cana, o parasitoide larval foi responsável por reduzir os índices de infestação de 11 para 2,8% (POLANCZYK et al., 2004). Atualmente, o emprego de *C. flavipes* para suprimir a população de *D. saccharalis* representa o maior programa de controle biológico brasileiro, empregando o parasitoide em liberações inundativas em 3,3 milhões de hectares por ano (PARRA, 2014).

A utilização de agentes entomófagos para o manejo da população de insetos-pragas em campo está diretamente relacionada com a qualidade do inimigo natural, que deve ter capacidade de localizar e parasitar o hospedeiro após a liberação. Um dos maiores obstáculos no controle de qualidade de parasitoides, se refere ao processo de multiplicação das biofábricas que pode gerar queda da variabilidade, em virtude da deriva genética e do cruzamento entre os indivíduos (LEPPLA, 2003; van LENTEREN, 2009). Outro fator relevante que pode afetar o desempenho dos inimigos naturais é a ocorrência de patógenos (BJØRNSON; SCHÜTTE, 2003; SIMÕES et al., 2012).

A presença de microsporídios, parasitas intracelulares, em população de inimigos naturais pode ser tornar um problema para os programas de controle biológico (SIMÕES et al., 2012). Geralmente, populações de agentes entomófagos infectadas por esse patógeno apresentam alterações nas características biológicas, como aumento na duração do período larval e pupal, redução da longevidade dos adultos e número de descendentes. A infecção pode ainda alterar o comportamento de busca do hospedeiro (SIMÕES et al., 2012; KERMANI et al., 2014).

Contudo, estudos que avaliam a presença de patógenos em populações de *C. flavipes* são escassos na literatura. Desta forma, a hipótese deste trabalho é que a presença de microsporídios influencia a qualidade das populações de *C. flavipes*

multiplicadas massalmente. Assim, o objetivo foi avaliar as características biológicas e morfológica de seis populações de *C. flavipes* oriundas de diferentes regiões do Estado de São Paulo, bem como avaliar o comportamento de voo dos insetos e estabelecer um protocolo de identificação molecular de microsporídios, visando aferir a qualidade dos inimigos naturais empregados.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida nos laboratórios do Grupo de Pesquisa em Manejo Integrado de pragas na agricultura “AGRIMIP” na Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), em Botucatu, São Paulo, Brasil.

1.2.1 Obtenção de amostras

Os adultos de *C. flavipes* foram obtidos de diferentes empresas (biofábricas A, B, C, D, E e F) distribuídas em regiões do Estado de São Paulo. As amostras foram compostas de 10 copos de liberação comercial, contendo aproximadamente 30 massas de pupas do inimigo natural. As massas foram levadas ao laboratório e mantidas sob condições de temperatura de 25 ± 2 °C, umidade de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas para evitar possíveis estresses e modificação das características biológicas das populações.

As massas de pupas dos parasitoides das diferentes populações foram classificadas em pequenas (1,3 a 2,5 cm de comprimento), médias (2,5 a 3,5 cm de comprimento) e grandes (3,5 a 4 cm de comprimento) (VACARI et al., 2012a). As massas médias foram divididas em dois grupos:

No primeiro grupo, as massas foram individualizadas em tubos de vidro de fundo chato (2 cm diâmetro x 8 cm altura), contendo uma gotícula de mel para alimentação e vedados com filme plástico de PVC. Após a morte dos adultos, foram avaliados o número de indivíduo por massa, a razão sexual e a viabilidade das massas. Separou-se aleatoriamente 20 fêmeas de cada população e com o auxílio de uma ocular micrométrica acoplada ao estereomicroscópio e foi realizado a medição do comprimento da tíbia posterior.

No segundo grupo, as massas foram acondicionadas em potes plásticos (15 cm de diâmetro x 20 cm de altura), contendo mel para alimentação e fechados com tecido

voile. Quando verificado a emergência dos primeiros indivíduos, estes foram descartados a fim de padronizar a idade, utilizando adultos de até no máximo 3 horas de vida nas avaliações de sobrevivência. Selecionou-se aleatoriamente 20 machos e 20 fêmeas de cada população, individualizando-os em tubos Duran (1 cm de diâmetro x 5 cm altura), contendo uma gotícula de mel e fechados com tecido *voile*, realizando as avaliações duas vezes ao dia até a morte de todos indivíduos.

1.2.2 Teste de voo

Nos ensaios de voo foi usada a gaiola de PVC, modelo IOBC, adaptado (PREZOTTI et al., 2002). A parte interna do tubo foi revestida com cartolina preta e o fundo fechado com disco de isopor revestido por plástico preto. Como mecanismo separador dos insetos caminhadores foi fixado um anel contendo cola entomológica a 3,5 cm da borda inferior do tubo. A parte superior da gaiola foi fechada com placa de Petri (15 cm de diâmetro) impregnada com cola para coleta dos insetos voadores.

Massas de pupas de *C. flavipes* prestes a emergirem foram individualizadas em tubo de vidro de fundo chato (2 cm diâmetro x 8 cm de altura), contendo uma gotícula de mel para alimentação e fechados com tecido *voile*. Em seguida, esses tubos foram fixados no centro das gaiolas de voo e foram colocados em bancada com iluminação constante por 72 horas. Posteriormente, foram avaliados a porcentagem de parasitoides voadores (presos na placa de Petri), caminhadores (presos do anel) e no fundo (deformados).

1.2.3 Padronização de amostras para identificação molecular

As lagartas de terceiro ínstar sintomáticas de *D. saccharalis* foram utilizadas na confecção de esfregaços para identificação preliminar de esporos de microsporídeos. Os insetos foram mortos por congelamento, em seguida, foi realizado um corte transversal com bisturi no abdômen dos mesmos. O conteúdo extravasado foi colocado sobre uma lâmina de vidro, adicionando uma gota de solução salina (0,85% NaCl) para maceração sobre a lâmina microscópica, sendo o excesso do conteúdo corporal dos insetos retirado com uma pinça. As lâminas foram fixadas em metanol por dez minutos e secas ao ar. A coloração dos esporos foi realizada com Giemsa (BJØRNSON, 2008) diluída a 50% durante 30 minutos. As lâminas foram lavadas em

água corrente para retirar o excesso do corante e secas ao ar. Os esfregaços foram visualizados em microscópio de contraste de fase com aumento de 1000x (Zeiss Primo Star) (ALVES et al., 1998).

1.2.4 Extração de DNA genômico

Os exemplares sintomáticos de *D. saccharalis* e as amostras de *C. flavipes* foram armazenados em congelador a -20°C. Após o descongelamento foi selecionada aleatoriamente uma lagarta para extração do DNA genômico e padronização da reação de polimerase em cadeia (PCR). A lagarta foi lavada com solução salina (0,85% NaCl), desinfestada com álcool 70 °GL e macerada, posteriormente, removeu-se as partes maiores do corpo do inseto. Foi adicionado ao conteúdo corporal 80 µL de solução Chelex a 10% e 8 µL de proteinase K a 20 mg/mL em microtubo. Em seguida, a amostra foi colocada em bloco térmico a 95 °C por 20 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para extração dos parasitoides, entretanto, foi empregado um “pool” de 50 indivíduos macerados. O protocolo para extração de DNA foi realizado (COOMBS; GOUGH; PRIMROSE, 1999) utilizando resina Chelex 100®. Os sobrenadantes foram coletados para a realização da PCR.

1.2.5 PCR e Sequenciamento

A partir do DNA total extraído, foi realizado um PCR utilizando os iniciadores (primers) universais para microsporídeos (F) CACCAGGTTGATTCTGCC e (R) TTATGATCCTGCTAATGGTTC, tamanho de 222 pb (VOSSBRINCK et al., 1993) que amplificam a região small subunit (SSU) do RNA ribossômico.

As reações foram preparadas contendo 12,5 µL de Gotaq Hot Start (Promega), 5 U/µL Taq, 100 µM de cada dNTP e 25 mM MgCl₂, 5 µL de Nuclease Free Water (Promega), 1,25 µL de cada primer [10 mM] e 5 µL de DNA genômico, totalizando 25 µL por reação. A PCR foi realizada em termociclador INFINIGEN (modelo TC-96CG) com desnaturação inicial por 4 minutos a 95 °C, seguida por 45 ciclos com desnaturação a 95 °C por 1 minuto, seguida pela fase de anelamento a 48 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto e com uma fase final de polimento por 4 minutos a 72 °C (TAY; O'MAHONY; PAXTON, 2005).

Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando marcador de 100 pb (Norgen) e transiluminador de luz UV (Major Science).

A purificação do produto da PCR foi feita seguindo as recomendações do Norgen PCR Purification Kit (Qiagen, Cat#14400). O sequenciamento foi realizado por sequenciador automático de DNA Sanger (Modelo: ABI 3500 - Applied Biosystems) no Instituto de Biotecnologia (IBTEC - UNESP).

1.2.6 Análise estatística

1.2.6.1 Características biológicas, morfológica e sobrevivência de *C. flavipes*

As características biológicas (número de insetos/massa de pupas, emergência e razão sexual) e morfológica (comprimento da tibia de insetos fêmea) foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$) e os resíduos avaliados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias pelos testes Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) e Bartlett ($p > 0,05$), respectivamente. As médias das características biológicas foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Na ausência de normalidade e homogeneidade de variância, procedeu-se a análise não paramétrica por meio do teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), sendo as medianas comparadas pelo teste Dunn ($p < 0,05$) (ZAR, 2010).

Os dados de sobrevivência foram submetidos ao teste LogRank ($p < 0,05$) (MOORE, 2016), comparando machos e fêmeas dentro de cada população e as fêmeas entre as populações.

Com base nas características biológicas, morfológica e sobrevivência de fêmeas *C. flavipes* foi gerada a matriz de dissimilaridade calculada por meio da distância Euclidiana entre as populações das empresas estudadas. A matriz de dissimilaridade foi padronizada por normalização e submetida à análise de agrupamento hierárquico pelo método de ligação média não ponderada (BORCARD et al., 2011; MINGOTI, 2013). O agrupamento obtido foi avaliado pelo índice de Sinolhete. A partir da definição do número de grupos, procedeu-se a confecção do dendrograma com base na matriz de dissimilaridades. Realizou-se ainda a análise de coordenadas principais

(PCoA) a partir da matriz de dissimilaridades (LEGENDRE; LEGENDRE, 1998; BORCARD et al., 2011).

Utilizou-se o pacote “ExpDes.pt” para a análise paramétrica (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2018) e a função “kruskal.test” do pacote “stats” para a análise não paramétrica (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008), sendo o teste Dunn analisado pelo pacote “PMCMR (POHLERT, 2014). A análise de sobrevivência foi realizada no pacote “survival” (THERNEAU, 2015). As análises multivariadas, matriz de dissimilaridade e análise de PCoA foram calculadas com as funções “dist” e “cmdscale” do pacote “stats”, respectivamente. A padronização foi feita pela função “decostand” do pacote “vegan” (OKSANEN et al., 2017) e a determinação e validação do número de grupos pelo pacote “NbClust” (CHARRAD et al., 2014). Todas as análises foram realizadas utilizando o aplicativo computacional R versão 3.4 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

1.2.6.2 Teste de voo de *C. flavipes*

Na avaliação das populações dentro de cada grupo (voadores, caminhantes e deformados) foi utilizado o modelo linear generalizado com resíduo, seguindo distribuição de Poisson com função de ligação canônica logarítmica [MLG (Poisson, link = “log”)] (FARAWAY, 2017). As populações de *C. flavipes* foram alinhadas dentro de cada grupo e consideradas como variáveis aleatórias. O MLG foi testado por meio da análise de variância e teste F. As comparações pós teste foram realizadas por contrastes de Tukey ($p < 0,05$).

O MLG foi calculado pela função “glm” do pacote “stats” do aplicativo R e os contrastes analisados no pacote “multcomp” (HOTHORN; BRETZ; WESTFALL, 2008).

1.2.6.3 Análise filogenética

As sequências de nucleotídeos de SSU rRNA referente aos isolados de microsporídeos obtidos de *D. saccharalis* e das amostras de *C. flavipes* foram analisadas utilizando o programa Geneious v. 9.1.5 e comparadas ao banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a identificação de similaridade genética.

Em seguida, foi construído um alinhamento, utilizando o programa Geneious v. 9.1.5, com as sequências obtidas nesse estudo acrescentadas de outras sequências de microsporídios obtidas no GenBank. A análise filogenética foi feita utilizando o programa MrBayes 3.2.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001). A análise Bayesiana foi realizada para 30 milhões de gerações com amostragem a cada 1000 gerações. Cada análise constituiu de quatro corridas independentes, cada uma utilizando quatro cadeias de Markov acopladas. A convergência da corrida foi monitorada encontrando o platô no score de probabilidade (desvio padrão de frequências divididas < 0.0015). Os primeiros 25% de cada corrida foram descartados para a estimativa de uma topologia consenso e probabilidade posterior para cada nó.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Características biológicas, morfológica e sobrevivência de *C. flavipes*

Houve diferença no número de insetos por massa de pupas entre as populações das biofábricas C e D. A maior quantidade de adultos foi observada na população da biofábrica C, média de 102 parasitoides. A menor média de adultos emergidos (77,9) foi verificada em massas de *C. flavipes* da biofábrica D. Foi verificada emergência média de 96,0; 94,5; 84,7 e 93,9 indivíduos por massa de pupas nas biofábricas A, B, E e F, respectivamente (Figura 1A).

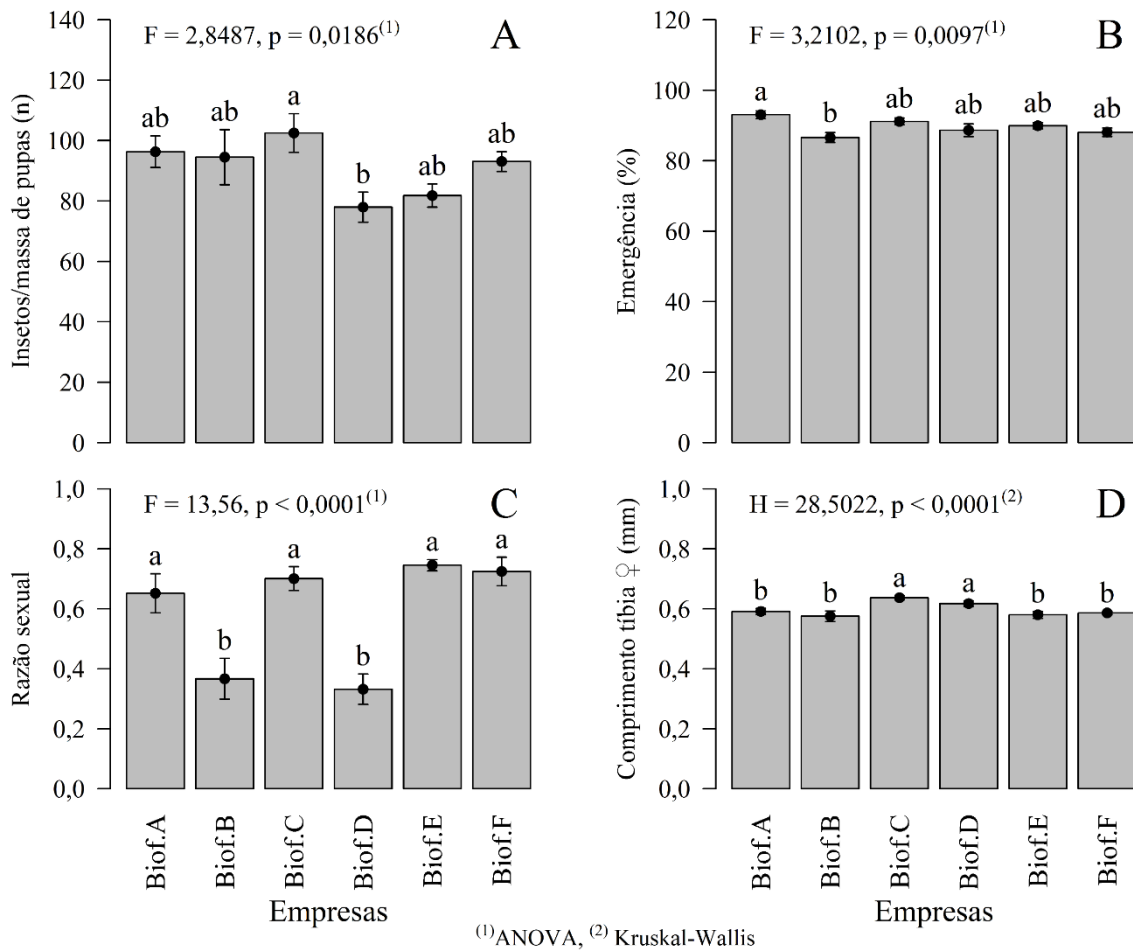
A viabilidade diferiu nas populações de parasitoides avaliadas, sendo que dentre estas, verificou-se a emergência de 93% dos adultos da biofábrica A e 86,6% dos adultos da biofábrica B. As biofábricas C, D, E e F apresentaram valores de emergência intermediários variando entre 88,6 e 91,1%. Independente das populações, todas as amostras de *C. flavipes* apresentaram emergência acima de 85% (Figura 1B).

Houve diferença estatística entre as médias de razão sexual para as populações de *C. flavipes* estudadas. As populações das biofábricas A, C, E e F tiveram as maiores médias para este parâmetro, variando de 0,65 a 0,75. Entretanto, as biofábricas B e D apresentaram menor proporção de fêmeas, com razão sexual média de 0,34 (Figura 1C).

O comprimento da tíbia das fêmeas de *C. flavipes* foi estatisticamente diferente entre as populações. As maiores medianas foram observadas na biofábrica C (0,63

mm) e na biofábrica D (0,61 mm). Os menores comprimentos de tíbia foram obtidos de fêmeas das biofábricas A, B, E e F que variaram de 0,57 a 0,59 mm (Figura 1D).

Figura 1 - Características biológicas e morfológica de seis populações de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) oriundas de biofábricas do Estado de São Paulo, Brasil. Número de insetos por massa de pupas (A), viabilidade (B), razão sexual (C) e comprimento da tíbia de fêmeas (D). Barras (médias \pm erro padrão) acompanhadas por mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey⁽¹⁾ ou Dunn⁽²⁾ ($p < 0,05$)



As funções de sobrevivência indicam que não houve diferença na longevidade mediana de machos e fêmeas da mesma população (Figura 2). Contudo, ao comparar a sobrevivência de fêmeas de cada biofábrica, foram observadas diferenças entre as populações avaliadas (Figura 3). As fêmeas da biofábrica E foram as mais longevas com tempo de sobrevivência mediana de 150 horas, seguida da biofábrica A com tempo de vida de 125 horas e da biofábrica D com sobrevivência de 120,5 horas. As fêmeas oriundas das biofábrica B e C, foram as que tiveram as menores sobrevividas, com tempo mediano de 49 e 26 horas, respectivamente (Figura 3 A e B).

Figura 2 - Sobrevivência de machos e fêmeas de seis populações de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) oriundas de biofábricas do Estado de São Paulo, Brasil. População da biofábrica A (A), biofábrica B (B), biofábrica C (C), biofábrica D (D), biofábrica E (E) e biofábrica F (F). ^{NS}Não significativo pelo teste LogRank ($p > 0,05$)

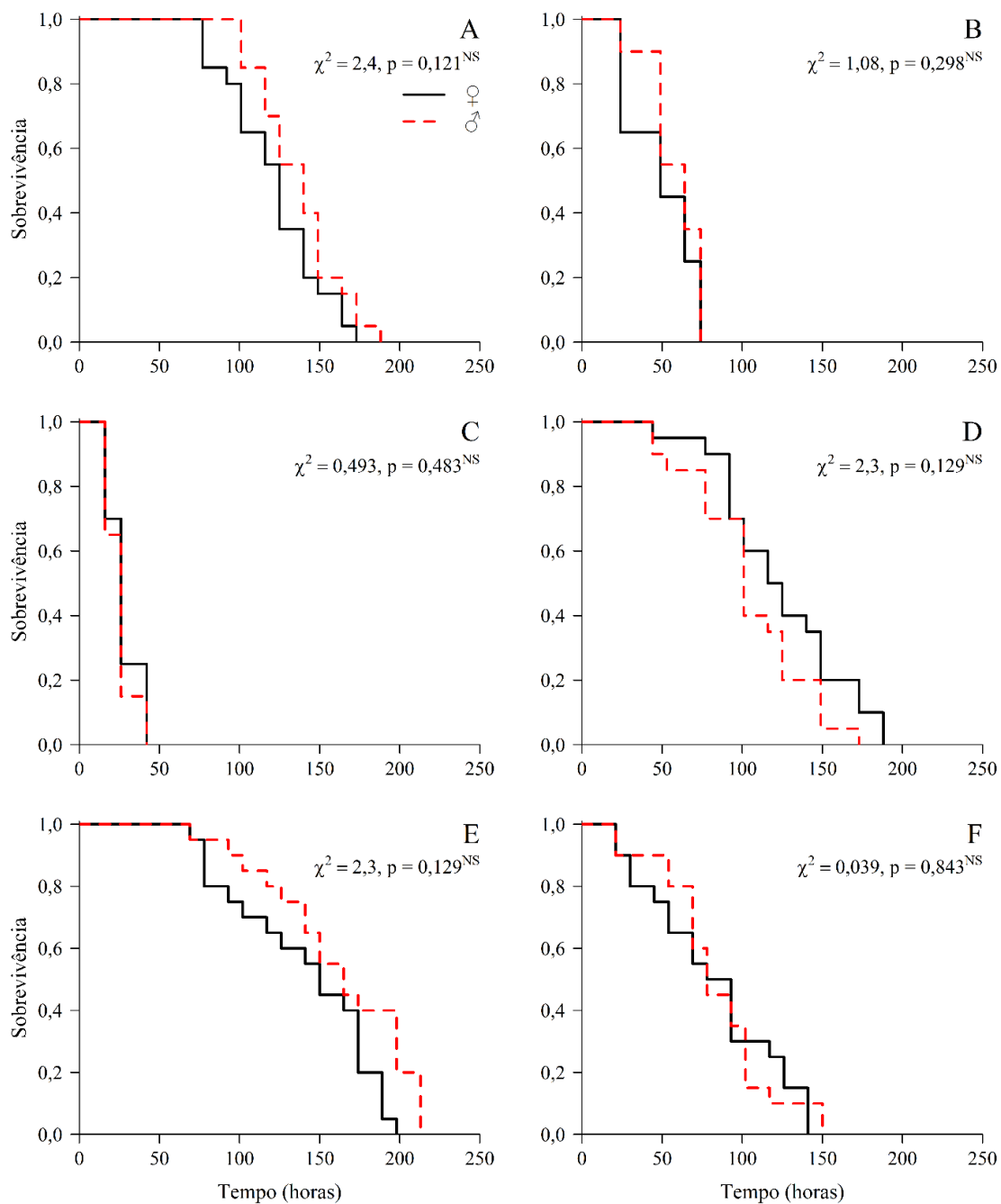
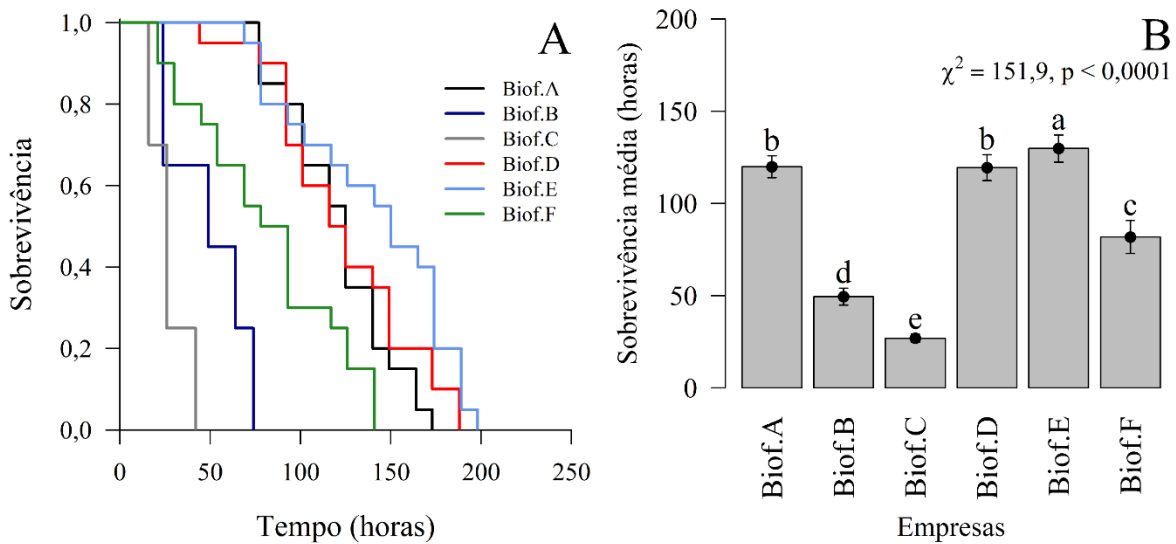


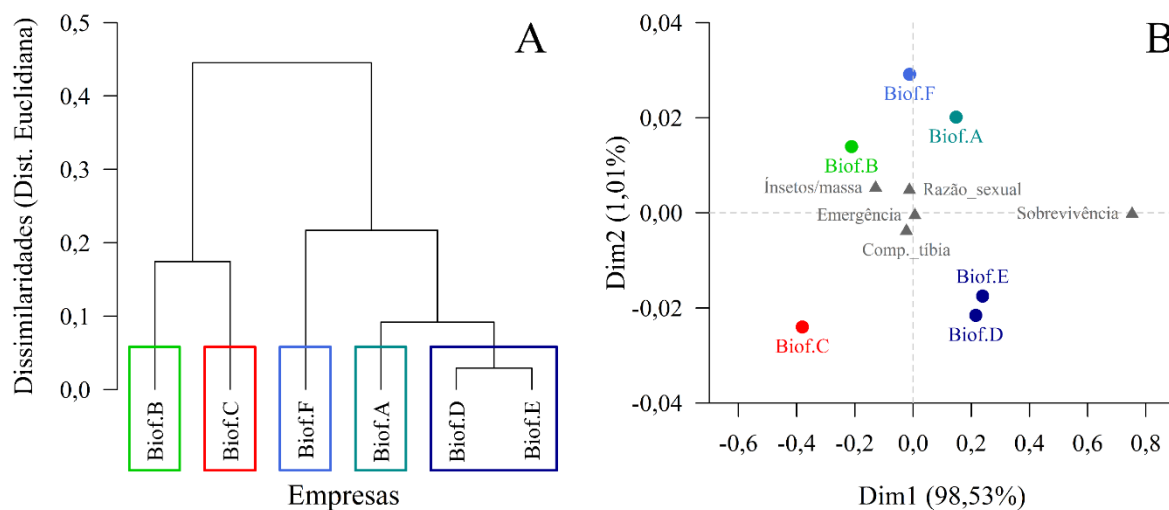
Figura 3 - Sobrevivência (A) e sobrevivência média (B) de fêmeas de seis populações de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) oriundas de biofábricas do Estado de São Paulo, Brasil. Barras (médias \pm erros-padrão) acompanhadas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de LogRank ($p > 0,05$)



Com base na análise de agrupamento, foi observada a formação de cinco grupos a partir das características biológicas, morfológica e de sobrevivência das populações de *C. flavipes* (Figura 4A): o grupo 5, composto pelas biofábricas D e E, apresentou grande similaridade entre as populações; o grupo 4 foi formado por indivíduos da biofábrica A; o grupo 3, pela biofábrica F; e os grupos 2 e 1, por agentes entomófagos das biofábricas C e B, respectivamente. As populações das biofábricas D e E, foram as que produziram os inimigos naturais com as melhores características, mesmo apresentando variações na proporção de machos e fêmeas.

Tal resultado pode ser verificado pela análise de coordenadas principais (Figura 4B), na qual, o primeiro eixo corresponde 98,53% da variação dos dados, mostrando que todas as variáveis afetaram o agrupamento. Porém, a sobrevivência seguida do número de insetos por massa foram as variáveis que geraram a maior influência sobre a formação dos grupos.

Figura 4 - Análise de agrupamento pelo método de ligação média (A) e análise de coordenadas principais (B) de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) oriundas de biofábricas do Estado de São Paulo, Brasil. Retângulos/nomes de empresas coloridos representam os grupos formados



1.3.2 Teste de voo

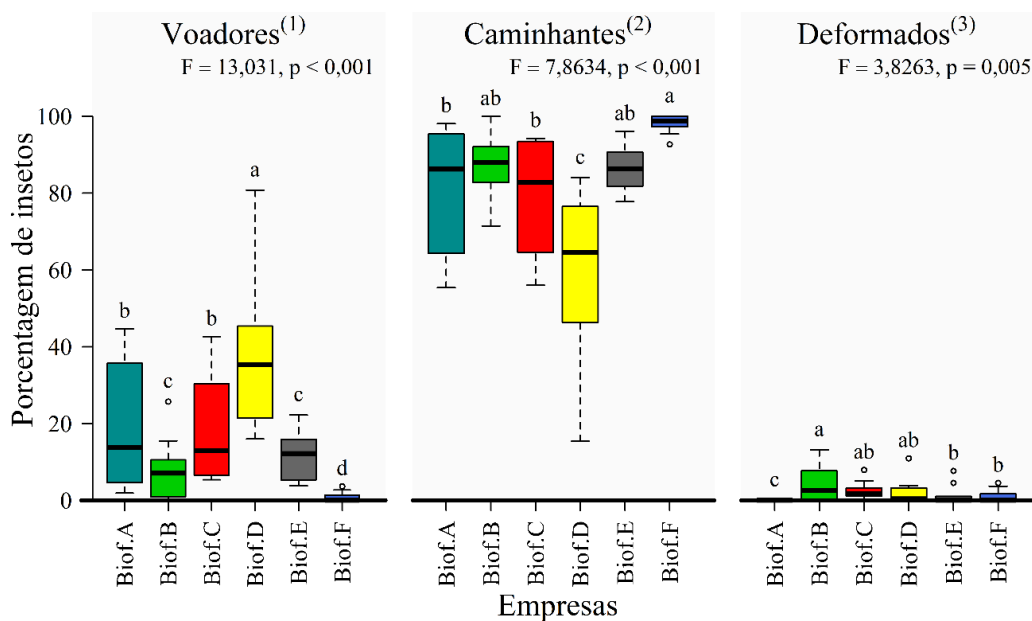
Dentro de cada categoria (voadores, caminhantes e deformados) foi observado diferença entre as populações de *C. flavipes* oriundas das empresas (MLG-Poisson; $GI = 5$, $p < 0,001$; $GI = 5$, $p < 0,001$; $GI = 5$, $p = 0,005$). Os “voadores” foram mais presentes na população da biofábrica D, com cerca de 36,9%, que diferiu das demais populações (Figura 5). As populações da biofábrica A e da biofábrica C foram semelhantes (19,7 e 18,1, respectivamente). A biofábrica B apresentou 8,0% e a biofábrica E 12,1%. A população da biofábrica F apresentou a menor presença de insetos voadores (< 1%).

A categoria “caminhantes” foi a mais abundante (Figura 5). A população da biofábrica F apresentou o maior valor de ocorrência (98,1%) e diferiu das populações da biofábrica A, biofábrica C e biofábrica D. As populações da biofábrica B e da biofábrica E apresentaram valores semelhantes (87,6 e 86,6, respectivamente), diferindo apenas da população da biofábrica D. Além de apresentar a maior variação, a população da biofábrica D teve a menor porcentagem de insetos caminhantes (61,0%).

A categoria composta por indivíduos “deformados”, apesar das diferenças observadas, foi de menor ocorrência (< 5%). Os maiores percentuais de ocorrência foram observados nas populações da biofábrica B, biofábrica C e biofábrica D,

enquanto que a população da biofábrica A não apresentou indivíduos deformados (Figura 5).

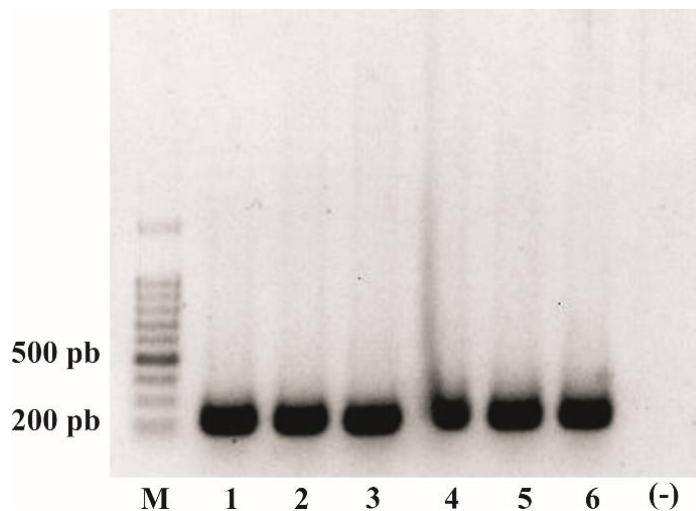
Figura 5 - Porcentagem de insetos voadores, caminhantes e deformados de seis populações de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) oriundas de biofábricas do Estado de São Paulo, Brasil. Gráfico de caixa mostram os percentis médios de 25-75%. Bigodes mostram todos os dados, excluindo valores discrepantes. Valores discrepantes (círculos) são valores superiores a 1,5 vezes o comprimento da borda superior e inferior da respectiva caixa. As diferentes letras indicam diferenças significativas entre tratamentos dentro de cada contexto (MLG-poisson seguido pelo teste Tukey, $p < 0,05$). ⁽¹⁾ Parasitoides capazes de voar. ⁽²⁾ Parasitoides que não voaram, mas não apresentavam deformação visível. ⁽³⁾ Parasitoides com deformação visível



1.3.3 PCR e Análise filogenética

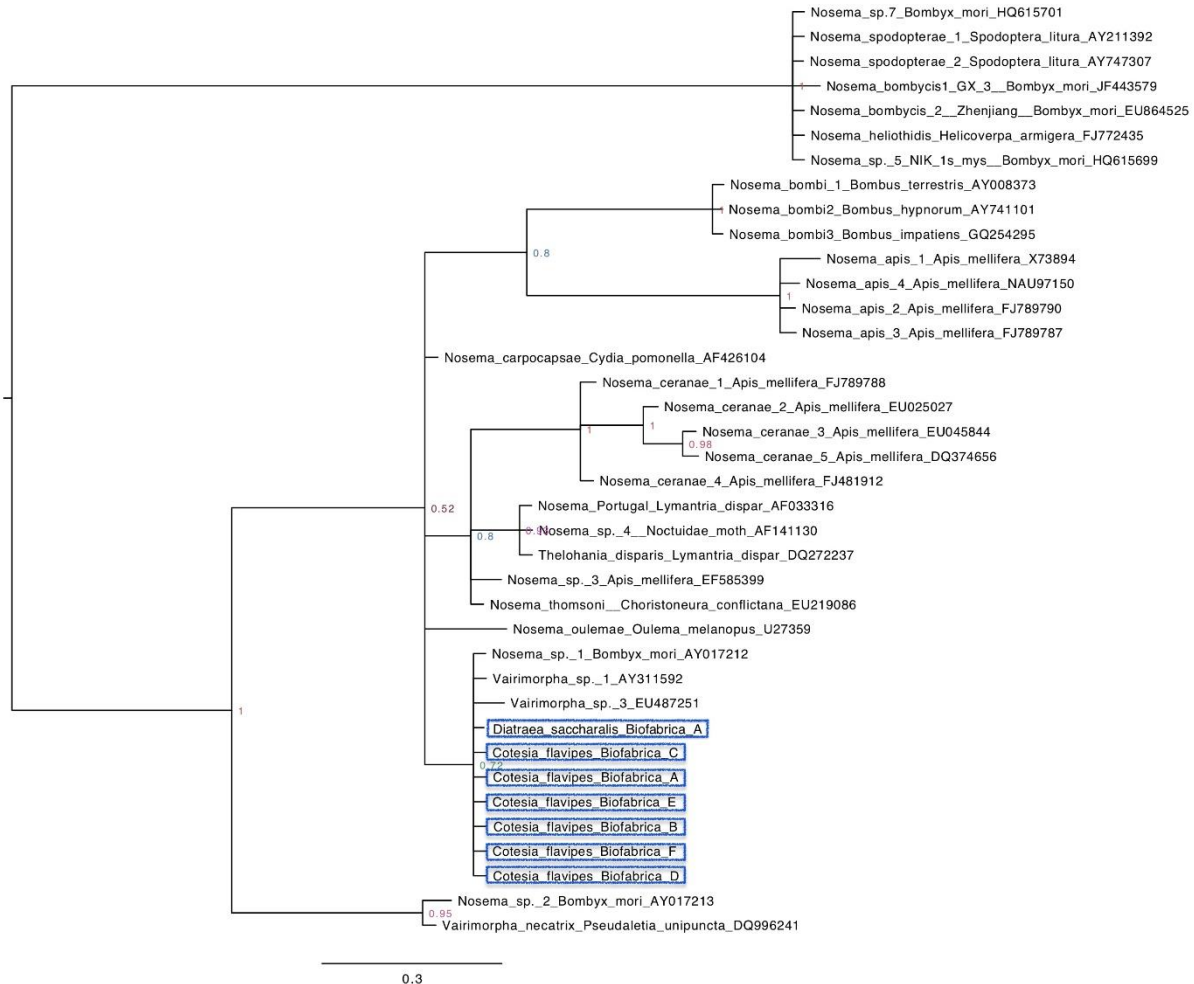
A reação de PCR revelou, através da amplificação de RNA ribossômico de microsporídeos, que todas as amostras de *C. flavipes* avaliadas apresentaram presença de parasitas deste grupo (Figura 6).

Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose (1%) da amplificação dos produtos de PCR da região small subunit (SSU) do RNA ribossômico para identificação de microsporídeos. Coluna M: Marcador de DNA de 100 pb. Colunas 1-6. Amostras positivas de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) para biofábricas [C, A, F, D, E e B]. Coluna (-). Controle negativo, sem amplificação



A árvore filogenética da região SSU do RNA ribossômico agrupou as populações de microsporídios presentes em *C. flavipes* e *D. saccharalis* em um mesmo clado juntamente com amostras de *Vairimorpha* sp. e *Nosema* sp., sugerindo que os parasitas presentes nas amostras pertencem a esse mesmo grupo taxonômico (Figura 7). Além disso, o agrupamento de todas as amostras em um mesmo clado indica uma baixa diversidade genética dos microsporídios presentes nas biofábricas do Estado de São Paulo.

Figura 7 - Árvore filogenética da região small subunit (SSU) do RNA ribossômico de microsporídios de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) e *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) obtidos em biofábricas do Estado de São Paulo. O alinhamento constituiu de 38 seqüências e a análise foi conduzida utilizando o programa MrBayes v. 3.2.2. Seqüências obtidas nesse trabalho estão destacadas em azul



1.4 DISCUSSÃO

As alterações das características biológicas e do comportamento de voo observadas em populações de *C. flavipes* podem estar relacionadas com a infecção por microsporídeos.

A qualidade dos inimigos naturais tem sido inferida por meio da avaliação dos aspectos biológicos e morfológicos, como razão sexual, longevidade, viabilidade, número de indivíduos, capacidade de voo e tamanho de tibia (van LENTEREN, 2009). As variações observadas nas populações de *C. flavipes* para as variáveis número de

insetos por massa de pupas, viabilidade e tamanho de tibia são similares aos encontrados por outros trabalhos que consideram a emergência superior a 85%, longevidade maior que dois dias, emergência média de 70 parasitoides por massa de pupa, tibia de médio variando de 0,57 a 0,61 mm e razão sexual acima de 0,5, como características adequadas para esse parasitoide (SIMÕES et al., 2012; VEIGA et al., 2013; TREVISAN et al., 2016).

No entanto, a baixa frequência de fêmeas observada nas biofábricas B e D pode afetar o desempenho desses inimigos naturais (Figura 1C), visto que a proporção de 40% de machos e 60% de fêmeas poderia favorecer o estabelecimento e controle das populações de insetos-praga no campo (CAMPOS-FARINHA; CHAUD-NETTO; GOBBI, 2000). Populações de parasitoides com predominância de machos podem apresentar baixa eficiência de parasitismo. Além disso, o curto período de sobrevivência observado para populações das biofábricas B e C (Figura 3), podem prejudicar o controle biológico e a persistência no campo, reduzindo o tempo de busca de parasitoides e, conseqüentemente, o número total de lagartas parasitadas.

As populações das biofábricas D e E apresentaram as melhores características, proporcionando a emergência de indivíduos mais longevos, com potencial de controle e persistência em campo. Entretanto, a eficiência de *C. flavipes* da biofábrica D pode ser reduzida pela maior proporção de machos nesta população.

Todavia, ao avaliar o comportamento de voo das populações, foi verificada baixa proporção de indivíduos voadores para todas as biofábricas. A predominância de parasitoides caminchantes pode ser resultado do condicionamento em laboratório durante muitos anos, em que os efeitos de criação massal ao longo do tempo podem se refletir nos parâmetros empregados na avaliação de qualidade, particularmente quanto à capacidade de voo do inseto (HIVIZI et al., 2009). Tal situação pode ser uma barreira para eficácia das liberações inundativas, reduzindo o potencial de busca e, conseqüentemente, o raio de dispersão desses parasitoides (VOLPE et al., 2014).

Trabalhos que buscam avaliar populações de *C. flavipes* atribuem as diferenças observadas às técnicas de criação adotadas pelas biofábricas (VEIGA et al., 2013), a densidade de lagartas parasitadas por recipiente (VACARI et al., 2012b), a qualidade da população matriz e a perda de variabilidade genética que pode ser resultante da consanguinidade gerada pelo cruzamento entre irmãos (MACKAUER, 1972). Contudo, pesquisa desenvolvida durante 10 gerações endogâmicas de *C. flavipes*, comparando com populações de biofábrica demonstrou não ser suficiente para gerar

diferenças entre as populações, nem revelar efeitos deletérios (TREVISAN et al., 2016).

No entanto, como demonstrado no presente estudo, por meio da identificação molecular, a presença de microsporídeos nas populações avaliadas também pode ser responsável pelas alterações das características biológicas. Estes parasitas intracelulares infectam as células do hospedeiro, impondo um alto gasto energético que induz alterações biológicas e comportamentais (DEAN; HIRT; EMBLEY, 2016). Estudos com os parasitoides larvais *C. flavipes*, *C. vestalis* (Haliday) e *Macrocentrus grandii* Goidanich (Hymenoptera: Braconidae) apontam maiores impactos na duração do período juvenil, redução da longevidade dos adultos, alteração do comportamento de voo e de busca do hospedeiro (ANDREADIS, 1982; SIMÕES et al., 2012; KERMANI et al., 2014).

A presença dos parasitas é mais relevante se considerarmos a possibilidade de transmissão vertical e horizontal (DUBUFFET et al., 2013), aliada a dificuldade de detecção quando os insetos não apresentam sintomas visíveis de infecção (BJØRNSON, 2008). Tais características somada a prática de troca de material entre as biofábricas ou a coleta em áreas de liberação sem a adequada avaliação dos parasitoides, podem favorecer a permanência do patógeno nas criações massais.

Trabalhos realizados com objetivo de controlar o patógeno em populações de inimigos naturais, divergem quanto aos resultados obtidos para compostos antimicrobianos como albendazol, fumagilina, metronidazol, nifedipina, tinidazol e carbendazim dependendo da relação hospedeiro-microsporídeos estudada (JYOTHI; PATIL; DASS, 2005; SCHÜTTE; DICKE, 2008; GISDER; GENERSCH, 2015). Assim, a seleção de indivíduos saudáveis para estabelecer as colônias livres de microsporídeos tem se mostrado o procedimento mais adequado para ácaros predadores (BJØRNSON, 2008) e pode ser uma alternativa viável para outros inimigos naturais produzidos de forma comercial.

Por ter um gene altamente conservado, a sequência de rRNA de SSU tem sido muito utilizada para estimar relação filogenética. Entretanto, este gene não pode ser usado para distinguir espécies muito próximas (CANNING et al., 1999; TSAI et al., 2003). De acordo com os resultados obtidos, foi verificado que as amostras de microsporídeos isoladas de *C. flavipes* estão estreitamente relacionadas com amostras de *Vairimorpha* sp. e *Nosema* sp. formando um único clado (Figura 7), não sendo possível diferenciá-las (TSAI et al., 2003; KU et al., 2007).

A grande similaridade observada entre os isolados indica uma proximidade genética muito estreita, sugerindo que o mesmo patógeno esteja presente em todas as populações avaliadas e demonstra a necessidade de aprimoramento dos protocolos de controle de qualidade, bem como das técnicas de detecção e mitigação do patógeno em criações massais de *C. flavipes*.

Diante do exposto, após tantos anos de utilização do parasitoide *C. flavipes*, ainda existe a necessidade de aprimorar o controle de qualidade deste inimigo natural, principalmente no que diz respeito as técnicas para mitigar a presença do patógeno em criações massais e melhorar a compreensão do real impacto desse parasita na biologia e no comportamento de busca do hospedeiro em campo.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B. et al. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998. cap. 20, p. 637–712.
- ANDREADIS, T. G. Impact of *Nosema pyrausta* on field populations of *Macrocentrus grandii*, an introduced parasite of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 39, n. 3, p. 298–302, 1982.
- BJØRNSON, S. Natural enemies of mass-reared predatory mites (family Phytoseiidae) used for biological pest control. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 46, n. 1–4, p. 299–306, 2008.
- BJØRNSON, S.; SCHÜTTE, C. Pathogens of Mass-produced Natural Enemies and Pollinators. In: van LENTEREN, J. C. (Ed.). **Quality control and production of biological control agents : theory and testing procedures**. 1. ed. Wallingford: CABI Publishing, 2003. cap. 10, p. 133–165.
- BORCARD, D.; GILLET, F.; LEGENDRE, P. **Numerical Ecology with R**. 1. ed. New York: Springer New York, 2011. 312 p.
- BOTELHO, P. S. M. Quinze anos de controle biológico da *Diatraea saccharalis* utilizando parasitoides. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 255–262, 1992.
- BOTELHO, P. S. M. et al. Associação do parasitóide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) no controle de *Diatraea saccharalis*, (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 491–496, set. 1999.
- CAMPOS-FARINHA, A. E. de; CHAUD-NETTO, J.; GOBBI, N. Biologia reprodutiva de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). IV. Discriminação entre

lagartas parasitadas e não parasitadas de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae), tempo de desenvolvimento e razão sexual dos parasitoid. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 229–234, 2000.

CANNING, E. U. et al. *Vairimorpha imperfecta* n.sp., a microsporidian exhibiting an abortive octosporous sporogony in *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Parasitology**, London, v. 119, n. 3, p. 273–286, 1999.

CHARRAD, M. et al. NbClust: An R Package for Determining the Relevant Number of Clusters in a Data Set. **Journal of Statistical Software**, Innsbruck, v. 61, n. 6, p. 1-36, 2014.

COOMBS, N. J.; GOUGH, A. C.; PRIMROSE, J. N. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. **Nucleic acids research**, London, v. 27, n. 16, p. 1-3, 1999.

DEAN, P.; HIRT, R. P.; EMBLEY, T. M. Microsporidia: Why Make Nucleotides if You Can Steal Them? **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 12, n. 11, p. 1-13, 2016.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Pragas. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. p. 349-404.

DUBUFFET, A. et al. Specific detection and localization of microsporidian parasites in invertebrate hosts by using in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n. 1, p. 385–388, 2013.

FARAWAY, J. **Extending the Linear Model with R: Generalized Linear, Mixed Effects and Nonparametric Regression Models**. 1. ed. New York: CRC Press, 2017. 312p.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt: Experimental Designs pacakge (Portuguese)**. R package version 1.2.0. 2018. Disponível em: < <https://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes.pt/ExpDes.pt.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2018.

FONSECA, A. P. P. et al. Lethal and sublethal effects of lufenuron on sugarcane borer *Diatraea flavipennella* and its parasitoid *Cotesia flavipes*. **Ecotoxicology**, London, v. 24, n. 9, p. 1869–1879, 2015.

GISDER, S.; GENERSCH, E. Identification of candidate agents active against *N. ceranae* Infection in honey bees: establishment of a medium throughput screening assay based on *N. ceranae* infected cultured cells. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2015.

HIVIZI, C. L. et al. Controle de qualidade do parasitoide *Cotesia flavipes*. In: BUENO, V. H. P. (Ed.). **Controle Biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2009. cap. 13, p. 371–379.

HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P. Simultaneous inference in general

parametric models. **Biometrical Journal**, Weinheim, v. 50, n. 3, p. 346–363, 2017.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics Applications Note**, Oxford v. 17, n. 8, p. 754–755, 2001.

JOYCE, A. L. et al. Geographic Population Structure of the Sugarcane Borer, *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae), in the Southern United States. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 10, p. 1-10, 2014.

JYOTHI, N. B.; PATIL, C. S.; DASS, C. M. S. Action of carbendazim on the development of *Nosema bombycis* Naegeli in silkworm *Bombyx mori* L. **Journal of Applied Entomology**, Berlin v. 129, n. 4, p. 205–210, 2005.

KERMANI, N. et al. Parasitism performance and fitness of *Cotesia vestalis* (Hymenoptera: Braconidae) infected with *Nosema sp.* (Microsporidia: Nosematidae): implications in integrated pest management strategy. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 6, p. 1–9, 2014.

KU, C. T. et al. Phylogenetic analysis of two putative *Nosema* isolates from Cruciferous Lepidopteran pests in Taiwan. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 95, n. 1, p. 71–76, 2007.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. **Numerical ecology**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1998. 852p.

LEPPLA, N. C. Aspects of total quality control for the production of natural enemies. In: LENTEREN, J. C. VAN (Ed.). **Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures**. 1. ed. Wallingford: CABI Publi, 2003. cap. 2, p. 19–24.

MACKAUER, M. Genetic aspects of insect production. **Entomophaga**, Dordrecht, v. 17, n. 1, p. 27–48, 1972.

MENDONÇA, A. F.; RISCO, S. H.; COSTA, J. M. B. Introduction and rearing of *Apanteles flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) in Brazil. **Proceedings International Society of Sugarcane Technologists**, Mauritius, v. 1, n. 1, p. 703–710, 1977.

MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada - Uma abordagem aplicada**. 1. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2013. 297p.

MOORE, D. F. **Applied Survival Analysis Using R**. 1. ed. Cham: Springer International Publishing, 2016. 226p.

OKSANEN, J. et al. **Community Ecology Package**. R package version 2.5.2. 2017. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2018.

- PARRA, J. R. P. Biological control in Brazil: An overview I. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 71, n. 5, p. 420–429, 2014.
- PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; PINTO, A. de S. Biological control of pests as a key component for sustainable sugarcane production. In: CORTEZ, L. A. B. (Ed.). **Sugarcane bioethanol — R&D for Productivity and Sustainability**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2010. cap. 41, p. 441–450.
- POHLERT, T. **The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR)**. R package version 4.3. 2014. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=PMCMR>>. Acesso em: 10 jun. 2018.
- POLANCZYK, R. A. et al. Pragas da cana-de-açúcar x métodos alternativos de controle. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília v. 33, n. 1, p. 17–17, 2004.
- PREZOTTI, L. et al. Teste de voo como critério de avaliação da qualidade de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae): adaptação de metodologia. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 411–417, 2002.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing. 2008. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso: Acesso em: 10 jun. 2018.
- SCHÜTTE, C.; DICKE, M. Verified and potential pathogens of predatory mites (Acari: Phytoseiidae). **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam v. 46, n. 1–4, p. 307–328, 2008.
- SIMÕES, R. A. et al. Biological and behavioral parameters of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) are altered by the pathogen *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae). **Biological Control**, San Diego, v. 63, n. 2, p. 164–171, 2012.
- SIMÕES, R. A. et al. Impacts of *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae) on the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v.129, n.1, p. 7–12, 2015.
- TAY, W. T.; O'MAHONY, E. M.; PAXTON, R. J. Complete rRNA gene sequences reveal that the microsporidium *Nosema bombi* infects diverse bumblebee (*Bombus* spp.) hosts and contains multiple polymorphic sites. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Cincinnati, v. 52, n. 6, p. 505–513, nov. 2005.
- THERNEAU, T. M. **A Package for Survival Analysis in S**. R package version 2.38. 2015. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=survival>>. Acesso: Acesso em: 10 jun. 2018.
- TREVISAN, M. et al. Quality of the exotic parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) does not show deleterious effects after inbreeding for 10 generations. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 8, p. 1–15, 2016.

TSAI, S. J. et al. The characterization of microsporidian isolates (Nosematidae: Nosema) from five important lepidopteran pests in Taiwan. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 83, n. 1, p. 51–59, 2003.

VACARI, A. M. et al. Fonte proteica na criação de *Diatraea saccharalis* e seu reflexo na produção e no controle de qualidade de *Cotesia flavipes*. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 3, p. 355–361, 2012a.

VACARI, A. M. et al. Quality of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) reared at different host densities and the estimated cost of its commercial production. **Biological Control**, San Diego, v. 63, n. 2, p. 102–106, 2012b.

van LENTEREN, J. C. Controle de qualidade de agentes de controle biológico produzidos massalmente: conhecimento, desenvolvimento e diretrizes. In: BUENO, V. H. P. (Ed.). **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2009. cap. 11, p. 311–338.

VEIGA, A. C. P. et al. Quality control of *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) from different Brazilian bio-factories. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 23, n. 6, p. 665–673, 2013.

VOLPE, H. X. L. et al. Determination of method to evaluate parasitism and cover area for studies on *Cotesia flavipes* in sugarcane. **African Journal of Agricultural**, Nairóbi, v. 9, n. 4, p. 436–447, 2014.

VOSSBRINCK, C. R. et al. Ribosomal DNA sequences of *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon cuniculi*: species identification and phylogenetic construction. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Cincinnati, v. 40, n. 3, p. 354–362, 1993.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis (5th Edition)**. 5. ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall/Pearson, 2010. 960p.

CAPÍTULO 2

Qualidade de *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) produzida em criações massais

João Paulo Pereira Paes^{1*}, Vanessa Rafaela de Carvalho², Bruno Rossitto de Marchi³, José Romário de Carvalho⁴, Dirceu Pratissoli⁴, Regiane Cristina Oliveira de Freitas Bueno¹

¹Grupo de Pesquisas em Manejo Integrado de Pragas na Agricultura, Faculdade de Ciências Agrônômicas - Universidade Estadual Paulista (UNESP), R. José Barbosa de Barros, 1780, Fazenda Lageado, 18610-307, Botucatu, SP, Brasil.

²Laboratório de Genômica Funcional & Microbiologia de Vetores, Instituto de Biotecnologia - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Alameda das Tecomarias, S/N, Capão Bonito, 18607-440, Botucatu, SP, Brasil.

³Laboratório de Virologia Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônômicas - Universidade Estadual Paulista (UNESP), R. José Barbosa de Barros, 1780, Fazenda Lageado, 18610-307, Botucatu, SP, Brasil.

⁴Laboratório de Entomologia (NUDEMAFI), Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário s / n, CP 16, 29500-000, Alegre, ES, Brasil.

***Autor correspondente:** João Paulo P. Paes. E-mail: joaopauloppaes@hotmail.com

Resumo

Durante muitos anos o parasitoide larval, *Cotesia flavipes* Cameron, tem sido utilizado no manejo da broca-da-cana *Diatraea saccharalis* (Fabricius). Entretanto, estudos com diversos parasitoides e predadores demonstram que a presença de patógenos altera o comportamento desses inimigos naturais, o que pode comprometer a qualidade e a eficácia em campo. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a qualidade de *C. flavipes* produzida em diferentes biofábricas no Brasil e identificar a existência de microsporídeos nas populações do hospedeiro e do parasitoide larval. Todas as populações (A, B, C e D) apresentaram características biológicas e morfológicas consideradas apropriadas para o parasitoide. Houve a predominância de parasitoides caminchantes em todas as populações. Foi detectado a presença de

parasitas intracelulares relacionados ao Filo Microsporidia nas populações do hospedeiro e do parasitoide. A análise filogenética indica que os isolados obtidos de *C. flavipes* pertencem ao clado *Nosema* sp. /*Vairimorpha* sp.. Dessa forma sugere-se melhorias nos protocolos de controle de qualidade de *D. saccharalis* e *C. flavipes*, visando a manutenção da eficiência do inimigo natural produzido de forma massal.

Palavras-chave: Controle biológico. Criação massal. Parasitoide larval, Microsporidia. MIP. PCR.

Abstract

For many years the larval parasitoid, *Cotesia flavipes* Cameron, has been used in the management of the *Diatraea saccharalis* (Fabricius) cane borer. However, studies with several parasitoids and predators show that the presence of pathogens alters the behavior of these natural enemies, which may compromise quality and efficacy in the field. Thus, the objective of this research was to evaluate the quality of *C. flavipes* produced in different biofactories in Brazil and to identify the presence of microsporids in the host and larval parasitoid populations. All populations (A, B, C and D) presented biological and morphological characteristics considered appropriate for the parasitoid. There was a predominance of walking parasitoids in all populations. The presence of intracellular parasites related to Filo Microsporidia was detected in host and parasitoid populations. Phylogenetic analysis indicates that the isolates obtained from *C. flavipes* belong to the clade *Nosema* sp./*Vairimorpha* sp . Thus, it is suggested improvements in the quality control protocols of *D. saccharalis* and *C. flavipes*, aiming at maintaining the efficiency of the natural enemy produced massively.

Keywords: Biological control. Larval parasitoid. Microsporidia. IPM. PCR.

2.1 INTRODUÇÃO

O manejo populacional da broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae), representa um dos principais programas de controle biológico do mundo e o mais eficiente do Brasil (PARRA, 2014), empregando o parasitoide larval *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) em liberações inundativas em 3,3 milhões de hectares anualmente, o que requer a

produção de 18 bilhões de parasitoides em 80 biofábricas distribuídas pelo país (VACARI et al., 2012a; SIMÕES et al., 2015).

O sucesso obtido no manejo populacional da broca-da-cana com uso do parasitoide larval foi possível pelo desenvolvimento de técnicas de criação em massa e de liberação em campo, aliado ao potencial do agente entomófago em suprimir populações da praga (BOTELHO; MACEDO, 2002). Embora os resultados obtidos ao longo dos anos demonstrem a eficiência do parasitoide, existe a preocupação com a qualidade dos indivíduos produzidos de forma massal pelos laboratórios (HIVIZI et al., 2009).

Os programas de controle de qualidade visam prevenir características indesejáveis que podem prejudicar a eficácia dos inimigos naturais liberados em campo (LEPPLA, 2003). Nos protocolos de qualidade de agentes entomófagos são avaliadas características biológicas como, razão sexual, longevidade, viabilidade, medidas morfométricas e parasitismo (VACARI et al., 2012b; VEIGA et al., 2013; TREVISAN et al., 2016). No entanto, características de comportamento de voo, capacidade de busca e contaminação por agentes patogênicos (LEPPLA, 2003; PREZOTTI et al., 2002; VACARI et al., 2012b), também são relevantes na qualidade total de agentes de controle biológico.

A associação entre inimigos naturais e microsporídios tem sido estudada para diversos parasitoides e predadores (BJØRNSON et al., 2013; KERMANI et al., 2014; SCHÜTTE; DICKE, 2008; SIMÕES et al., 2012). Os microsporídios são parasitas intracelulares que invadem as células hospedeiras e utilizam organelas e produtos metabólitos como substrato para se multiplicarem, consumindo parte da energia do hospedeiro (DEAN; HIRT; EMBLEY, 2016). Em todos os casos, populações infectadas pelo patógeno apresentam aumento do tempo necessário para completar o desenvolvimento, redução da longevidade dos adultos, redução da fecundidade das fêmeas, alterações no comportamento e na capacidade de busca do hospedeiro (BJØRNSON; KEDDIE, 1999; KERMANI et al., 2014; SIMÕES et al., 2012).

A maioria dos estudos que buscam inferir a qualidade de populações de *C. flavipes* realizam apenas avaliações das características biológicas, morfológicas e de comportamento de voo, não qualificando as populações quanto à presença de patógenos. Assim, a hipótese desse estudo é que além dos fatores ligados a produção massal, a presença de microsporídios nas populações de *C. flavipes* podem influenciar a eficiência e qualidade do parasitoide. Desse modo, o objetivo foi avaliar

as características biológicas, morfológicas, comportamento de voo e realizar a identificação molecular de patógeno em populações de *C. flavipes* oriundas de quatro estados brasileiros.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios do Grupo de Pesquisa em Manejo Integrado de Pragas na Agricultura “AGRIMIP”, da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), em Botucatu, São Paulo, Brasil. As avaliações foram realizadas em salas climatizadas, reguladas a 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas.

2.2.1 Obtenção de amostras

As amostras de massas de pupa de *C. flavipes* e lagartas de *D. saccharalis* foram obtidas de empresas localizadas em diferentes Estados do Brasil: São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Alagoas. No laboratório, as populações dos parasitoides foram multiplicadas utilizando os mesmos hospedeiros empregados nas biofábricas por uma geração.

As massas foram acondicionadas em potes plásticos (15 cm de diâmetro e 20 cm de altura) contendo mel para alimentação e fechados com tecido *voile*. Em decorrência da emergência dos adultos, foram ofertadas lagartas de *D. saccharalis* de terceiro ínstar as fêmeas do parasitoide permitindo o parasitismo. As lagartas recém parasitadas foram realimentadas com dieta artificial (KING; HARTLEY, 1985) modificada, contendo farelo de soja (84 g), germe de trigo (54 g), açúcar (84 g), metilparahidroxibenzoato (nipagin) (7 g), sais de Wesson (7 g), cloreto de colina (1,4 g), formaldeído 40% (1,4 mL), solução vitamínica (20 mL), tetraciclina (0,17 mg), caragenina (25 g) e água (1,6 L).

As massas de pupas dos parasitoides das populações A, B, C e D foram classificadas em pequenas, médias e grandes (VACARI et al., 2012a). As massas médias foram divididas em dois grupos:

No primeiro grupo, as massas foram individualizadas em tubos de vidro de fundo chato (2 cm diâmetro x 8 cm altura), contendo uma gotícula de mel para alimentação

e vedados com filme plástico de PVC. Após a morte dos adultos, foram avaliados o número de indivíduo por massa, a razão sexual e a viabilidade das massas. Separou-se aleatoriamente 20 fêmeas de cada biofábrica e com o auxílio de uma ocular micrométrica acoplada ao estereomicroscópio, realizou-se a medição do comprimento da tíbia posterior.

No segundo grupo, as massas foram acondicionadas em potes plásticos (15 cm de diâmetro x 20 cm de altura), contendo mel para alimentação e fechados com tecido *voile*. Quando verificado a emergência dos primeiros indivíduos, esses foram descartados a fim de padronizar a idade, utilizando adultos de 0 a 3 horas de vida nas avaliações de sobrevivência. Selecionou-se aleatoriamente 20 machos e 20 fêmeas de cada população, individualizando-os em tubos Duran (1 cm de diâmetro x 5 cm altura), contendo uma gotícula de mel e fechados com tecido *voile*, realizando as avaliações duas vezes ao dia até a morte de todos indivíduos.

2.2.2 Teste de voo

Nos ensaios de voo foi usada a gaiola de PVC, modelo IOBC (PREZOTTI et al., 2002). A parte interna do tubo foi revestida com cartolina preta e o fundo fechado com disco de isopor revestido por plástico preto. Como mecanismo separador dos insetos caminhadores foi fixado um anel contendo cola entomológica a 3,5 cm da borda inferior do tubo. A parte superior da gaiola foi fechada com placa de Petri (15 cm de diâmetro) impregnada com cola para coleta dos insetos voadores.

As massas de pupas de *C. flavipes* prestes a emergir foram individualizadas em tubo de vidro de fundo chato (2 cm diâmetro x 8 cm de altura), contendo uma gotícula de mel para alimentação e fechados com tecido *voile*. Em seguida, esses tubos foram fixados no centro das gaiolas de voo e foram colocados em bancada com iluminação constante por 72 horas. Posteriormente, foram avaliados a porcentagem de parasitoides voadores (presos na placa de Petri), caminhadores (presos do anel) e no fundo (deformados).

2.2.3 Padronização de amostras para identificação molecular

As lagartas de terceiro ínstar sintomáticas de *D. saccharalis* foram utilizadas na confecção de esfregaços para identificação preliminar de esporos de microsporídeos.

Os insetos foram mortos por congelamento, em seguida, foi realizado um corte transversal com bisturi no abdômen dos mesmos. O conteúdo extravasado foi colocado sobre uma lâmina de vidro, adicionando uma gota de solução salina (0,85% NaCl) para maceração sobre a lâmina microscópica, sendo o excesso do conteúdo corporal dos insetos retirado com uma pinça. As lâminas foram fixadas em metanol por dez minutos e secas ao ar. A coloração dos esporos foi feita com Giemsa (BJØRNSON, 2008) diluída a 50% durante 30 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente para retirar o excesso do corante e secas ao ar. Os esfregaços foram visualizados em microscópio de contraste de fase com aumento de 1000x (Zeiss Primo Star) (ALVES et al., 1998).

2.2.4 Extração de DNA genômico

Os exemplares sintomáticos de *D. saccharalis* e as amostras de *C. flavipes* foram acondicionados em congelador a -20°C . Após o descongelamento, selecionou-se aleatoriamente uma lagarta para extração do DNA genômico e padronização da reação de polimerase em cadeia (PCR). A lagarta foi lavada com solução salina (0,85% NaCl) desinfestada com álcool 70 °GL e macerada, posteriormente, removeu-se as partes maiores do corpo do inseto. Adicionou-se ao conteúdo corporal 80 μL de solução Chelex a 10% e 8 μL de proteinase K a 20 mg/mL em microtubo. Em seguida, a amostra foi colocada em bloco térmico a 95°C por 20 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para extração dos parasitoides, entretanto, foram separados 50 indivíduos e macerados em microtubo de 2 mL. O protocolo para extração de DNA foi realizado (COOMBS, GOUGH, PRIMROSE, 1999) utilizando resina Chelex 100®. Os sobrenadantes foram coletados para a realização da PCR.

2.2.5 PCR e Sequenciamento

A partir do DNA total extraído, foi realizado um PCR utilizando os iniciadores (primers) universais para microsporídeos (F) CACCAGGTTGATTCTGCC e (R) TTATGATCCTGCTAATGGTTC, tamanho de 222 pb (VOSSBRINCK et al., 1993) que amplificam a região small subunit (SSU) do RNA ribossômico.

As reações foram preparadas contendo 12,5 µL de Gotaq Hot Start (Promega), 5 U/µL Taq, 100 µM de cada dNTP e 25 mM MgCl₂, 5 µL de Nuclease Free Water (Promega), 1,25 µL de cada primer [10 mM] e 5 µL de DNA genômico, totalizando 25 µL por reação. A PCR foi realizada em termociclador INFINIGEN (modelo TC-96CG) com desnaturação inicial por 4 minutos a 95 °C, seguida por 45 ciclos com desnaturação a 95 °C por 1 minuto, seguida pela fase de anelamento a 48 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto e com uma fase final de polimento por 4 minutos a 72 °C (TAY; O'MAHONY; PAXTON, 2005).

Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando marcador de 100 pb (Norgen) e fotografado em transiluminador de luz UV (Major Science).

A purificação do produto da PCR foi feita seguindo as recomendações do Norgen PCR Purification Kit (Qiagen, Cat#14400). O sequenciamento foi realizado por sequenciador automático de DNA Sanger (Modelo: ABI 3500 - Applied Biosystems) no Instituto de Biotecnologia (IBTEC - UNESP).

2.2.6 Análise estatística

2.2.6.1 Características biológicas, morfológica e sobrevivência de *C. flavipes*

As características biológicas (número de insetos/massa de pupas, emergência e razão sexual) e morfológica (comprimento da tibia de insetos fêmea) foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$) e os resíduos avaliados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias pelos testes Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) e Bartlett ($p > 0,05$), respectivamente. As médias das características biológicas foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Na ausência de normalidade e homogeneidade de variância, procedeu-se a análise não paramétrica por meio do teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), sendo as medianas comparadas pelo teste Dunn ($p < 0,05$) (ZAR, 2010).

Os dados de sobrevivência foram submetidos ao teste LogRank ($p < 0,05$) (MOORE, 2016), comparando machos e fêmeas dentro de cada população e as fêmeas entre as populações.

Utilizou-se o pacote "ExpDes.pt" para a análise paramétrica (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013) e a função "kruskal.test" do pacote "stats" para a

análise não paramétrica (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008), sendo o teste Dunn analisado pelo pacote “PMCMR” (POHLERT, 2014). A análise de sobrevivência foi realizada no pacote “survival” (THERNEAU, 2015). Todas as análises foram realizadas utilizando o aplicativo computacional R versão 3.4 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

2.2.6.2 Teste de voo de *C. flavipes*

Na avaliação das populações dentro de cada grupo (voadores, caminhantes e deformados) utilizou o modelo linear generalizado com resíduo, seguindo distribuição de Poisson com função de ligação canônica logarítmica [MLG (Poisson, link = “log”)] (FARAWAY, 2017). As empresas foram alinhadas dentro de cada grupo e consideradas como variáveis aleatórias. O MLG foi testado por meio da análise de variância e teste F. As comparações pós teste foram realizadas por contrastes de Tukey ($p < 0,05$). O MLG foi calculado pela função “glm” do pacote “stats” do aplicativo R e os contrastes analisados no pacote “multcomp” (HOTHORN; BRETZ; WESTFALL, 2017).

2.2.6.3 Análise filogenética

As sequências de nucleotídeos de SSU rRNA referente aos isolados de microsporídeos obtidos de *D. saccharalis* e das amostras de *C. flavipes* foram analisadas utilizando o programa Geneious v. 9.1.5 e comparadas ao banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a identificação de similaridade genética.

Em seguida, foi construído um alinhamento, utilizando o programa Geneious v. 9.1.5, com as sequências obtidas nesse estudo acrescentadas de outras sequências de microsporídios obtidas no GenBank. A análise filogenética foi feita utilizando o programa MrBayes 3.2.2. (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001). A análise Bayesiana foi realizada para 30 milhões de gerações com amostragem a cada 1000 gerações. Cada análise constituiu de quatro corridas independentes, cada uma utilizando quatro cadeias de Markov acopladas. A convergência da corrida foi monitorada encontrando o platô no score de probabilidade (desvio padrão de frequências divididas < 0.0015). Os primeiros 25% de cada corrida foram descartados para a estimativa de uma topologia consenso e probabilidade posterior para cada nó.

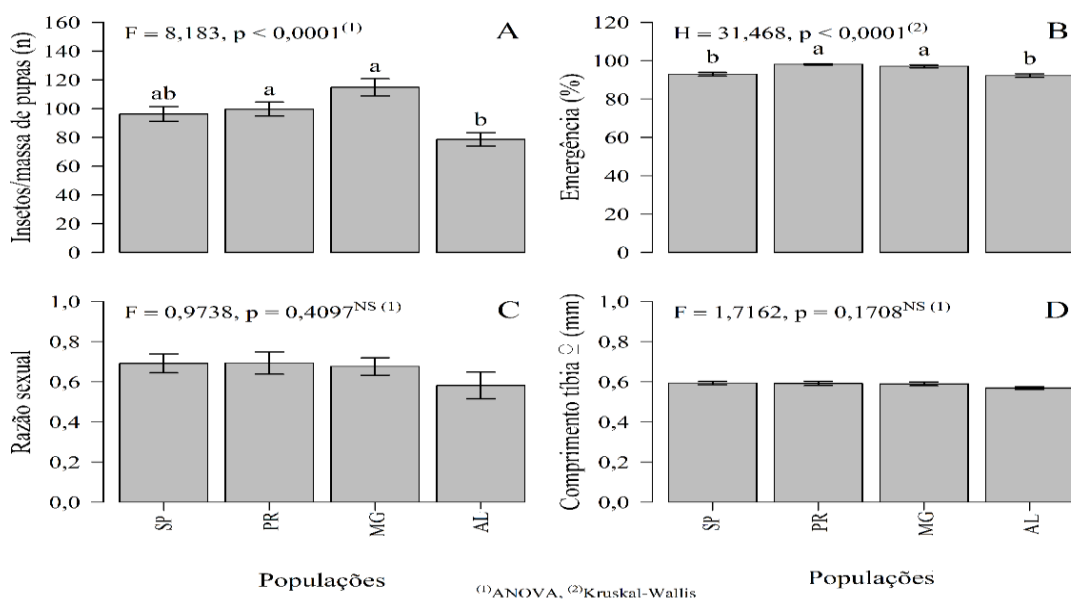
2.3 RESULTADOS

2.3.1 Características biológicas, morfológica e sobrevivência de *C. flavipes*

As populações de *C. flavipes* obtidas nas biofábricas instaladas nos Estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Alagoas apresentaram diferenças estatísticas apenas nas variáveis número de insetos por massa de pupas e viabilidade (Figura 1). A biofábrica de MG apresentou a maior média de insetos emergidos por massa de pupas de *C. flavipes* (114,8), mas não diferiu das biofábricas de SP (96,3) e de PR (99,6), enquanto que a biofábrica de AL teve a menor média para este parâmetro (78,6), sendo semelhante a biofábrica A (Figura 1A).

O maior número de parasitoides emergidos foi observado nas populações das biofábricas do PR e de MG, média de 97,6%, seguida das biofábricas de SP e de AL, média de 92,5% (Figura 1B). A proporção de machos e fêmeas foram estatisticamente iguais variando de 0,58 a 0,69 para *C. flavipes* nas diferentes biofábricas. Em todas as populações foi observado maior frequência de parasitoides fêmeas (Figura 1C). Os parasitoides obtidos nas diferentes populações não apresentaram diferenças significativas quanto ao comprimento de tíbia das fêmeas, variando de 0,56 a 0,59 mm (Figura 1D).

Figura 1 - Características biológicas e morfológica de quatro populações de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) oriundas de biofábricas do Brasil. Número de insetos por massa de pupas (A), viabilidade (B), razão sexual (C) e comprimento da tíbia de fêmeas (D). Barras (médias \pm erros padrão) acompanhadas por mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey⁽¹⁾ ou Dunn⁽²⁾ ($p < 0,05$)



Não houve diferença na longevidade mediana de machos e fêmeas da mesma população (Figura 2). Entretanto, ao comparar a sobrevivência das fêmeas de cada biofábrica, verificou-se diferenças entre as populações avaliadas (Figura 3). As fêmeas das biofábricas de SP e de AL foram as mais longevas com tempo de sobrevivência mediana de 125 e 118 horas, respectivamente. Os menores tempos de sobrevivência foram observados em fêmeas de *C. flavipes* das biofábricas de PR (90 horas) e de MG (95 horas) (Figura 3 A e B).

Figura 2 - Sobrevivência de machos e fêmeas de quatro populações de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) oriundas de biofábricas do Brasil. População da biofábrica A (A), biofábrica B (B), biofábrica C (C) e biofábrica D (D). ^{NS}Não significativo pelo teste LogRank ($p > 0,05$)

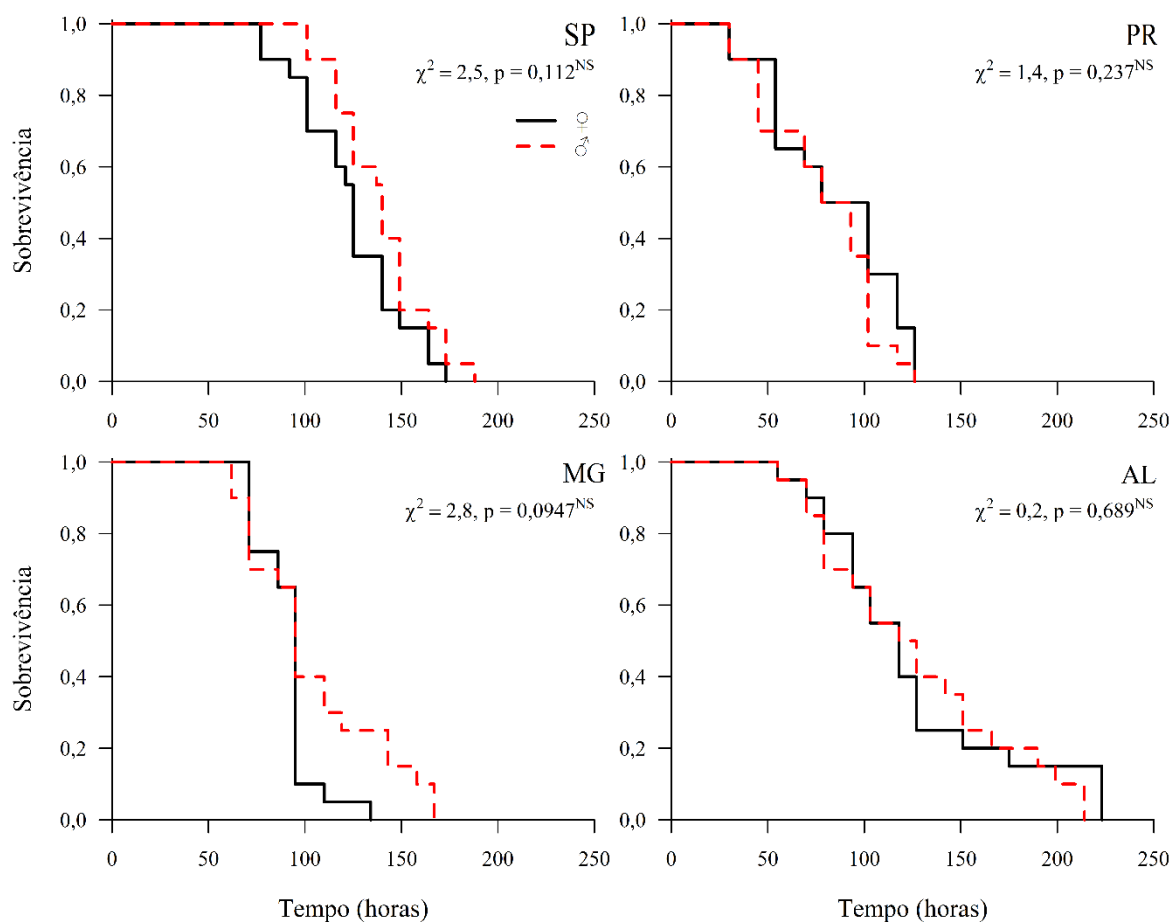
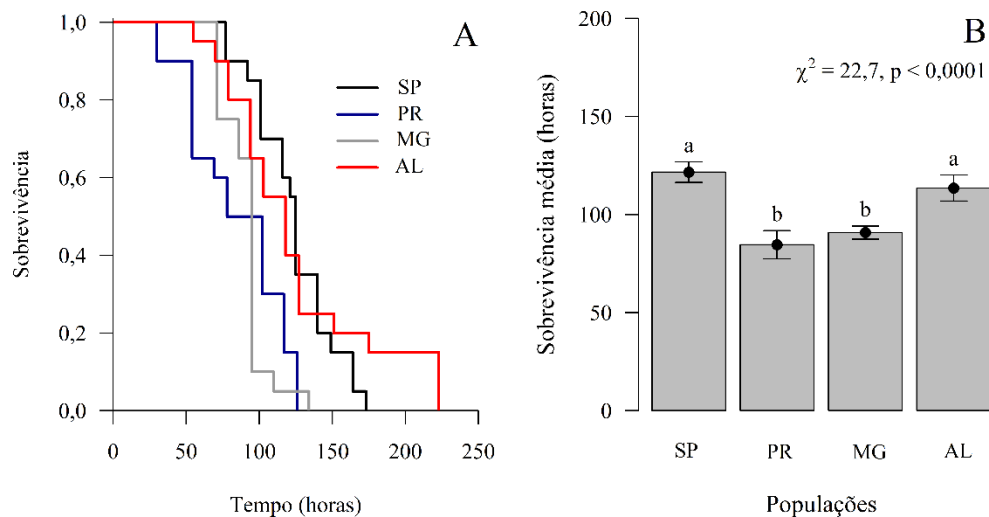


Figura 3 - Sobrevivência (A) e sobrevivência média (B) de fêmeas de quatro populações de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) oriundas de biofábricas do Brasil. Barras (médias \pm erros-padrão) acompanhadas por mesma letra não diferem entre si pelo teste LogRank ($p > 0,05$)



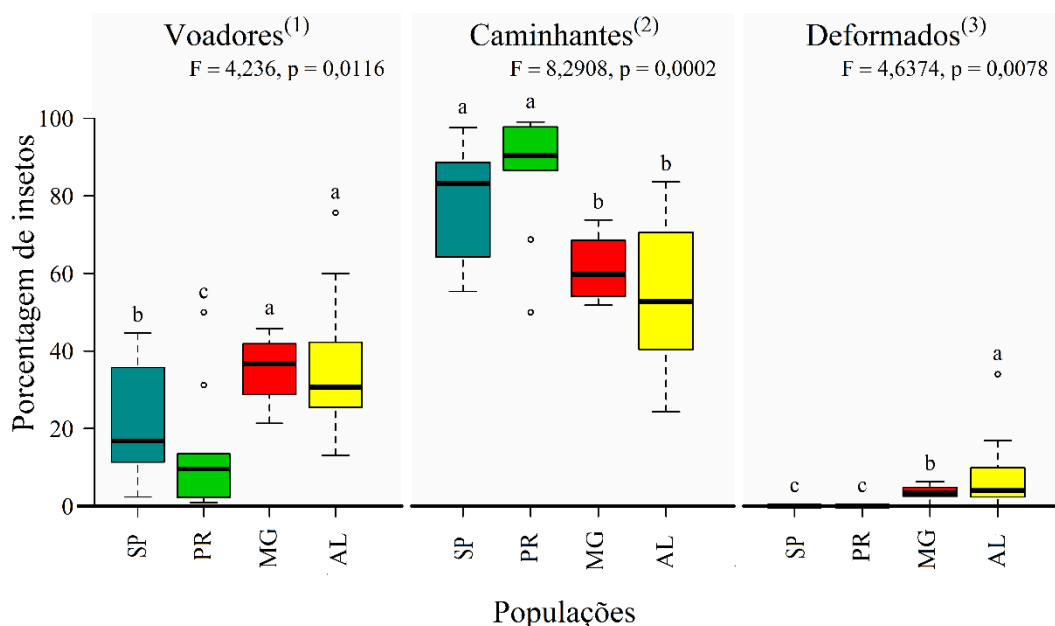
2.3.2 Teste de voo

O teste de voo demonstrou que existem diferenças dentro de cada categoria (voadores, caminhadores e deformados) para as populações de *C. flavipes* (MLG-Poisson; $GI = 3, p < 0,001$; $GI = 3, p < 0,001$; $GI = 3, p = 0,005$) (Figura 4). Os parasitoides “voadores” foram mais presentes nas populações das biofábricas de MG e de AL, com cerca de 35,2 e 35,6%, respectivamente. Os parasitoides oriundos da biofábrica de SP, apresentaram porcentagem de indivíduos voadores intermediária (21,6%), enquanto que a biofábrica do PR teve a menor porcentagem de insetos voadores (13,9%).

A categoria “caminhantes” foi predominante em todas populações (Figura 4). Os parasitoides das biofábricas de SP e do PR apresentaram os maiores valores de ocorrência, 78,3 e 86,2, respectivamente, diferindo das demais populações. As populações da biofábricas de MG (61,4%) e da biofábrica de AL (56,3%) foram semelhantes e apresentaram os menores valores para o parâmetro.

Apesar das diferenças observadas, a categoria composta por indivíduos “deformados” apresentou frequência menor que 8% em todas as populações. A maior ocorrência foi observada na população da biofábrica de AL (7,9%), seguida da biofábrica C (3,3%). Nas biofábricas A e B não foram observados indivíduos deformados (Figura 4).

Figura 4 - Porcentagem de insetos voadores, caminhantes e deformados de quatro populações de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) oriundas de biofábricas do Brasil. Gráfico de caixa mostram os percentis médios de 25-75%. Bigodes mostram todos os dados, excluindo valores discrepantes. Valores discrepantes (círculos) são valores superiores a 1,5 vezes o comprimento da borda superior e inferior da respectiva caixa. As diferentes letras indicam diferenças significativas entre tratamentos dentro de cada contexto (MLG-poisson seguido pelo teste Tukey, $p < 0,05$). ⁽¹⁾ Parasitoides capazes de voar. ⁽²⁾ Parasitoides que não voaram, mas não apresentavam deformação visível. ⁽³⁾ Parasitoides com deformação visível



2.3.3 PCR e análise filogenética

A reação de PCR revelou por meio da amplificação de RNA ribossômico de microsporídeos que todas as populações de *D. saccharalis* (Figura 5A) e de *C. flavipes* (Figura 5B) amostradas apresentaram presença de parasitas intracelulares deste grupo.

A árvore filogenética da região SSU do RNA ribossômico agrupou os isolados de microsporídeos detectados nas populações de *C. flavipes* em um mesmo clado, juntamente com amostras de *Vairimorpha* sp. e *Nosema* sp., sugerindo que patógeno detectado nas amostras pertencem ao mesmo grupo taxonômico (Figura 6). Além disso, o agrupamento de todos isolados em um mesmo clado, indica que existe uma baixa diversidade genética entre os microsporídeos presentes nas biofábricas avaliadas.

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose (1%) da amplificação dos produtos de PCR da região small subunit (SSU) do RNA ribossômico para identificação de microsporídeos. Lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) (A) e amostras de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) (B). Coluna M: Marcador de DNA de 100 pb. Colunas 1-4 amostras positivas para hospedeiro [B, A, C e D] e parasitoide [A, D, B e C]. Coluna (-). Controle negativo, sem amplificação

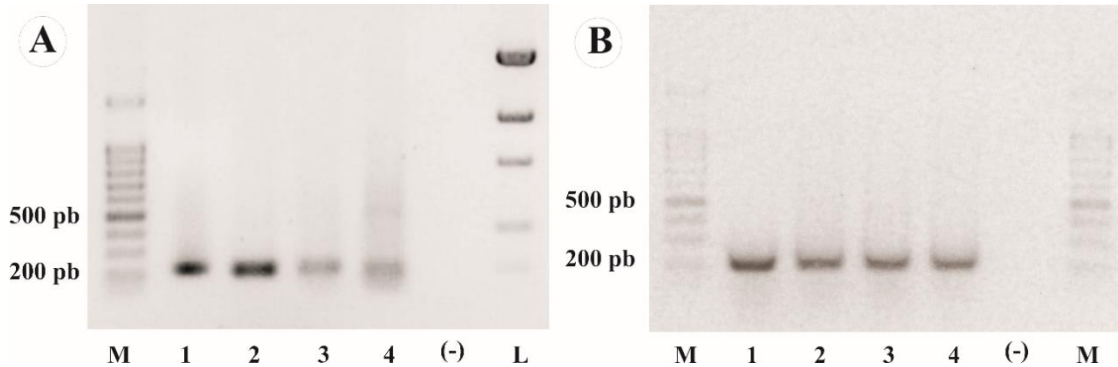
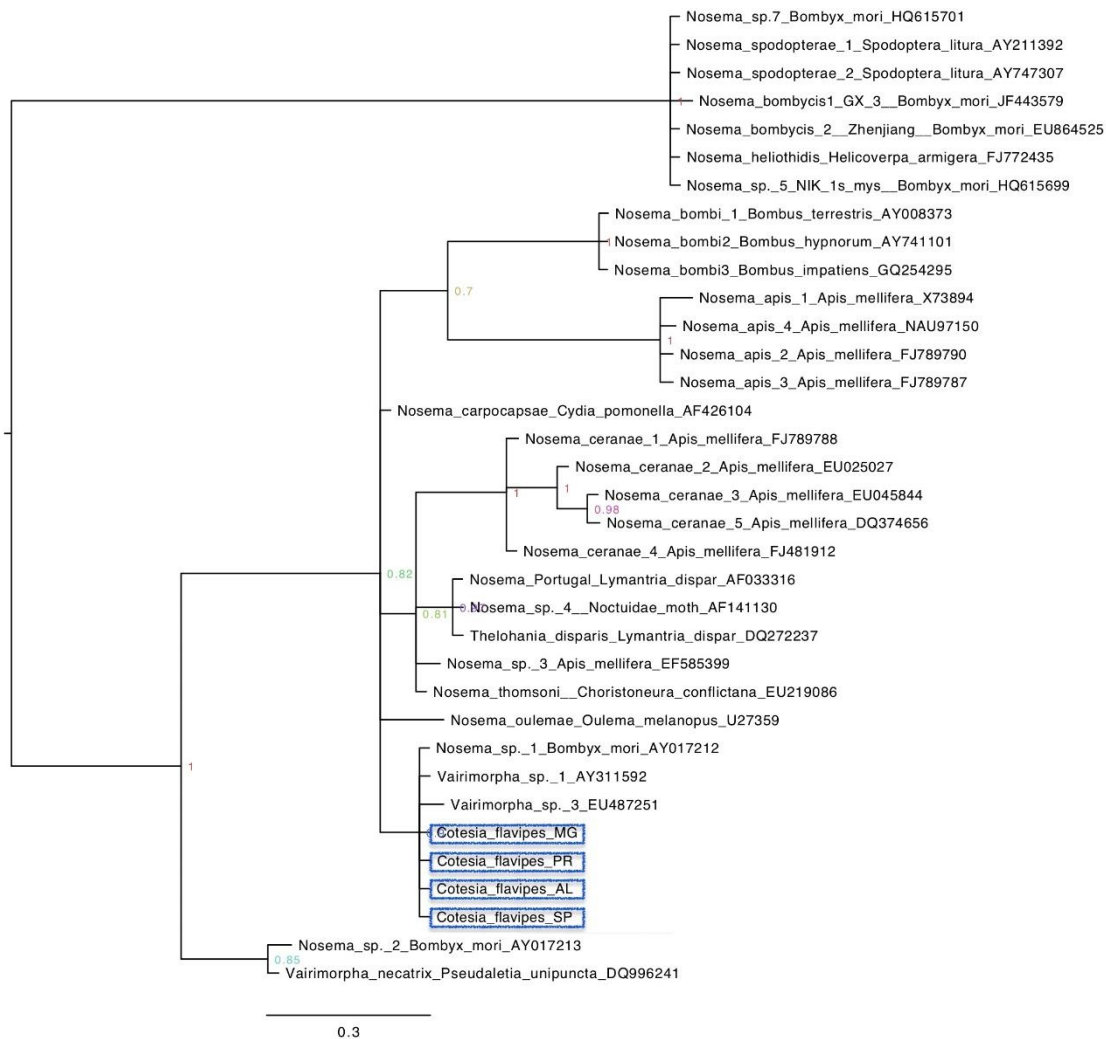


Figura 6 - Árvore filogenética da região small subunit (SSU) do RNA ribossômico de microsporídios de *Cotesia flavipes* e *Diatraea saccharalis* obtidos em biofábricas do Brasil. O alinhamento constituiu de 35 seqüências e a análise foi conduzida utilizando o programa MrBayes v. 3.2.2. Seqüências obtidas nesse trabalho estão destacadas em azul



2.4 DISCUSSÃO

A crescente demanda de *C. flavipes* observada a partir da introdução do inimigo natural, impulsionou o estabelecimento de biofábricas em diferentes estados brasileiros, bem como a melhoria das técnicas de criação para maximizar os custos e manter a qualidade do agente biológico produzido. De modo geral, a maioria dos laboratórios monitora a qualidade dos insetos multiplicados massalmente por meio de avaliações das características como a longevidade, medidas morfológicas, viabilidade e razão sexual (VEIGA et al., 2013; TREVISAN et al., 2016).

A avaliação das características biológicas de *C. flavipes* oriundas de biofábricas localizadas nos Estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Alagoas revelou diferenças entre as populações estudadas quanto ao número de inseto por massa de pupas e viabilidade (Figura 1). Assim, ressalta-se que as menores médias obtidas para estas variáveis são similares ou superiores aos descritos em outros trabalhos (VACARI et al., 2012a; VACARI et al., 2012b; VEIGA et al., 2013).

A maior proporção de parasitoides fêmeas foi verificada em todas as populações avaliadas (Figura 1), resultado que pode ser considerado adequado para inimigos naturais empregados em programas de controle biológico, pois a razão sexual acima de 0,6 pode favorecer o estabelecimento e o controle da broca-da-cana (CAMPOS-FARINHA; CHAUD-NETTO; GOBBI, 2000; VACARI et al., 2012b). Além disso, *C. flavipes* com tamanho de tibia médio de 0,58 mm, próximo ao obtido em outra pesquisa (SIMÕES et al., 2012) e a sobrevivência mediana variando de 90 a 125 horas (3,7 a 5,2 dias), sugerem que os parasitoides apresentam qualidade e condições de serem eficientes em liberações inundativas (SIMÕES et al., 2012; TREVISAN et al., 2016; VEIGA et al., 2013).

Entretanto, ao considerar o comportamento de voo das populações de *C. flavipes*, verificou-se baixa proporção de indivíduos voadores em todas as biofábricas, que pode ser consequência do condicionamento em laboratório, pelos efeitos da multiplicação massal, que podem favorecer a seleção e provocar alterações de características biológicas e comportamentais (MACKAUER, 1972). A predominância de parasitoides caminhantes nas populações de *C. flavipes*, torna-se um fator relevante e que pode afetar o desempenho do inimigo natural reduzindo o potencial de busca e conseqüentemente o raio de dispersão do mesmo (VOLPE et al., 2014).

Estudos desenvolvidos com objetivo de qualificar populações de inimigos naturais empregados como agente de controle, apontam o processo de multiplicação massal como sendo um dos principais responsáveis pelas alterações biológicas e comportamentais (VEIGA et al., 2013). No entanto, um dos resultados mais relevantes obtidos neste trabalho diz respeito a presença de microsporídeos nas amostras de *C. flavipes*, indicando que o patógeno está amplamente distribuído e presente nas criações massais do hospedeiro *D. saccharalis* e do parasitoide larval.

Infecções por microsporídeos em inimigos naturais produzidos de forma massal não são incomuns. A contaminação de parasitoides geralmente ocorre quando as larvas se alimentam da hemolinfa ou de tecidos infectados, resultando em uma variedade de efeitos deletérios sobre o agente. Dentre os quais destacam-se, dependendo do grau de infecção, alterações na duração da fase jovem, redução da sobrevivência, alteração do comportamento de voo e de busca do hospedeiro. Esses sintomas decorrem do alto gasto energético imposto pelo patógeno durante a multiplicação, empregado organelas e produtos metabólicos da célula hospedeira para completar o ciclo (BJØRNSON; KEDDIE, 1999; BJØRNSON et al., 2013; KERMANI et al., 2014; SIMÕES et al., 2012).

Quando o patógeno está presente em baixa intensidade, a detecção por meio dos sintomas se torna difícil, pois o mesmo permanece de forma latente sem causar alterações visíveis nas características biológicas e comportamentais (BJØRNSON, 2008). Esse quadro pode se perpetuar durante várias gerações graças a possibilidade de transmissão vertical e horizontal que podem favorecer a multiplicação de microsporídeos em criações massais (DUBUFFET et al., 2013).

Tais características, aliada a prática da troca de material entre as biofábricas ou a coleta em campo sem a adequada avaliação dos hospedeiros e parasitoides, podem favorecer a permanência do patógeno nas populações de *D. saccharalis* e *C. flavipes*. Hipótese que se torna ainda mais relevante ao considerarmos a proximidade genética observada entre os isolados de microsporídeos, estreitamente relacionados com amostras de *Vairimorpha* sp. e *Nosema* sp. formando um único clado (Figura 5).

Diante do exposto, verifica-se que mais atenção deve ser dada aos protocolos de controle de qualidade de *D. saccharalis* e *C. flavipes*. A identificação de patógenos deve ser realizada antes dos hospedeiros e parasitoides serem inseridos na criação massal, o que requer o avanço de técnicas de identificação, como teste sorológico de

ELISA (ARONSTEIN; WEBSTER; SALDIVAR, 2013) ou emprego de diagnósticos moleculares por meio de PCR.

REFERÊNCIAS

ALVES, S. B. et al. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998. cap. 20, p. 637–712.

ARONSTEIN, K. A.; WEBSTER, T. C.; SALDIVAR, E. A serological method for detection of *Nosema ceranae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 621–625, 2013.

BJØRNSON, S. Natural enemies of mass-reared predatory mites (family Phytoseiidae) used for biological pest control. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 46, n. 1–4, p. 299–306, 2008.

BJØRNSON, S.; KEDDIE, B. Effects of *Microsporidium phytoseiuli* (Microsporidia) on the Performance of the Predatory Mite, *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). **Biological Control**, v. 15, n. 2, p.153–161,1999.

BJØRNSON, S.; STEELE, T.; HU, Q.; ELLIS, B.; SAITO, T. Ultrastructure and molecular characterization of the microsporidium, *Nosema chrysoperlae* sp. nov., from the green lacewing, *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) used for biological pest control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, n. 1, p. 53–60, 2013.

BOTELHO, P. S. M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORREA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (Eds.). **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2002. cap. 25, p. 409–425.

CAMPOS-FARINHA, A. E. de; CHAUD-NETTO, J.; GOBBI, N. Biologia reprodutiva de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). IV. Discriminação entre lagartas parasitadas e não parasitadas de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae), tempo de desenvolvimento e razão sexual dos parasitoid. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 229–234, 2000.

COOMBS, N. J.; GOUGH, A. C.; PRIMROSE, J. N. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. **Nucleic acids research**, London, v. 27, n. 16, p. 1-3, 1999.

DEAN, P.; HIRT, R. P.; EMBLEY, T. M. Microsporidia: Why Make Nucleotides if You Can Steal Them? **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 12, n. 11, p. 1-13, 2016.

DUBUFFET, A. et al. Specific detection and localization of microsporidian parasites in invertebrate hosts by using in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n. 1, p. 385–388, 2013.

FARAWAY, J. **Extending the Linear Model with R: Generalized Linear, Mixed Effects and Nonparametric Regression Models**. 1. ed. New York: CRC Press, 2017. 312p.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt: Experimental Designs pacakge (Portuguese)**. R package version 1.2.0. 2018. Disponível em: < <https://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes.pt/ExpDes.pt.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2018.

HIVIZI, C. L. et al. Controle de qualidade do parasitoide *Cotesia flavipes*. In: BUENO, V. H. P. (Ed.). **Controle Biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2009. cap. 13, p. 371–379.

HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P. Simultaneous inference in general parametric models. **Biometrical Journal**, Weinheim, v. 50, n. 3, p. 346–363, 2017.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics Applications Note**, Oxford v. 17, n. 8, p. 754–755, 2001.

KERMANI, N. et al. Parasitism performance and fitness of *Cotesia vestalis* (Hymenoptera: Braconidae) infected with *Nosema sp.* (Microsporidia: Nosematidae): implications in integrated pest management strategy. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 6, p. 1–9, 2014.

KING, E.G.; HARTLEY, G.G. *Diatraea saccharalis*. In: SINGH, P.; MOORE, R.F. **Handbook of insect rearing**. 1. ed. New York, Elsevier, p. 265-270, 1985.

LEPPLA, N. C. Aspects of total quality control for the production of natural enemies. In: LENTEREN, J. C. VAN (Ed.). **Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures**. 1. ed. Wallingford: CABI Publi, 2003. cap. 2, p. 19–24.

MACKAUER, M. Genetic aspects of insect production. **Entomophaga**, Dordrecht, v. 17, n. 1, p. 27–48, 1972.

MOORE, D. F. **Applied Survival Analysis Using R**. 1. ed. Cham: Springer International Publishing, 2016. 226p.

PARRA, J. R. P. Biological control in Brazil: An overview I. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 71, n. 5, p. 420–429, 2014.

POHLERT, T. **The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR)**. R package version 4.3. 2014. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=PMCMR>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

PREZOTTI, L. et al. Teste de voo como critério de avaliação da qualidade de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae): adaptação de metodologia. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 411–417, 2002.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing. 2008. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso: Acesso em: 10 jun. 2018.

SCHÜTTE, C.; DICKE, M. Verified and potential pathogens of predatory mites (Acari: Phytoseiidae). **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam v. 46, n. 1–4, p. 307–328, 2008.

SIMÕES, R. A. et al. Biological and behavioral parameters of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) are altered by the pathogen *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae). **Biological Control**, San Diego, v. 63, n. 2, p. 164–171, 2012.

SIMÕES, R. A. et al. Impacts of *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae) on the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v.129, n.1, p. 7–12, 2015.

TAY, W. T.; O'MAHONY, E. M.; PAXTON, R. J. Complete rRNA gene sequences reveal that the microsporidium *Nosema bombi* infects diverse bumblebee (*Bombus* spp.) hosts and contains multiple polymorphic sites. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Cincinnati, v. 52, n. 6, p. 505–513, nov. 2005.

THERNEAU, T. M. **A Package for Survival Analysis in S**. R package version 2.38. 2015. Disponível em:<<https://cran.r-project.org/package=survival>>. Acesso: Acesso em: 10 jun. 2018.

TREVISAN, M. et al. Quality of the exotic parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) does not show deleterious effects after inbreeding for 10 generations. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 8, p. 1–15, 2016.

TSAI, S. J. et al. The characterization of microsporidian isolates (Nosematidae: *Nosema*) from five important lepidopteran pests in Taiwan. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 83, n. 1, p. 51–59, 2003.

VACARI, A. M. et al. Fonte proteica na criação de *Diatraea saccharalis* e seu reflexo na produção e no controle de qualidade de *Cotesia flavipes*. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 3, p. 355–361, 2012a.

VACARI, A. M. et al. Quality of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) reared at different host densities and the estimated cost of its commercial production. **Biological Control**, San Diego, v. 63, n. 2, p. 102–106, 2012b.

VEIGA, A. C. P. et al. Quality control of *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) from different Brazilian bio-factories. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 23, n. 6, p. 665–673, 2013.

VOLPE, H. X. L. et al. Determination of method to evaluate parasitism and cover area for studies on *Cotesia flavipes* in sugarcane. **African Journal of Agricultural**, Nairóbi, v. 9, n. 4, p. 436–447, 2014.

VOSSBRINCK, C. R. et al. Ribosomal DNA sequences of *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon cuniculi*: species identification and phylogenetic construction. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Cincinnati, v. 40, n. 3, p. 354–362, 1993.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis (5th Edition)**. 5. ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall/Pearson, 2010. 960p.

CAPÍTULO 3

Infecção de parasitas do clado *Nosema/Vairimorpha* (Microsporidia) em parasitoides pupais

Título curto: Infecção de parasitas em parasitoides pupais

João Paulo Pereira Paes^{1*}; Vanessa Rafaela de Carvalho²; Amanda Rodrigues de Souza³; Carlos Frederico Wilcken³; Regiane Cristina Oliveira de Freitas Bueno¹

¹Grupo de Pesquisas em Manejo Integrado de Pragas na Agricultura, Faculdade de Ciências Agronômicas - Universidade Estadual Paulista (UNESP), R. José Barbosa de Barros, 1780, Fazenda Lageado, 18610-307, Botucatu, SP, Brasil.

²Laboratório de Genômica Funcional & Microbiologia de Vetores, Instituto de Biotecnologia - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Alameda das Tecomarias, S/N, Capão Bonito, 18607-440, Botucatu, SP, Brasil.

³Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais, Faculdade de Ciências Agronômicas - Universidade Estadual Paulista (UNESP), R. José Barbosa de Barros, 1780, Fazenda Lageado, 18610-307, Botucatu, SP, Brasil.

***Autor correspondente:** João Paulo P. Paes. E-mail: joaopauloppaes@hotmail.com

Resumo

Os parasitoides de pupa *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* são inimigos naturais com potencial para suprimir populações de diversas famílias de lepidópteros-pragas. O sucesso na utilização desses inimigos naturais no campo está diretamente relacionado à capacidade de busca do hospedeiro, essa capacidade pode ser afetada pela presença dos patógenos. Nesse contexto, o objetivo do ensaio foi detectar a presença de parasitas intracelulares. Esses patógenos podem causar alterações morfológicas e comportamentais como aumento do tempo necessário para completar as fases larval e pupal, reduzir a longevidade dos adultos, a diminuição da taxa de emergência e fertilidade, o estresse energético e a alteração do comportamento de busca. A detecção foi verificada e confirmada pela amplificação da região (SSU) do RNA ribossomal utilizando primers universais para microsporídia. Os produtos de PCR purificados foram submetidos a sequenciamento, e as sequências obtidas foram

aliadas com as sequências do banco de dados Genbank. Dessa forma, foi possível confirmar a presença de parasitas intracelulares em *T. diatraeae*, *P. elaeisis* e *D. saccharalis* pertencentes ao clado *Nosema* sp./*Vairimorpha* sp., sendo, este o primeiro relato sobre a detecção dos microsporídios nos parasitoides de pupa.

Palavras-chave: Controle biológico, microsporídio, parasitoide de pupa, PCR.

Abstract

Pupal Parasitoids of *Trichospilus diatraeae* and *Palmistichus elaeisis* are generalist natural enemies with potential to suppress populations of diverse families of lepidopteran-pests. The success in the utilization of these natural enemies in the field is directly related to the capacity of search of the host, this capacity might be affected by the presence of the pathogens. In this context, the aim of this essay was to detect the presence of intracellular parasites of Phylum Microsporidia. These pathogens may cause morphological and behavioral alterations with the increase of time required to complete the larval and pupal stages, to reduce the longevity of adults, diminution of emergency and fertility rate, energetic stress and alteration of search behavior. The presence of infection was verified by microscopy and was confirmed by amplification of region small subunit (SSU) of ribosomal RNA using universal primers for microsporidia of *Nosema* sp.. The purified PCR products were submitted to sequencing, and the sequences that had been obtained were edited and aligned with the sequences in a Genbank database. In this way, it was possible to confirm the presence of intracellular parasites in *T. diatraeae*, *P. elaeisis* and *D. saccharalis* belonging to the clade *Nosema* sp./*Vairimorpha* sp., being the first report on the detection of microsporids in the pupa parasitoids.

Keywords: Biological control, microsporidium, pupal parasitoids, PCR.

3.1 INTRODUÇÃO

Os parasitoides de pupas *Trichospilus diatraeae* (Cherian & Margabandhu) e *Palmistichus elaeisis* (Delvare & LaSalle) (Hymenoptera: Eulophidae) são inimigos naturais que podem suprimir populações de diversas famílias de lepidópteros-praga de culturas agrícolas (Paron and Berti-filho 2000) e florestais (Pereira et al. 2011). Por serem generalistas, esses inimigos naturais tem potencial de serem utilizados em diversos programas de controle biológico (Rodrigues et al. 2013; Pereira et al. 2011; Paron and Berti-filho 2000).

A utilização efetiva dos inimigos naturais em liberações inundativas depende da seleção do hospedeiro alternativo que seja fisiologicamente adequado para produção massal (Vinson and Iwantsch 1980). O hospedeiro deve ter alta qualidade nutricional e ser produzido com facilidade, de maneira eficiente e econômica (Parra et al. 2002). A broca-da-cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) destaca-se como hospedeiro nutricionalmente adequado para multiplicação de parasitoides (Rodrigues et al. 2013). No entanto, atualmente há a preocupação com a qualidade dos parasitoides *T. diatraeae* e *P. elaeisis* produzidos massalmente devido à presença de patógenos.

A ocorrência de microsporídios nas populações de *D. saccharalis* (Simões et al. 2015) pode se tornar um problema na produção massal de *T. diatraeae* e *P. elaeisis*. Esses microsporídeos são fungos parasitas intracelulares obrigatórios (Corradi and Keeling 2009). Os esporos são metabolicamente inativos e, ao serem ingeridos, germinam no lúmen do intestino médio dos insetos, injetando o aparelho infeccioso, composto de um tubo polar que penetra na membrana celular e permite que o esporoplasma seja transferido ao hospedeiro (Bigliardi and Sacchi 2001). Na célula hospedeira, os microsporídios exploram o organismo para se multiplicar, utilizando organelas e produtos metabólitos como substrato para completar o ciclo (Dean et al. 2016). Após a multiplicação, novos esporos de resistência são formados e liberados por meio da lise celular e excretados nas fezes dos insetos (Gisder et al. 2011).

Os parasitas exploram e frequentemente manipulam o hospedeiro induzindo alterações morfológicas e comportamentais para aumentar o sucesso de transmissão (Kurze et al. 2016a). Populações infectadas comumente apresentam aumento do tempo necessário para completar os estágios larval e pupal (Simões et al. 2012; Kermani et al. 2014), redução da longevidade dos adultos (Simões et al. 2012),

diminuição da taxa de emergência e fecundidade (Kermani et al. 2014), modificações comportamentais de busca de hospedeiro (Kermani et al. 2014; Simões et al. 2012), desenvolvimento de diarreia e tamanho anormal do abdômen dos adultos (Simões et al. 2015), estresse energético (Kurze et al. 2016b). Em colmeias de abelhas causa redução da produção de mel (Higes et al. 2008) e colapso das colônias de abelhas (Huang et al., 2007). As doenças causadas por esses patógenos, além de afetar aspectos biológicos dos insetos, tornou-se um problema econômico (Aroee et al. 2017).

Diante da importância dos parasitoides *T. diatraeae* e *P. elaeisis* em programas de controle biológico aplicado de diversas pragas de importância agrícola e florestal, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença de microsporídeos pertencentes ao Clado *Nosema/Vairimorpha* nos parasitoides *T. diatraeae* e *P. elaeisis* e no hospedeiro *D. saccharalis*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Criação do hospedeiro e parasitoides

Lagartas e pupas do hospedeiro *D. saccharalis* foram obtidas de criação massal de biofábrica. Os parasitoides *T. diatraeae* e *P. elaeisis* e o hospedeiro *D. saccharalis* foram mantidos na criação estoque do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF) da Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista (FCA/UNESP).

Pupas de *D. saccharalis* foram transferidas para gaiolas de PVC (20 cm diâmetro por 20 cm altura), fechadas com tela no fundo e com tecido *voile* na parte superior. O interior dessas gaiolas foi revestido com papel sulfite, como substrato para oviposição. Os ovos coletados foram esterilizados com formol (0,5%) e sulfato de cobre (17%) e inoculados em tubos de fundo chato (2cm x 8 cm), contendo dieta artificial proposta por King & Hartley (1985). Em cada tubo foram colocadas 4-7 lagartas até atingirem terceiro ínstar. Nesta fase, as lagartas foram realimentadas com 1 cm³ de dieta artificial e acondicionadas em recipiente plástico (1,5 cm x 5 cm) até atingirem a fase de pupa (Fonseca et al. 2015)

Os parasitoides foram criados em pupas de *D. saccharalis* com idade de 48 a 72 horas. As pupas do hospedeiro foram oferecidas aos himenópteros em tubos de vidro

(2,5 cm de diâmetro e 8,5 cm de comprimento) vedados com tecido tipo *voile* e alimentados com mel puro, para a realização de parasitismo em até 72 horas. Esses insetos foram acondicionados em câmara climatizada a 25 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas até emergência dos adultos que ocorre em torno do 15º ao 18º dia (Zaché et al. 2010).

3.2.2 Preparação de esfregaços

Lagartas sintomáticas de *D. saccharalis* de terceiro ínstar e adultos de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* foram empregadas na confecção de esfregaços para identificação de esporos de microsporídeos. Os insetos foram mortos por congelamento e, posteriormente, foi realizado um corte transversal com bisturi no abdômen dos mesmos. O extravasamento do conteúdo intestinal foi colocado sobre uma lâmina de vidro e adicionado uma gota de solução salina (0,85% NaCl). A maceração das lagartas foi realizada sobre uma lâmina microscópica e o excesso do conteúdo corporal dos insetos foi retirado com uma pinça. As lâminas foram fixadas em metanol por dez minutos e, em seguida, secas ao ar. A coloração dos esporos foi realizada com solução de Giemsa diluída a 50% durante 30 minutos (Bjørnson 2008). As lâminas foram lavadas em água corrente para retirar o excesso do corante e secas ao ar. Os esfregaços foram visualizados com microscópio de contraste de fase na objetiva de 1000 x (Zeiss Primo Star) (Alves et al. 1998).

3.2.3 Extração de DNA genômico

As amostras de *D. saccharalis*, *T. diatraeae* e *P. elaeisis* foram obtidas da criação estoque para avaliação da presença de esporos de *Nosema* spp. Os adultos de *P. elaeisis*, *T. diatraeae* e a lagarta de terceiro ínstar *D. saccharalis* foram estocados no congelador a -20 °C. Após o descongelamento, 50 parasitoides adultos de cada espécie e uma lagarta de *D. saccharalis* foram separados para maceração e extração do DNA. Em cada amostra foram acrescentados 80 µL de solução de Chelex a 10% e 8 µL de proteinase K a 20 mg/mL em microtubo, posteriormente, a amostra foi colocada em bloco térmico a 95 °C por 20 minutos. Para a extração de DNA foi utilizado a resina Chelex 100® (Coombs et al. 1999). Em seguida, o sobrenadante foi coletado para a realização de reações de polimerase em cadeia (PCR).

3.2.4 PCR

A região small subunit (SSU) do RNA ribossômico foi amplificada utilizando-se iniciadores (primers) universais para microsporídeos de *Nosema* sp., (F) CACCAGGTTGATTCTGCC e (R) TTATGATCCTGCTAATGGTTC, tamanho esperado de 222pb (Vossbrinck et al.,1993).

A reação de PCR foi preparada contendo 12,5 µL de Gotaq Hot Start (Promega), com os reagentes necessários para a reação: 5 U/µL Taq, 100 µM de cada dNTP e 25 mM MgCl₂, 5 µL de Nuclease Free Water (Promega), 1,25 µL de cada primer [10 mM] e 5 µL de DNA genômico, totalizando 25 µL por reação. A reação de cadeia de polimerase (PCR) foi conduzida em termociclador INFINIGEN (modelo TC-96CG) com a desnaturação inicial por 4 minutos a 95 °C, seguida por 45 ciclos com desnaturação a 95 °C por 1 minuto, seguida pela fase de anelamento a 48 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto e com uma fase final de polimento por 4 minutos a 72 °C (Tay et al. 2005).

Os produtos da amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando marcador de 100 pb (Norgen). O gel de agarose foi visualizado e fotografado em transiluminador de luz ultravioleta (Major Science).

3.2.5 Sequenciamento

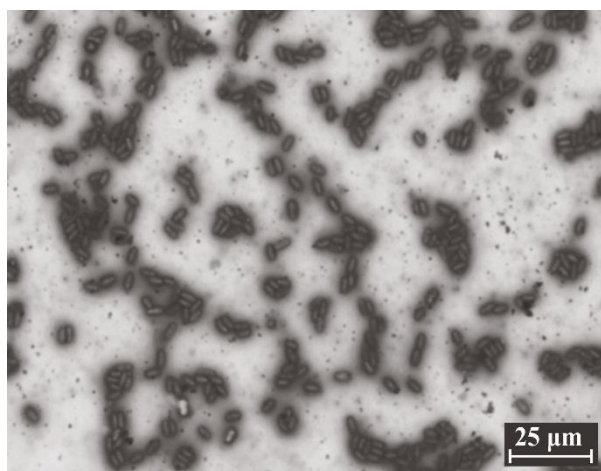
A purificação do produto de PCR foi realizada utilizando o Norgen PCR Purification Kit (Qiagen, Cat#14400), seguindo as recomendações do fabricante. O sequenciamento por sequenciador automático de DNA Sanger (Modelo: ABI 3500 - Applied Biosystems) foi realizado no Instituto de Biotecnologia (IBTEC - UNESP). As sequências obtidas de SSU rRNA referente ao patógeno isolado de *D. saccharalis* e parasitoides foram alinhadas utilizando o programa Genious e comparadas ao banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a identificação de similaridade genética.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Microsporídeos infectam vertebrados e invertebrados, incluindo insetos, peixes e mamíferos (Weiss, 2001; Morsy et al., 2013; Liu et al., 2015). A presença desses patógenos tem sido amplamente discutida devido ao aumento da infecção em vários hospedeiros (Emsen et al., 2016), fato resultante das alterações biológicas e comportamentais causadas pelo parasita (Simões et al., 2012; Kermani et al., 2014; Kurze et al., 2016b).

Neste estudo, esporos de forma oval, estrutura de resistência de parasitas intracelulares foram isolados a partir do conteúdo intestinal de larvas de *D. saccharalis* (Fig. 1). Nas lâminas dos conteúdos corporais dos parasitoides *T. diatraeae* e *P. elaeisis* foi observado esporos do patógeno. Isto possivelmente se deve ao menor grau de infecção do patógeno nos parasitoides (Bjørnson 2008) e/ou ao estágio de desenvolvimento do microsporídeos na célula hospedeira (Becnel et al., 2002).

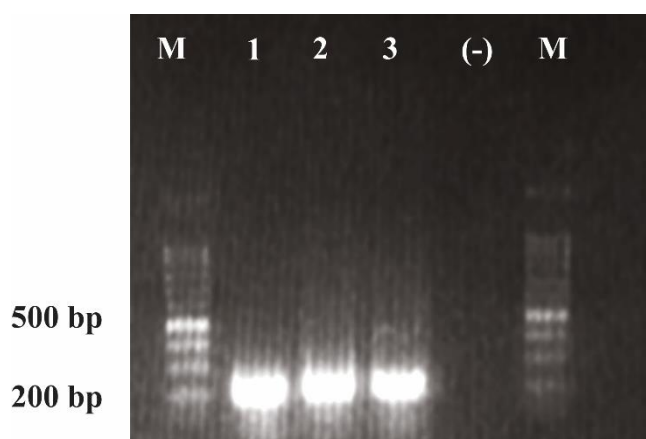
Figura 1 - Imagem do esfregaço corado com Giemsa. Esporos do Clado *Nosema/Vairimorpha* isolados do conteúdo intestinal de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) visualizadas em microscópio de contraste de fase (1000x). Barra de escala = 25 μ m



A microscopia é uma técnica barata e rotineira para avaliar a presença de microsporídeos, entretanto, pode ser trabalhosa e requer conhecimento para detectar os esporos. Além disso, o patógeno pode estar presente em apenas alguns indivíduos quando a prevalência for baixa, fato que dificulta o diagnóstico da infecção (Bjørnson 2008). Apesar de ser considerada confiável para detecção não é suficiente para uma identificação precisa desses parasitas, pois as estruturas morfológicas de alguns patógenos são muito semelhantes, resultando em um alto risco de erros na diagnose (Ansari et al., 2017).

A reação de PCR revelou por meio da amplificação de RNA ribossômico de microsporídeos que as populações do hospedeiro *D. saccharalis* e dos parasitoides *T. diatraeae* e *P. elaeisis* estão infectadas por parasitas intracelulares (Fig. 2). A sequência de rRNA SSR tem sido amplamente utilizada como um marcador molecular para estimar as relações filogenéticas entre os microsporídios por meio de um gene altamente conservado. No entanto, este gene não pode ser usado para distinguir espécies estreitamente relacionadas (Canning et al., 1999; Tsai et al., 2003).

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose (1%) da amplificação dos produtos de PCR da região small subunit (SSU) do RNA ribossômico para identificação de microsporídeos. Coluna M: Marcador de DNA de 100 pb. Colunas 1-3. Amostras positivas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae), *Trichospilus diatraeae* (Cherian & Margabandhu) e *Palmistichus elaeisis* (Delvare & LaSalle) (Hymenoptera: Eulophidae). Coluna (-). Controle negativo, sem amplificação



Os resultados sugerem que os isolados estão intimamente relacionados com as espécies de *Vairimorpha* sp. (GenBank JQ083083.1), com o qual compartilha 100% de identidade do gene SSR rRNA (222 pb) dessas sequências no Nucleotide BLAST, e as espécies do gênero *Vairimorpha* formam um clado com *Nosema* spp. No entanto, os gêneros *Nosema* e *Vairimorpha* não podem ser separados em diferentes clados usando análises moleculares (Tsai et al., 2003; Ku et al., 2007).

A ocorrência de microsporídeos nas populações de *D. saccharalis* e nos parasitoides *T. diatraeae* e *P. elaeisis* pode se tornar um problema na produção em massa e em programas de controle biológico. Patógenos deste grupo podem permanecer de forma latente sem causar sintomas visíveis nos hospedeiros (Bjørnson, 2008). Esse quadro pode se perpetuar durante várias gerações graças a possibilidade de transmissão vertical, quando infecção é transmitida dos pais para os

descendentes e horizontal quando ocorre pelo contato entre indivíduos, que pode ser favorecido pelo ambiente de confinamento das criações massais (Dubuffet et al., 2013).

Parasitoides multiplicados de forma massal, geralmente são contaminados quando as larvas se alimentam da hemolinfa ou de tecidos infectados, resultando em uma variedade alterações. Dependendo do grau de infecção nas populações de inimigos naturais, podem ocorrer alterações na duração da fase jovem, redução da sobrevivência, alteração do comportamento de voo e de busca do hospedeiro. Tais sintomas foram relatados em *C. flavipes* (Simões et al., 2012), *Cotesia vestalis* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae), *Macrocentrus grandii* Goidanich (Hymenoptera: Braconidae) (Kermani et al., 2014), *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) (Bjørnson & Keddie, 1999) e *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) (Bjørnson et al., 2013).

Assim, verifica-se a necessidade de investigação detalhada da interação entre a infecção por esse microsporídeos nos hospedeiros *D. saccharalis* e parasitoides de pupa *T. diatraeae* e *P. elaeisis*, para verificar a qualidade e melhorar a compreensão do real impacto desse parasita na biologia e no comportamento de busca do hospedeiro em campo.

3.4 REFERÊNCIAS

- ALVES SB, ALMEIDA JEM, MOINO JÚNIOR A AND ALVES LFA. 1998. Técnicas de laboratório. In: ALVES SB. (Ed.), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba: Fealq, p. 637–712.
- ANSARI MJ, AL-GHAMDI A, ADGABA N, KHAN KA AND ALATTAL, Y. 2017. Geographical distribution and molecular detection of *Nosema ceranae* from indigenous honey bees of Saudi Arabia. Saudi J Biol Sci 24: 983–991.
- AROOEE F, AZIZI H, SHIRAN B AND PIRALI KHEIRABADI K. 2017. Molecular identification of *Nosema* species in provinces of Fars, Chaharmahal and Bakhtiari and Isfahan (Southwestern Iran). Asian Pac J Trop Biomed 7: 10-13.
- BIGLIARDI E AND SACCHI L, 2001. Cell biology and invasion of the microsporidia. Microbes Infect 3: 373–379.
- BJØRNSEN S. 2008. Natural enemies of mass-reared predatory mites (family Phytoseiidae) used for biological pest control. Exp Appl Acarol 46: 299-306.

- BJØRNSON S AND KEDDIE B. 1999. Effects of *Microsporidium phytoseiuli* (Microsporidia) on the performance of the predatory mite, *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). *Biol Control* 15: 153–161.
- BJØRNSON S, STEELE T, HU Q, ELLIS B. AND SAITO T. 2013. Ultrastructure and molecular characterization of the microsporidium, *Nosema chrysoperlae* sp. nov., from the green lacewing, *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) used for biological pest control. *J Invertebr Pathol* 114: 53–60.
- CANNING EU, CURRY A, CHENEY S, LAFRANCHI-TRISTEM NJ AND HAQUE MA, 1999. *Vairimorpha imperfecta* n.sp., a microsporidian exhibiting an abortive octosporous sporogony in *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Parasitology* 119: 273–86.
- COOMBS NJ, GOUGH AC AND PRIMROSE JN. 1999. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res* 27: 1-3.
- CORRADI N AND KEELING PJ, 2009. Microsporidia : a journey through radical taxonomical revisions. *Fungal Biol Rev* 23: 1–8.
- DEAN P, HIRT RP AND EMBLEY, TM. 2016. Microsporidia: Why Make Nucleotides if You Can Steal Them? *PLoS Pathog* 12: 1-13.
- DUBUFFET A, SMITH JE, SOLTER L, PEROTTI MA, BRAIG HR AND DUNN, M. 2013. Specific detection and localization of microsporidian parasites in invertebrate hosts by using in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 79: 385–388.
- EMSEN B, GUZMAN-NOVOA E, HAMIDUZZAMAN MM, ECCLES L, LACEY B, RUIZ-PÉREZ RA AND NASR M. 2016. Higher prevalence and levels of *Nosema ceranae* than *Nosema apis* infections in Canadian honey bee colonies. *Parasitol Res* 115: 175–181.
- FONSECA APP, MARQUES EJ, TORRES JB, SILVA LM AND SIQUEIRA HAA. 2015. Lethal and sublethal effects of lufenuron on sugarcane borer *Diatraea flavipennella* and its parasitoid *Cotesia flavipes*. *Ecotoxicology* 24: 1869–1879.
- GISDER S, MOCKEL N, LINDE A AND GENERSCH E. 2011. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environ Microbiol* 13: 404–413.
- HIGES M, MARTÍN-HERNÁNDEZ R, BOTÍAS C, BAILÓN EG, GONZÁLEZ-PORTO AV, BARRIOS L, DEL NOZAL MJ, BERNAL JL, JIMÉNEZ JJ, PALENCIA PG

- AND MEANA A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol* 10: 2659-2669.
- HUANG WF, JIANG JH, CHEN YW AND WANG CH. 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38: 30–37.
- KERMANI N, ABU HASSAN ZA, SUHAIMI A, ABUZID I, ISMAIL NF, ATTIA M AND GHANI IA. 2014. Parasitism performance and fitness of *Cotesia vestalis* (Hymenoptera: Braconidae) infected with *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae): implications in integrated pest management Strategy. *PLoS One* 9: 1–9.
- KING EG AND HARTLEY GG. 1985. *Diatraea saccharalis*. In: SINGH P AND MOORE RF (Eds.), *Handbook of insect rearing*. New York: Elsevier, p. 265-270.
- KU CT, WANG CY, TSAI YC, TZENG CC AND WANG CH. 2007. Phylogenetic analysis of two putative *Nosema* isolates from Cruciferous Lepidopteran pests in Taiwan. *J Invertebr Pathol* 95: 71-76.
- KURZE C, DOSSELLI R, GRASSL J, LE Y, KRYGER P, BAER B AND MORITZ RFA. 2016a. Differential proteomics reveals novel insights into *Nosema* e honey bee interactions. *Insect Biochem Mol Biol* 79: 42-49.
- KURZE C, MAYACK C, HIRCHE F, STANGL GI, LE CONTE Y, KRYGER P AND MORITZ RFA. 2016b. *Nosema* spp. infections cause no energetic stress in tolerant honeybees. *Parasitol Res* 115: 2381-2388.
- LIU H, DING S, QIN Q, TANG J, LIU L AND PENG H. 2015. Morphological and phylogenetic analysis of *Nosema* sp . HR (Microsporidia;Nosematidae): a new microsporidian pathogen of *Histia rhodope* Cramer (Lepidoptera; Zygaenidae). *Parasitol Res* 114: 983–988.
- MORSY K, BASHTAR AR, ABDEL-GHAFFAR F AND AL-QURAIHY S. 2013. Morphological and phylogenetic description of a new xenoma-inducing microsporidian, *Microsporidium aurata* nov. sp., parasite of the gilthead seabream *Sparus aurata* from the Red Sea. *Parasitol Res* 112: 3905–3915.
- PARON MR AND BERTI-FILHO E. 2000. Capacidade reprodutiva de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de diferentes hospedeiros (Lepidoptera). *Scientia* 57, 355–358.
- PEREIRA FF, ZANUNCIO JC, OLIVEIRA HN, GRANCE ELV, PASTORI PL AND GAVA-OLIVEIRA MD. 2011. Thermal requirements and estimate number of generations of *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) in different

- Eucalyptus plantations regions. Braz J Biol 71: 431–436.
- RODRIGUES MAT, PEREIRA FF, KASSAB SO, PASTORI PL, GLAESER DF, OLIVEIRA HN de AND ZANUNCIO JC. 2013. Thermal requirements and generation estimates of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) in sugarcane producing regions of Brazil. Florida Entomol 96: 154-159.
- SIMÕES RA, FELICIANO JR, SOLTER LF AND DELALIBERA I. 2015. Impacts of *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae) on the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). J Invertebr Pathol 129: 7-12.
- SIMÕES RA, REIS LG, BENTO JMS, SOLTER LF AND DELALIBERA I. 2012. Biological and behavioral parameters of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) are altered by the pathogen *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae). Biol Control 63: 164-171.
- TAY WT, O'MAHONY EM AND PAXTON RJ. 2005. Complete rRNA gene sequences reveal that the microsporidium *Nosema bombi* infects diverse bumblebee (*Bombus* spp.) hosts and contains multiple polymorphic sites. J Eukaryot Microbiol 52: 505–513.
- TLAK GAJGER I, VUGREK O, GRILEC D AND PETRINEC Z. 2010. Prevalence and distribution of *Nosema ceranae* in Croatian honeybee colonies. Vet Med (Praha) 55: 457–462.
- TSAI SJ, LO CF, SOICHI Y AND WANG CH. 2003. The characterization of microsporidian isolates (Nosematidae: Nosema) from five important lepidopteran pests in Taiwan. J Invertebr Pathol 83: 51–59.
- VINSON SB AND IWANTCH GF. 1980. Host suitability for insect parasitoids. Annu Rev Entomol 25: 397–419.
- VOSSBRINCK CR, BAKER MD, DIDIER ES, DEBRUNNER-VOSSBRINCK BA AND SHADDUCK JA. 1993. Ribosomal DNA sequences of *Encephalitozoon Hellem* and *Encephalitozoon Cuniculi*: Species Identification and Phylogenetic Construction. J Eukaryot Microbiol 40: 354–362.
- WEISS LM. 2001. Microsporidia 2001: Cincinnati. Eukaryot Microbiol 48: 47–49.
- ZACHÉ B, WILCKEN CF, DACOSTA RR AND SOLIMAN EP. 2010. *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae), a new parasitoid of *Melanolophia consimilaria* (Lepidoptera: Geometridae). Phytoparasitica 38: 355–357.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As alterações nas características biológicas de populações de *C. flavipes* oriundas de biofábricas do estado de São Paulo, podem influenciar o desempenho dos inimigos naturais em campo, devido à alta proporção de machos nas populações B e D e ao curto tempo de sobrevivência de parasitoides fêmeas das biofábricas B e C.

As populações de *C. flavipes* de São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Alagoas apresentam características biológicas que podem ser reflexo das condições de multiplicação utilizadas durante o experimento.

A predominância de parasitoides caminhantes em todas as populações de *C. flavipes* podem afetar negativamente a dispersão do inimigo natural.

A presença de parasitas intracelulares do clado *Nosema* sp./*Vairimorpha* sp. no parasitoide larval *C. flavipes* e nos parasitoides de pupa *T. diatraeae* e *P. elaeisis*, indica a necessidade de aprimoramento das técnicas de detecção e mitigação do patógeno nas criações massais desses parasitoides.

A análise filogenética sugere que os parasitas presentes em *C. flavipes* pertencem ao mesmo grupo taxonômico e possuem uma baixa diversidade genética.

Dessa forma, a manutenção da eficiência do controle biológico da broca-da-cana *D. saccharalis* e sucesso dos parasitoides *T. diatraeae* e *P. elaeisis*, dependerá de mais estudos sobre o real impacto de parasitas intracelulares e da melhoria dos protocolos de controle de qualidade empregados atualmente.

REFERÊNCIAS

BIGLIARDI, E.; SACCHI, L. Cell biology and invasion of the microsporidia. **Microbes Infect.**, v. 3, p. 373–379, 2001.

BJØRNSEN, S.; SCHÜTTE, C. Pathogens of mass-produced natural enemies and pollinators. In: LENTEREN J.C. van (Ed.). **Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures**. Wallingford: CABI publishing, 2003. p. 133-165.

BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; FERREIRA, B.S.C.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle Biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 477-494.

BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P.; CHAGAS NETO, J.F.; OLIVEIRA, C.P.B. Associação do parasitoide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do parasitoide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) no controle de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, n. 3, p. 491-496, 1999.

CANAOSTE. **Pragas da cana**. Sertãozinho, 06 jun. 2013. Disponível em: <<http://www.canaoeste.com.br/conteudo/pragas-na-cana>>. Acesso em: 16 out. 2017.

CHICHERA, R.A.; PEREIRA, F.F.; KASSAB, S.O.; BARBOSA, R.H.; PASTORI, P.L.; ROSSONI, C. Capacidade de busca e reprodução de *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Interciencia**, v. 37, n. 11, p. 852-856, 2012.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Cana-de-açúcar, Safra 2017/2018, primeiro levantamento, abril/2017**. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2017, 62 p.

CORRADI, N.; KEELING, P.J. Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, n. 1-2, p. 1-8, 2009.

DEAN, P.; HIRT, R.P.; EMBLEY, T.M. Microsporidia: Why Make Nucleotides if You Can Steal Them? **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 11, p. 1-13, 2016.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Pragas. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. p. 349-404.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; FRACASSO, J.V.; COSTA, V.P. da; ANJOS, I.A. dos; LOPES, D.O.P. Reação de cultivares de cana-de-açúcar à broca do colmo. **Bragantia**, v. 72, n.1, p. 29-34, 2013.

FONSECA, F.C.A.; FIRMINO, A.A.P.; MACEDO, L.L.P.; COELHO, R.R.; SOUSA JÚNIOR, J.D.A.; SILVA-JUNIOR, O.B.; TOGAWA, R.C.; PAPPAS JUNIOR; G.J., GÓIS, L.A.B.; SILVA, M.C.M.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Sugarcane giant borer transcriptome analysis and identification of genes related to digestion. **Plos One**, v. 10, n. 2, p. 1-11, 2015.

GISDER, S.; MOCKEL, N.; LINDE, A.; GENERSCH, E. 2011. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 404–413, 2011.

HIVIZI, C.L.; BUENO, V.H.P.; SILVA, A.C.; CARVALHO, L.M. Controle de qualidade do parasitoide *Cotesia flavipes*. In: BUENO V.H.P. (Ed.). **Controle Biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: UFLA. 2009. p. 371–379.

KERMANI, N.; ABU HASSAN, Z.A.; SUHAIMI, A.; ABUZID, I.; ISMAIL, N.F.; ATTIA, M.; GHANI, I.A. Parasitism performance and fitness of *Cotesia vestalis* (Hymenoptera: Braconidae) infected with *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae): Implications in integrated pest management strategy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1-9, 2014.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos avançados**, v. 24, n.68, p. 223-253, 2010.

KURZE, C.; MAYACK, C.; HIRCHE, F.; STANGL, G.I.; LE CONTE, Y.; KRYGER, P.; MORITZ, R.F.A. *Nosema* spp. infections cause no energetic stress in tolerant honeybees. **Parasitology Research**, v. 115, n. 6, p. 2381–2388, 2016.

LENTEREN J. C. van. **IOBC Internet Book of Biological Control**. Wageningen: International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants, v. 6, 2012, 182 p.

LEPPLA, N.C. Aspects of Total Quality Control for the Production of Natural Enemies. In: LENTEREN J.C. van (Ed.). **Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures**. Wallingford: CABI publishing, 2003. p. 19-24.

PARON, M.R.; BERTI-FILHO, E. Capacidade reprodutiva de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de diferentes hospedeiros (Lepidoptera). **Scientia Agricola**, v. 57, p. 355–358, 2000.

PARRA, J.R.P. Biological control in Brazil: an overview. **Scientia Agricola**, v. 71, p. 420-429, 2014.

POLANCZYK, R.A.; ALMEIDA, L.C.; PADULLA, L.; ALVES, S.B. Pragas da cana-de-açúcar x métodos alternativos de controle. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p.14-17, 2004.

PREZOTTI, L.; PARRA, J.R.P.; VENCOVSKY, R.; DIAS, C.T.S.; CRUZ, I.; CHAGAS, M.C.M. Teste de voo como critério de avaliação da qualidade de *Trichogramma*

pretiosum Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae): adaptação de metodologia. **Neotropical Entomology**, v. 31, p. 411-417, 2002.

SIMÕES, R.A.; FELICIANO, J.R.; SOLTER, L.F.; DELALIBERA, I. Impacts of *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae) on the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.129, n. 1, p.7–12, 2015.

SIMÕES, R.A.; REIS, L.G.; BENTO, J.M.S.; SOLTER, L.F.; DELALIBERA, I. Biological and behavioral parameters of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) are altered by the pathogen *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae). **Biological Control**, v. 63, p.164–171. 2012.