

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**QUALIDADE DO PARASITOIDE *Cotesia flavipes* CAMERON,
1891 (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) PRODUZIDO POR
BIOFÁBRICAS DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

**Rafael Ferreira dos Santos
Biólogo**

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**QUALIDADE DO PARASITOIDE *Cotesia flavipes* CAMERON,
1891 (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) PRODUZIDO POR
BIOFÁBRICAS DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

Discente: Rafael Ferreira dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio De Bortoli

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias-
UNESP, Câmpus de Jaboticabal,
como parte das exigências para
obtenção do Título de Doutor em
Agronomia (Entomologia Agrícola)**

2018

S237q

Santos, Rafael Ferreira dos

Qualidade do parasitoide *Cotesia flavipes* Cameron, 1891
(Hymenoptera: Braconidae) produzido por biofábricas de diferentes
regiões do Brasil / Rafael Ferreira dos Santos. -- Jaboticabal, 2018
76 p. : il., tabs., fotos + 1 CD-ROM

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Sergio Antonio De Bortoli

1. broca da cana. 2. controle de qualidade. 3. dispersão do
parasitismo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

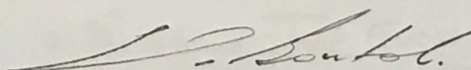
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: QUALIDADE DO PARASITÓIDE *Cotesia flavipes* CAMERON (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) PRODUZIDO POR BIOFÁBRICAS DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

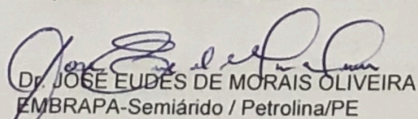
AUTOR: RAFAEL FERREIRA DOS SANTOS

ORIENTADOR: SERGIO ANTONIO DE BORTOLI

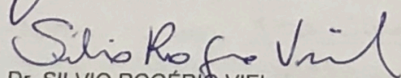
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:



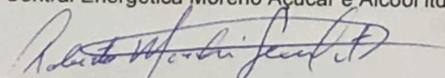
Prof. Dr. SERGIO ANTONIO DE BORTOLI
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



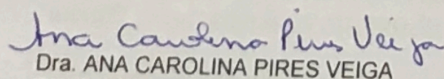
Dr. JOSÉ EUDES DE MORAIS OLIVEIRA
EMBRAPA-Semiárido / Petrolina/PE



Dr. SILVIO ROGÉRIO VIEL
Central Energética Moreno Açúcar e Álcool Ltda / Luiz Antonio/SP



Prof. Dr. ROBERTO MARCHI GOULART
SGS do Brasil Ltda / Piracicaba/SP



Dra. ANA CAROLINA PIRES VEIGA
FUNDECITRUS / Araraquara/SP

Jaboticabal, 17 de outubro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAFAEL FERREIRA DOS SANTOS, nascido no dia 26 de Novembro de 1985, na cidade de Jaboticabal, SP, é formado em Licenciatura Plena no curso de Ciências Biológicas da Faculdade de Ensino e Educação São Luís Jaboticabal, São Paulo. Durante o período de graduação realizou estágio científico no Laboratório de Biologia e Criação de Insetos, no Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP de Jaboticabal, SP, onde desenvolveu interesse pela Entomologia Agrícola e realizou experimentos com *Plutella xylostella*, resultando em um Trabalho de Conclusão de Curso (T.C.C.) com o título de “Biologia comparada de *Plutella xylostella* em Couve e Brócolis”. Na sequência da formação acadêmica iniciou o Curso de Mestrado Acadêmico no Programa de Pós-graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) da FCAV-UNESP, sendo que durante o mestrado desenvolveu pesquisa com *Cotesia flavipes*, inseto utilizado em programas de controle biológico de *Diatraea saccharalis*, principal praga da cana de açúcar no Brasil, com a pesquisa envolvendo o estudo de novas embalagens biodegradáveis para o transporte e liberação desse inseto, sem o impacto ambiental das embalagens convencionais não biodegradáveis, com o trabalho tendo como título “Desenvolvimento de nova embalagem para comercialização, transporte e liberação do parasitoide *C. flavipes*”. Após a conclusão do Mestrado, ingressou, em Março de 2015, no Curso de Doutorado do mesmo programa, onde atualmente está realizando pesquisa com *C. flavipes*, no intuito de avaliar a qualidade desse inseto, que é largamente produzido em vários Estados brasileiros. Durante o período de Mestrado e também Doutorado, participou de vários Congressos e Simpósios no

Brasil e também no exterior (Chile, Estados Unidos, Alemanha, França e Canadá), onde apresentou trabalhos relacionados com as pesquisas realizadas nos períodos de graduação, mestrado e doutorado.

“A man’s reach should exceed his grasp,
or what’s a heaven for?”

Robert Browning

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra a minha amada esposa Caroline Placidi De Bortoli, a todos os membros da minha Família, especialmente àqueles que não estão mais presentes para compartilhar desse feito, meus amigos e a todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a sua realização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a Deus, por me dar forças ao longo do caminho, pois muitas vezes me senti fraco diante dos obstáculos enfrentados, mas Ele, através de seus misteriosos caminhos, me mostrou sinais de que não podemos desistir daquilo que acreditamos. Também gostaria de agradecer minha Família, que é a base de tudo que eu acredito e admiro, especialmente aos meus Pais, Marcos Aurélio dos Santos e Maria de Nazareth Ferreira dos Santos, que através de seus feitos me mostraram que com fé e perseverança podemos alcançar grandes conquistas. A minha amada esposa, Caroline Placidi De Bortoli, por sempre acreditar na minha capacidade, mesmo quando, eu acreditava não ser capaz, sempre me apoiando com palavras de incentivo e também mostrando ser um exemplo de pessoa, me dando forças, nas horas mais difíceis, dessa minha jornada. Meus sinceros agradecimentos, ao meu Orientador, Professor e Doutor Sergio Antonio De Bortoli, que abriu as portas de seu laboratório e me incentivou a almejar grandes feitos, como os realizados por ele. Meus colegas e amigos de laboratório por me ajudarem e muitas vezes apoiarem com gestos simples, mas que significaram muito. Aos professores da Pós-graduação, do programa de Entomologia Agrícola, da UNESP Jaboticabal, que me ensinaram muitas coisas, que eu não imaginava que pudesse aprender. Agradeço também ao programa de pós-graduação, UNESP Jaboticabal, por ter me financiado com uma bolsa de estudos da CAPES. Agradeço também à CAPES, por disponibilizar bolsas de estudos para os alunos de Doutorado do programa de pós-graduação, da UNESP Jaboticabal SP. Aos funcionários da UNESP Jaboticabal pela convivência e pela dedicação no exercício de suas funções. Ao Professor Doutor Neil Crickmore, pela paciência e conhecimento compartilhado. Ao pesquisador Hayat Badash, por disponibilizar tempo para a coleta de *C. flavipes* no Paquistão. A todos os meus conhecidos que de forma direta e indireta sempre me desejaram o bem. Sou muito grato a todos, por fazerem parte da história da minha vida e ressaltando que esse feito não teria valor

algum senão pudesse ser compartilhado com todos vocês, ressaltando que ainda tenho muito que aprender, pois a vida que não cessa suas lições.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Histórico da cana-de-açúcar no Brasil.....	4
2.2. Aspectos morfológicos e biológicos de <i>Diatraea saccharalis</i>	6
2.3. A importância da broca, <i>Diatraea saccharalis</i> , na cana-de-açúcar.....	7
2.4. Controle de <i>Diatraea saccharalis</i>	8
2.5. Histórico de <i>Cotesia flavipes</i>	10
2.6. Aspectos morfológicos e biológicos de <i>Cotesia flavipes</i>	11
2.7. Inimigos naturais e controle biológico de pragas.....	13
2.8. Importância da criação massal de <i>Cotesia flavipes</i>	14
2.9. Controle de qualidade em criações massais de <i>Cotesia flavipes</i>	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Obtenção de <i>Cotesia flavipes</i>	17
3.2. Imagens e morfometria de <i>Cotesia flavipes</i>	17
3.3. Parâmetros biológicos de <i>Cotesia flavipes</i>	18
3.4. Testes de atividade de voo de <i>Cotesia flavipes</i>	19
3.5. Avaliação do parasitismo de <i>Cotesia flavipes</i> em campo.....	20
3.6. Análise do DNA de <i>Cotesia flavipes</i>	22
3.6.1. Coleta e preservação de <i>Cotesia flavipes</i> para a realização do sequenciamento do DNA mitocondrial.....	22
3.6.2. Condições para realização do PCR.....	22
3.6.3. Ajuste para uma ótima extração do DNA.....	23
3.6.4. Extração do DNA de <i>Cotesia flavipes</i>	24

3.6.5. Purificação do DNA.....	25
3.6.6. Sequenciamento do DNA purificado.....	26
3.7. BLAST/Análise filogenética.....	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Imagens e Morfometria de <i>Cotesia flavipes</i>	27
4.2. Parâmetros biológicos de <i>Cotesia flavipes</i>	35
4.3. Longevidade de adultos de <i>Cotesia flavipes</i>	40
4.4. Teste de voo de <i>Cotesia flavipes</i>	42
4.5. Avaliação do parasitismo de <i>Cotesia flavipes</i> em campo.....	44
4.6. Extração do DNA e condições para realização do PCR.....	51
4.7. Purificação do DNA.....	52
4.8. NBCI- BLAST / análise filogenética.....	53
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÃO.....	63
7. REFERÊNCIAS.....	64
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Sequência e volume inicial dos “primers” utilizados para a amplificação da região COI do DNA mitocondrial de <i>Cotesia flavipes</i>	23
Tabela 2 – Comprimento do corpo, comprimento e largura do tórax, comprimento da tíbia posterior direita, e comprimento e largura da asa anterior direita de machos de <i>Cotesia flavipes</i> produzidos nas diferentes biofábricas.....	31
Tabela 3 – Comprimento do corpo, comprimento e largura do tórax, comprimento da tíbia posterior direita, e comprimento e largura da asa anterior direita de fêmeas de <i>Cotesia flavipes</i> produzidas nas diferentes biofábricas.....	32
Tabela 4 – Largura dos três primeiros antenômeros (A1, A2 e A3) das antenas de machos de <i>Cotesia flavipes</i> produzidos nas diferentes biofábricas.....	32
Tabela 5 – Largura dos três primeiros antenômeros (A1, A2 e A3) das antenas de fêmeas de <i>Cotesia flavipes</i> produzidas nas diferentes biofábricas.....	33
Tabela 6 – Comprimento dos três primeiros antenômeros (A1, A2 e A3) das antenas de machos de <i>Cotesia flavipes</i> produzidos nas diferentes biofábricas.....	33
Tabela 7 – Comprimento dos três primeiros antenômeros (A1, A2 e A3) das antenas de fêmeas de <i>Cotesia flavipes</i> produzidas nas diferentes biofábricas.....	34
Tabela 8 – Comprimento e largura do escapo e do pedicelo das antenas de machos de <i>Cotesia flavipes</i> produzidos nas diferentes biofábricas.....	35
Tabela 9 – Comprimento e largura do escapo e do pedicelo das antenas de fêmeas de <i>Cotesia flavipes</i> produzidas nas diferentes biofábricas.....	35
Tabela 10 – Período de tempo desde a oviposição até a formação das massas de pupas de <i>Cotesia flavipes</i> produzidas nas diferentes biofábricas, valores médios de quatro remessas.....	36

Tabela 11 – Período de pupa até a emergência de adultos (pupal) de <i>Cotesia flavipes</i> produzidas nas diferentes biofábricas, valores médios de quatro remessas.....	37
Tabela 12 – Número de machos de <i>Cotesia flavipes</i> produzidos nas diferentes biofábricas, valores médios de quatro remessas.....	38
Tabela 13 – Número de fêmeas de <i>Cotesia flavipes</i> produzidas nas diferentes biofábricas, valores médios de quatro remessas.....	39
Tabela 14 – Número de pupas inviáveis de <i>Cotesia flavipes</i> produzidas nas diferentes biofábricas, valores médios de quatro remessas.....	40
Tabela 15 – Médias da razão sexual de <i>Cotesia flavipes</i> produzidas nas biofábricas, valores de quatro remessas.....	40
Tabela 16 – Longevidade, em horas, de fêmeas de <i>Cotesia flavipes</i> produzidas nas diferentes biofábricas.....	41
Tabela 17 – Longevidade, em horas, de machos de <i>Cotesia flavipes</i> produzidos nas diferentes biofábricas.....	42
Tabela 18 – Porcentagens de adultos voadores, caminhadores e não voadores de <i>Cotesia flavipes</i> produzidas nas diferentes biofábricas, na primeira remessa.....	43
Tabela 19 – Porcentagens de adultos voadores, caminhadores e não voadores de <i>Cotesia flavipes</i> produzidas nas diferentes biofábricas, na segunda remessa.....	43
Tabela 20 – Porcentagens de adultos voadores, caminhadores e não voadores de <i>Cotesia flavipes</i> produzidas nas diferentes biofábricas, na terceira remessa.....	44
Tabela 21 – Porcentagens de adultos voadores, caminhadores e não voadores de <i>Cotesia flavipes</i> produzidas nas diferentes biofábricas, na quarta remessa.....	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Gaiola utilizada para teste de voo, proposta por Hivizi et al. (2007) e adaptada por Hivizi et al. (2009).....	20
Figura 2 – Esquema da metodologia utilizada para avaliação do parasitismo de <i>Cotesia flavipes</i> em campo. Em amarelo o ponto de liberação dos parasitoides e em azul os pontos onde foram inoculadas, artificialmente, as brocas-da-cana. Norte – N; Leste – L; Oeste – O; Sul – S; Noroeste – NO; Nordeste – NE; Sudoeste – SO; e Sudeste – SE....	21
Figura 3 – Vista lateral de fêmea de <i>Cotesia flavipes</i> (foto: R.F. Santos).....	27
Figura 4 – Vista lateral de macho de <i>Cotesia flavipes</i> (foto: R.F. Santos).....	27
Figura 5 – Vista lateral do tórax de <i>Cotesia flavipes</i> (foto: R.F. Santos).....	28
Figura 6 – Vista lateral da tíbia posterior direita de <i>Cotesia flavipes</i> (foto: R.F. Santos).....	28
Figura 7 – Asas posterior e anterior direitas de <i>Cotesia flavipes</i> (foto: R.F. Santos).....	28
Figura 8 – Vista lateral das antenas de fêmea de <i>Cotesia flavipes</i> (foto: R.F. Santos).....	29
Figura 9 – Vista dorsal das antenas de <i>Cotesia flavipes</i> (foto: R.F. Santos).....	29
Figura 10 – Vista lateral da cabeça de <i>Cotesia flavipes</i> , em detalhe o escapo e o pedicelo (foto: R.F. Santos).....	29
Figura 11 – Vista frontal da cabeça de <i>Cotesia flavipes</i> , em detalhe o escapo e o pedicelo (foto: R.F. Santos).....	30
Figura 12 – Vista dorsal da cabeça de <i>Cotesia flavipes</i> , em detalhe o escapo e o pedicelo (foto: R.F. Santos).....	30

Figura 13 – Raios do parasitismo de <i>Cotesia flavipes</i> produzida pela biofábrica de Promissão-SP. Os pontos escuros demonstram a distância e a direção em que foram recuperadas lagartas parasitadas. A seta indica a direção predominante do vento.....	45
Figura 14 – Relação entre lagartas parasitadas e as distâncias do ponto de liberação. Biofábrica de Promissão-SP.....	46
Figura 15 – Raios do parasitismo de <i>Cotesia flavipes</i> produzida pela biofábrica de Campo Novo de Parecis-MT. Os pontos escuros demonstram a distância e a direção em que foram recuperadas lagartas parasitadas. A seta indica a direção predominante do vento.....	47
Figura 16 – Relação entre lagartas parasitadas e as distâncias do ponto de liberação. Biofábrica de Campo Novo de Parecis-MT.....	47
Figura 17 – Raios de parasitismo de <i>Cotesia flavipes</i> produzida pela biofábrica de Quirinópolis-GO. Os pontos escuros demonstram a distância e a direção em que foram recuperadas lagartas parasitadas. A seta indica a direção predominante do vento.....	48
Figura 18 – Relação entre lagartas parasitadas e as distâncias do ponto de liberação. Biofábrica de Quirinópolis-GO.....	49
Figura 19 – Raios de parasitismo de <i>Cotesia flavipes</i> produzida pela biofábrica de Coruripe-AL. Os pontos escuros demonstram a distância e a direção em que foram recuperadas lagartas parasitadas. A seta indica a direção predominante do vento.....	50
Figura 20 – Relação entre lagartas parasitadas e as distâncias do ponto de liberação. Biofábrica de Coruripe-AL.....	50
Figura 21 – Resultado da eletroforese em gel de agarose a 1%: Esquerda para direita: Alagoas (AL), Goiás (GO), Mato Grosso (MT), São Paulo (SP) e Paquistão (PK).....	51
Figura 22 – Resultado da eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR com amplificação do COI das amostras das biofábricas: Da esquerda para a direita: Marcador molecular de 1000 bp, Mato Grosso (MT), Alagoas (AL), Goiás (GO) e São Paulo (SP).....	52
Figura 23 – Resultado da eletroforese em gel de agarose a 2%, Da esquerda para direita: Marcador molecular de 1000 bp, Mato Grosso (MT), Alagoas (AL), São Paulo (SP), Goiás (GO) e Paquistão (PK).....	53

Figura 24 – Árvore filogenética construída utilizando análise molecular realizada pelo método de máxima similaridade. Espécies localizadas no mesmo ramo são semelhantes quanto a sequência de nucleotídeos da região COI do DNA mitocondrial. A análise compreendeu 22 sequências de *Cotesia* spp. (Kumar et al., 2016).....

**QUALIDADE DO PARASITOIDE *Cotesia flavipes* CAMERON, 1891
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE) PRODUZIDO POR BIOFÁBRICAS DE
DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

RESUMO - O Brasil é considerado o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e por utilizar grandes áreas de cultivo várias pragas atacam a cultura, entre elas larvas de lepidópteros, particularmente da família Crambidae, sendo que o maior prejuízo econômico é causado por *Diatraea saccharalis*, popularmente conhecida como broca-da-cana. O controle químico é de baixa eficiência contra essa praga, devido ao hábito “broqueador” das lagartas, por isso, a alternativa de controle, para essa praga, é o uso do parasitoide *Cotesia flavipes*. A criação desse inseto em laboratório foi aprimorada ao longo dos anos, com início nos anos de 1970, existindo atualmente no Brasil, várias biofábricas e laboratórios de usinas açucareiras que produzem massalmente esses parasitoides. Apesar de serem produzidos em grandes quantidades, não existe um protocolo para o controle de qualidade do material produzido, ou quando existe normalmente é incipiente, resultando, muitas vezes, em insetos com baixa qualidade ou que não são capazes de efetuar seu papel de controlador biológico, bem como lotes com diferentes características tanto morfológicas como biológicas. Nesse sentido, presente estudo buscou comparar a qualidade de *C. flavipes* de diferentes regiões do Brasil, avaliando-se as características biológicas e morfológicas, parasitismo em campo, além da realização de análise molecular comparando as sequências da região do DNA mitocondrial, “Citochrome C Oxidase subunit I”, dos insetos produzidos no Brasil, com exemplares coletados no Paquistão. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que: os insetos das biofábricas de Campo Novo do Parecis-MT, Quirinópolis-GO, Coruripe-AL e Promissão-SP apresentam diferenças morfológicas; os insetos das biofábricas de MT, GO, AL e SP são biologicamente diferentes; os lotes produzidos nas biofábricas não são uniformes; volume do tórax (comprimento e largura) e largura das asas anteriores direitas dos machos são parâmetros morfológicos que discriminam os insetos das biofábricas; período desde a oviposição até a emergência dos adultos, período pupal, viabilidade de pupas, longevidade de adultos e número de insetos voadores são parâmetros biológicos que discriminam os insetos das biofábricas; a dispersão do parasitismo chega a 35 metros para os insetos das diferentes biofábricas, porém eficientemente apenas até 25 ou 30 metros do ponto de liberação; a direção do vento se mostrou inconsistente quanto à dispersão do parasitismo para os insetos das biofábricas de MT, GO, AL e SP; os insetos das biofábricas de MT, GO, AL e SP têm 100% de similaridade genética com os insetos coletados em Islamabad-Paquistão.

Palavras-chave: broca da cana, controle de qualidade, *Cotesia*, consanguinidade, criação massal, dispersão do parasitismo.

**QUALITY OF PARASITOID *Cotesia flavipes* CAMERON, 1891 (HYMENOPTERA:
BRACONIDAE) PRODUCED BY BIOFACTORIES FROM DIFFERENT
BRAZILIAN'S REGIONS**

ABSTRACT – Brazil is considered the largest sugarcane producer worldwide and because of the big cultivated areas, many pests rise to attack the culture. Among these pests are the lepidopterans larvae, especially from the Crambidae family and the major economic damage is caused by *Diatraea saccharalis*, known as sugarcane borer. Chemical control is inefficient against this pest; because the larvae has the habit to drill the sugarcane, for that reason the alternative to control this pest is the use of the parasitoid *Cotesia flavipes*. The rearing of this parasitoid in laboratory had been improved since 1970; nowadays, in Brazil, many biofactories and laboratories have been installed to produce this parasitoid on the sugarcane mills. Although these wasps have been mass-produced there isn't a protocol that regulates the quality of these insects. In many cases the protocol followed is not enough and could result in production of bad insects with no capacity to perform their role as a biological control agent, even with varied batches that presents different biological and morphological characteristics. Therefore, this study aimed to compare four different batches of wasps produced by biofactories from different Brazilian states Mato Grosso, Goiás, Alagoas and São Paulo. We performed tests to compare the biological and morphological characteristics, the range of parasitism on field and a molecular analysis from the DNA region Cytochrome C Oxidase Subunit I using insects produced in Brazil and insects collected in Pakistan. Our results allows us to conclude that: wasps from Campo Novo do Parecis-MT, Quirinópolis-GO, Coruripe-AL e Promissão-SP showed morphological differences; the insects produced by these biofactories are biologically different from each other; the batches produced are not uniform; the length and width of the thorax and width of the right wing of males are parameters that differentiate the wasps produced; the viability of pupae, the longevity of the adults and the numbers of flyers insects are biological parameters that distinguish insects from each biofactories; the range of parasitism reaches 35 meters, but with efficacy only 25 or 30 meters away from the releasing point; the direction of the wind showed inconsistency when related to the range of parasitism for all biofactories; the wasps produced by Brazilian's biofactories are genetically 100% similar with the insects collected in Islamabad-Pakistan.

Key words: sugarcane borer, quality control, *Cotesia*, inbreeding, mass rearing, range of parasitism.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma fonte renovável de energia, sendo o Brasil o maior produtor mundial dessa cultura, com aproximadamente 10,9 milhões de hectares plantados e com uma produção industrial de açúcar de 38,7 mil toneladas e de 27,3 mil m³ de etanol, sendo 11,6 mil m³ de anidro e 15,7 mil m³ de hidratado. Nesse cenário, o Estado de São Paulo se destaca por contribuir com mais de 50% da área cultivada e da produção de açúcar e etanol do país (UNICA, 2018).

O setor sucroalcooleiro representa aproximadamente 14% do PIB (Produto Interno Bruto), destacando assim a importância da indústria sucroalcooleira, que além de contribuir com o crescimento econômico, gera milhares de empregos diretos e indiretos (Matsuoka et al., 2009; Carvalho-Netto et al., 2014; UNICA, 2018).

Com a utilização de uma grande extensão de área no cultivo, a cana-de-açúcar atrai vários insetos-praga, entre eles lepidópteros, especialmente da Família Crambidae. *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), conhecida por broca-da-cana, é a espécie causadora do maior prejuízo econômico nessa cultura (Botelho e Macedo, 2002). Algumas alternativas para evitar ou prevenir o ataque dessa praga na cultura, como o controle químico, muitas vezes utilizado, tem baixa eficácia, uma vez que as lagartas não são atingidas pelo produto no interior dos colmos das plantas (Rodriguez et al., 1995).

Uma alternativa para a ineficiência do controle químico contra a broca é a utilização de *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae), um parasitoide de larvas, muito comum em programas de controle biológico, usado em países como Quênia, Uganda, Tanzânia, entre outros países do leste e sul da África, por ser eficiente na redução da densidade populacional de algumas espécies de lepidópteros-praga, particularmente da família Crambidae (Polaszek e Walker, 1991; Parra et al., 2002; Cruz, 2007). No Brasil, essa vespa é empregada no controle biológico aplicado da broca desde a década de 1970, após o aprimoramento de uma metodologia para sua criação massal, como ocorreu nos laboratórios da Copersucar e do Planalsucar, que priorizaram na época o controle biológico da broca (Botelho et al., 1980), sendo posteriormente seguidos por várias usinas açucareiras e laboratórios particulares.

Com intuito de expandir cada vez mais o cultivo e a produção de cana-de-açúcar, as Agroindústrias Canavieiras também se utilizaram de arrendamentos de terras, de pequenos, médios e grandes proprietários, controlando a maioria da cana-de-açúcar que é plantada no país (Ficarelli e Ribeiro, 2010), predominando também nessas áreas o controle biológico da broca com liberações sistemáticas de *C. flavipes*.

Portanto, muitas usinas possuem seus próprios laboratórios de criação de *C. flavipes*, uma vez que os insetos produzidos têm um custo total de produção muito baixo (van Lenteren, 2009; Santos et al., 2015).

Atualmente, no Brasil, existem cerca de 30 Usinas e 20 Empresas, que produzem e comercializam *C. flavipes* (ABC BIO, 2018). No entanto esses laboratórios não seguem um protocolo de controle de qualidade para a criação massal, sendo que em muitos dos casos, os parâmetros avaliados como norteadores da qualidade do inseto ficam restritos à mobilidade dos adultos (capacidade de voo), à razão sexual e a coloração das massas das pupas produzidas (BUG, 2016).

Mesmo com um controle de qualidade, que muitas vezes deixa a desejar, esses parasitoides ainda apresentam alta eficiência na redução da infestação de *D. saccharalis*, com a espécie não se estabelecendo nas condições climáticas do Brasil, mesmo após 40 anos de liberações continuadas. Alguns autores observaram que a capacidade de dispersão de *C. flavipes* teve uma significativa redução, de 35 metros para 15 metros, ao longo dos anos em que foi utilizada (Dinardo-Miranda et al., 2014; Volpe et al., 2014), suspeitando-se ser essa redução provocada pela intensa consanguinidade observada nos laboratórios de criação.

Devido a essa incerteza sobre qual seria ao desempenho ideal do inseto a ser produzido, bem como da qualidade dos insetos produzidos nas diferentes biofábricas, a preocupação com a qualidade dos parasitoides produzidos massalmente vem chamando a atenção de pesquisadores e dos laboratórios envolvidos na criação de insetos (van Lenteren, 2009).

O objetivo desse trabalho foi comparar alguns parâmetros biológicos de *C. flavipes* produzidas por laboratórios (biofábricas) de alguns estados brasileiros, avaliando-se características biológicas importantes para a performance do parasitoide como controlador biológico da broca-da-cana, além de validar alguns testes que poderiam servir como apoio para o estabelecimento de um protocolo de controle de

qualidade para a espécie, visando melhorar ainda mais sua eficiência na redução dos danos causados na cultura pela broca da cana, bem como checar se existe hibridação nos indivíduos produzidos nas biofábricas brasileiras, comparando-os por análise molecular com exemplares do Paquistão, local de origem dos insetos introduzidos no Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico da cana-de-açúcar no Brasil

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (Poales: Poaceae) é originária do continente asiático, das Ilhas de Nova Guiné, onde era empregada como planta ornamental, sendo introduzida em vários países e ganhando destaque no Oriente Médio, de onde o seu cultivo foi disseminado por todo o mundo. Muitas civilizações antigas utilizavam essa cultura para alimentação animal, bem como para obtenção de açúcar, sendo que os egípcios foram os primeiros a dominar técnica para clareamento do caldo de cana, produzindo algo similar ao que hoje conhecemos como açúcar mascavo (Fonseca, 1989; Figueiredo, 2008; Miranda, 2008).

O cultivo da cana em países com o clima tropical é comum, devido a condições climáticas favoráveis, como altas temperaturas e alta umidade relativa do ar. Além disso, a cana necessita de algumas outras condições que são essenciais para o seu desenvolvimento vegetativo, como por exemplo, períodos de temperaturas e umidades do ar mais baixas, o que favorece o incremento na concentração de açúcar nos colmos. Assim, a cana-de-açúcar facilmente se adaptou ao clima brasileiro e se tornou importante para economia local e para a geração de empregos (Nova Cana, 2018), transformando-se em um dos mais importantes “commodities” brasileiros.

Como já mencionado, a adaptação da cultura ao clima brasileiro aconteceu de forma rápida, sendo que a cana inicialmente produzida pelos portugueses possuía localização privilegiada no país, tanto para sua produção nos engenhos, quanto para o processo de exportação navios, principalmente na região nordeste e particularmente em Pernambuco. Por isso, o Brasil do período colonial se tornou o principal fornecedor de açúcar para o continente europeu. Ainda sob o domínio português, a cana teve uma grande expansão se tornando muito importante para a colônia e também para os colonos, que passaram a trocar açúcar por várias outras especiarias raras (Silva et al., 2003; Figueiredo, 2008).

Devido ao sucesso dos Portugueses no cultivo e no comércio da cana-de-açúcar, os Holandeses se interessaram pela cultura e começaram a cultivar a cana;

em 1630 os Países Baixos invadiram Pernambuco, conquistando uma das principais regiões produtora e exportadora de cana daquela época (Figueiredo, 2008).

Os holandeses, então, passaram a desenvolver um alto nível de conhecimento no cultivo da cana-de-açúcar, porém os portugueses expulsaram os holandeses daquela região, passando a Holanda a cultivar a cana-de-açúcar nas ilhas das Antilhas, tornando-se grande competidor no comércio do açúcar. Devido a esta concorrência com os Holandeses e a descoberta de ouro no Brasil, a cana teve um declínio em sua produção (Fonseca, 1989; Figueiredo, 2008).

Porém, após a Primeira Grande Guerra, os europeus tiveram uma enorme perda industrial, repercutindo especialmente na produção do açúcar. Com isso, o cultivo da cana voltou a ser valorizado no Brasil, tendo então um grande aumento de produção de açúcar, com a construção de várias unidades produtoras, principalmente no sudeste do país (Fonseca, 1989; Silva et al., 2003).

A cana-de-açúcar, no Brasil já independente de Portugal, passou por outra fase de declínio, causada por uma forte imigração para o território brasileiro, onde se iniciou o cultivo do café, com essa cultura passando a ser economicamente mais importante. No entanto, quando Getúlio Vargas chega ao cargo de presidente da república, a cana-de-açúcar volta a ser muito importante para o país, pois ocorre o início de um novo período, no qual a fabricação de álcool passa também a ser muito importante para a economia brasileira (Fonseca, 1989; Silva et al., 2003).

Em meados de 1970, ocorre a criação do Proálcool (Programa Nacional do Álcool), incentivando ainda mais a produção do álcool, com o cultivo da cana passando a ser crucial para economia brasileira. Nesse período houve também uma mudança na legislação, que tornou obrigatória a mistura de álcool na gasolina, além do desenvolvimento dos automotores movidos a etanol e o desenvolvimento de várias áreas produtoras, o que fez a produção de pouco mais de 300 milhões de litros saltar para mais de 11 bilhões em apenas 10 anos. Devido a esse grande avanço tecnológico, a economia brasileira tornou-se fortemente ligada ao processo industrial da cana-de-açúcar que gera energia, combustível e alimento (Machado, 2014; CONAB, 2018).

De acordo com a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), o cultivo de cana-de-açúcar ocorre em mais de 100 países, todavia, 80% de

seu cultivo ocorre em apenas 10 países, sendo eles: Brasil, Índia, China, México, Tailândia, Paquistão, Colômbia, Austrália, Indonésia e Estados Unidos, respectivamente, com Brasil, Índia e China sendo considerados os maiores produtores mundiais (FAO, 2018).

2.2. Aspectos morfológicos e biológicos de *Diatraea saccharalis*

Diatraea saccharalis possui desenvolvimento biológico completo, passando pelas fases de desenvolvimento de ovo, larva, pupa e adulto. Geralmente na fase larval esses insetos possuem comprimento máximo de 25 mm e coloração branca leitosa, podendo variar de acordo com o tipo de alimentação. A coloração do adulto é amarelo-palha com manchas escuras nas asas anteriores, enquanto as posteriores são esbranquiçadas, medindo em torno de 25 mm de envergadura (Mendonça et al., 1996; Botelho e Macedo, 2002; Parra et al., 2002; Dinardo-Miranda, 2008).

Os adultos, machos e fêmeas, são muito similares quanto às características morfológicas, no entanto, pode-se diferenciá-los pelo tamanho e pela coloração, sendo a fêmea maior, com abdômen mais volumoso e com uma pigmentação mais acentuada nas asas; os machos apresentam uma concentração de cerdas no terceiro par de pernas (Mendonça et al., 1996; Dinardo-Miranda, 2008).

As fêmeas ovipositam, em média, de 200 a 400 ovos, de formato ovalados e achatados, sendo as posturas realizadas de forma agrupada (5 a 50 ovos), tendo elas o aspecto de couro de cobra ou escamas de peixe, uma vez que cada ovo cobre aproximadamente 2/3 do anterior. No entanto, essa quantidade de ovos, também pode variar, de acordo com a alimentação ou com as condições ambientais, em que o inseto se encontra (Teran et al., 1983; Botelho e Macedo, 2002; Pinto et al., 2006 a, b). Dependendo da época do ano, a fêmea pode colocar de 300 a 600 ovos (Pinto, 2006).

As fêmeas realizam suas posturas durante 3 dias e, após 4 dias de realizada a primeira oviposição, ocorre a eclosão das larvas. No primeiro estágio de desenvolvimento larval os insetos se alimentam das folhas (“raspam”) localizadas próximas à bainha da planta, enquanto do segundo ínstar em diante as lagartas passam a perfurar os colmos e formam galerias nos mesmos. As lagartas se

desenvolvem, em média, em 40 dias, formando então as pupas que, no início de desenvolvimento são de coloração marrom escura, escurecendo a medida que se aproxima da emergência dos adultos. Geralmente os adultos tem uma média de longevidade de 5 a 7 dias, variando de acordo com as condições climáticas e com a disponibilidade de alimentação (Botelho e Macedo, 2002; Almeida et al., 2008; Pinto, 2006; Dinardo-Miranda, 2008; Pinto et al., 2009).

Os adultos de *D. saccharalis* apresentam uma grande capacidade de dispersão, podendo voar em média 250 metros, no entanto, quando a intensidade do vento é elevada, essa dispersão pode alcançar distâncias muito maiores (Hayward, 1943; Caixeta, 2010).

2.3. A importância da broca, *Diatraea saccharalis*, na cana-de-açúcar

Diatraea saccharalis causa danos diretos e indiretos, ambos com uma enorme significância econômica. Os danos diretos estão relacionados com a perda de peso do colmo, devido ao fato de as lagartas se alimentarem do interior do colmo. No entanto, quando a praga se alimenta das brotações das plantas, pode ocorrer morte da parte apical, provocando o sintoma conhecido como "coração morto" (Long e Hensley, 1972; Macedo e Botelho, 1988; Mendonça et al., 1996; Botelho e Macedo, 2002; Parra et al., 2002; Benedini, 2006; Freitas et al., 2006; Pinto et al., 2006a).

Os danos indiretos ocorrerem quando as larvas deixam orifícios nos colmos que são utilizados por fungos oportunistas, como *Fusarium moniliforme* J. Sheldon (Hypocreales: Nectriaceae) e *Colletotrichum falcatum* Went. (Glomerellales: Glomerellaceae), que se instalam no interior dos colmos causando a podridão vermelha e, com isso, provocando uma redução do brix (teor de açúcar da cana), provocado pela inversão da sacarose. Ocasionalmente também perdas na produção de etanol e de açúcar, pois os fungos competem com as bactérias responsáveis pelo processo de fermentação e ainda dificultam o processo de cristalização do açúcar (Guagliumi, 1973; PLANALSUCAR, 1982; Macedo e Botelho, 1988; Botelho, 1992; Pinto et al., 2006a).

Analisando os prejuízos causados por essa praga, alguns trabalhos relataram que 1% de intensidade de infestação de broca, na cana-de-açúcar, pode provocar

perdas consideráveis, tanto na produção de etanol, quanto na de açúcar, ocasionando uma perda no total da produção de aproximadamente 0,80 % em cada hectare de planta colhida (Almeida e Stingel, 2005; Pinto et al., 2006a). Para cada 1% de índice de intensidade de infestação se tem redução de 0,42% de açúcar, 0,21% de álcool e de 1,14% na produção de cana (Canaoeste, 2013).

2.4. Controle de *Diatraea saccharalis*

Antes de se tomar qualquer decisão quanto ao controle da broca, é necessário se fazer uma amostragem da área em questão. Para se determinar o nível de infestação em uma determinada área utiliza-se uma fórmula matemática que permite calcular o Índice de Intensidade de Infestação (I.I.I.), que permite determinar a porcentagem da infestação (I.I.) ou porcentagem de colmo atacados (P.C.A) (Gallo et al., 2002).

O I.I.I. é calculado após se amostrar uma quantidade “n” de colmos, realizando-se então o cálculo da porcentagem de colmos broqueados em relação aos amostrados (100 colmos). A porcentagem de intensidade de infestação (%I.I. ou P.C.A) é obtida pela mesma fórmula, contabilizando também a presença da broca nos colmos broqueados (100 colmos). Quando encontrados níveis de %I.I. ou P.C.A., menores que 3% não é realizado o controle da praga e quando os níveis são iguais ou maiores que 3%, se recomenda a aplicação de inseticidas após 7 dias da amostragem e posteriormente, aproximadamente 30 dias se faz uma segunda aplicação (Gallo et al., 2002; Macedo e Macedo, 2004; Viel, 2009).

Existem vários produtos químicos, com diferentes ingredientes ativos, que podem ser utilizados para o controle de *D. saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar, como por exemplo: triflumurom, lufenurom, fipronil, novalurom, carbofurano, tebufenozida, diflubenzurom, clorrantraniliprole, teflubenzuron e clorfluazuron, sendo que todos eles devidamente registrados para *D. saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar (Agrofit, 2018). Contudo, devido ao hábito alimentar da praga de broquear o colmo, a utilização de inseticidas não repercute em alta eficiência de controle devido ao fato do inseto estar protegido e não ser atingido pelo produto químico, ou seja, muitas das vezes não se consegue reduzir significativamente a população da praga e,

consequentemente, o dano. Sendo assim, o controle químico se torna inviável do ponto de vista financeiro e ambiental (Marconato, 1988; Gallo et al., 2002).

Além de não ser eficiente no combate à broca, uma vez que sua ação praticamente se restringe à fase inicial de desenvolvimento da lagarta ainda fora do colmo, uso de inseticidas pode ocasionar efeitos indesejáveis aos inimigos naturais que auxiliam no controle do inseto. O uso de químicos ainda é empregado em áreas onde existem elevados índices de infestação (Dinardo- Miranda, 2008).

Em relação ao controle biológico, muitos inimigos naturais podem ser encontrados atacando *D. saccharalis* na cultura da cana, entre eles, pode-se destacar a ação de predadores, de parasitoides e de alguns microrganismos entomopatogênicos (Nava et al., 2009).

A predação de lagartas da broca pode ocorrer por insetos como formigas, tesourinhas, entre outros predadores, ajudando na redução da densidade populacional da praga (Sousa-Silva et al., 1992; Rossi e Fowler, 2004; Volpe et al., 2014). Pode-se ainda destacar o efeito de alguns microrganismos entomopatogênicos, como alguns fungos ou até mesmo bactérias, que exercem importante papel na redução populacional de *D. saccharalis*, sendo esses microrganismos ótimos controladores dessa praga, particularmente quando as lagartas ainda se encontram nos primeiros ínstares de desenvolvimento, pois ainda estão se alimentando das folhas e não penetraram no colmo (Alves et al., 1985; Mendonça et al., 1996; Nava et al., 2009). Quanto aos entomopatógenos, também existem produtos registrados para o controle de *D. saccharalis* em cana, como por exemplo, Dipel[®] WP (Agrofit, 2018), que apresenta o mesmo problema com relação a atingir a broca no interior do colmo.

Porém, o uso de parasitoides no controle da broca da cana é o que mais se destaca, visto que esses agentes são eficientes, facilmente produzidos em laboratório e com um baixo custo, no Estado de SP o custo de um copo com 15 massas varia de R\$ 4,50 a R\$ 5,10 (<http://www.mfrural.com.br>). Entre os parasitoides destacam-se: *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae), para o controle de ovos de *D. saccharalis* (Parra, 1992; Dinardo-Miranda, 2008; Nava et al., 2009), bem como *C. flavipes*, inseto largamente produzido em todo o território brasileiro, que contribui intensamente para a redução da porcentagem de infestação

da broca, apresentando alta eficiência, uma vez que consegue parasitar as lagartas no interior dos colmos de cana, evitando que as brocas atinjam a fase adulta, interrompendo o ciclo do inseto. Em muitos casos, esses parasitoides, tanto *T. galloi* quanto *C. flavipes*, podem ser utilizados em conjunto, para uma maior eficácia no combate da broca-da-cana (Dinardo-Miranda et al., 2014).

Recentemente foi lançada no Brasil a primeira cana modificada geneticamente, modificada para expressar a proteína Cry1ab, isolada da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner, com o nome comercial “CTC20BT™”. Foram mais de 20 anos de estudos realizados pelo C.T.C. (Centro Tecnológico de Cana), para que essa tecnologia fosse utilizada comercialmente, por isso, há uma grande expectativa, de que essa tecnologia possa contribuir para o avanço no controle da broca da cana, uma vez que a toxina contida na planta elimina a broca em seus primeiros ínstares larvais (CTNBio, 2018).

Ainda, em relação à medidas para controle de *D. saccharalis*, deve-se destacar que diversas medidas culturais que podem contribuir para a redução dos índices de infestação da broca, como por exemplo: boas práticas culturais; plantio de variedades menos suscetíveis; moagem rápida após o corte e colheita; evitar/eliminar plantas hospedeiras, como o milho, próximas ao canavial; e cuidado na aplicação de vinhaça que contribui para a elevação da população da broca (Dinardo-Miranda, 2008).

2.5. Histórico de *Cotesia flavipes*

Cotesia flavipes é nativa da região Indo-Australiana, onde pode ser encontrada atacando insetos “broqueadores” de gramíneas. Esse inseto foi introduzido como agente de controle biológico em mais de 40 países, que apresentavam problemas com insetos “broqueadores”, principalmente lepidópteros das famílias Noctuidae, Pyralidae e Crambidae (Polaszek e Walker, 1991; Overholt et al., 1994 a, b; Mendonça et al., 1996; Overholt et al., 1997; Potting et al., 1997).

Em 1971, o Prof. Dr. Domingos Gallo (ESALQ-USP, Piracicaba, SP) importou inimigos naturais, estando entre eles *C. flavipes*. Nesse período, foram realizados testes de laboratório com uma linhagem, desse parasitoide, importada de Trinidad e Tobago, no entanto, os testes foram realizados em uma estação experimental no

Norte do Brasil. Durante o período de teste, a criação massal desse parasitoide foi aprimorada, sendo que em 1974 foram realizadas as primeiras liberações em campo, no intuito de se controlar a broca-da-cana (Botelho et al., 1980; Botelho, 1992; Pinto et al., 2006 a, b). Porém, quando foram realizar liberações nos canaviais do Estado de São Paulo, não obtiveram o mesmo resultado encontrado no Norte, com eficiente controle da broca. Em 1978, resolveram então, introduzir uma nova linhagem, originária da Índia e do Paquistão, e, diferentemente da anterior, essa nova linhagem do parasitoide se adaptou bem às condições climáticas do Estado de São Paulo, com isso novos incentivos foram criados para o uso desse parasitoide para o controle da broca-da-cana (Mendonça et al., 1996; Botelho e Macedo, 2002). Desde então, esse parasitoide passou a ser criado massalmente no Brasil e atualmente, é considerado o maior exemplo de controle biológico, no mundo, devido a grande extensão de área em que se utiliza essa vespa (Parra, 2014).

2.6. Aspectos morfológicos e biológicos de *Cotesia flavipes*

Cotesia flavipes, um microhimenóptero da subfamília Microgastrinae, é uma vespa de aproximadamente 2 a 3 mm de comprimento; possui o corpo com coloração escura, com as pernas de coloração marrom amarelada e com asas quase transparentes (hialinas); os machos têm antenas longas, enquanto nas fêmeas elas são curtas, apesar de terem o mesmo número de antenômeros (Wilkinson, 1928; Cueva et al., 1980; Botelho e Macedo, 2002; Pinto et al., 2006a).

É considerado um endoparasitoide, uma vez que seu ciclo de vida ocorre no interior de seus hospedeiros. É cenobionte, pois não mata o hospedeiro antes de completar o seu ciclo de vida, sendo também gregário, uma vez que várias larvas se desenvolvem num mesmo hospedeiro (Overholt et al., 1997). Esses parasitoides são haplodiploides, se reproduzindo de forma sexuada ou por partenogênese arrenótoca. Para a produção de machos e de fêmeas é necessário que ocorra a cópula, assim, ovos não fecundados dão origem somente a machos haploides e os ovos fecundados originam fêmeas e machos diploides (Moutia e Courtois, 1952; Ricklefs, 2003; Gauld e Hanson, 2006).

O acasalamento ocorre logo após a emergência, com o macho apto para a cópula e fecundação após 13 minutos, enquanto as fêmeas demoram um pouco mais, em média 27 minutos (Cueva et al., 1980), sendo que os machos, mesmo após o primeiro acasalamento, continuam voando a procura de outras fêmeas (Arakaki e Ganaha, 1986).

A oviposição de *C. flavipes* se inicia com a inserção do ovipositor em seus hospedeiros, sendo que nesse processo geralmente são inseridos de 60 a 80 ovos, em média, na hemocele do inseto. No processo de oviposição, as fêmeas também inserem um vírus no corpo do hospedeiro, *Cotesia flavipes bracovirus*, pertencente à família Polydnaviridae e ao gênero Bracovírus, sendo ele capaz de suprimir a resposta imunológica do hospedeiro, evitando o encapsulamento das larvas de *C. flavipes* em desenvolvimento no interior do corpo do hospedeiro (Fauquet e Pringle, 1999; Macedo e Araújo, 2000).

As larvas de *C. flavipes* passam por 3 instares e, em aproximadamente 12 a 14 dias, começam a sair do corpo do hospedeiro, perfurando o tegumento da lagarta, formando massas de pupas externamente; após a formação das pupas os hospedeiros morrem e depois de 4 dias, em média, ocorre a emergência dos adultos, que vivem aproximadamente 3 ou 4 dias (Parra, 2000; Botelho e Macedo, 2002; Pinto et al., 2006a). Portanto, o ciclo de desenvolvimento completo passa pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto e, desde a oviposição até a emergência e morte do adulto, tem-se uma duração média de aproximadamente 20 dias (Campos-Farinha et al., 2000; Macedo e Araújo, 2000; Pinto et al., 2006a).

2.7. Inimigos naturais e controle biológico de pragas

Muitos insetos classificados como inimigos naturais ou agentes de controle biológico podem ser utilizados como alternativa ao controle químico para a redução da população de insetos-praga. Assim, para esses agentes serem utilizados se torna necessário a criação de insetos em larga escala, o que possibilita a liberação de milhares de indivíduos benéficos em culturas comprometidas pela presença de insetos-praga (Singh, 1977). O uso dessa tática de controle é um método que minimiza o prejuízo ao ambiente, uma vez que esses agentes de controle muitas

vezes já ocorrem naturalmente, mas em baixas populações, que com a liberação massal passam a ter uma maior proporção no sistema agrícola, podendo assim atuar com maior eficiência na redução das populações de pragas, muitas vezes se igualando ou até mesmo sobrepujando a eficiência do controle químico (Singh, 1977; Singh e Moore, 1985; Leppla e Ashley, 1992).

Dentre os organismos utilizados como agentes de controle pode-se destacar: predadores, parasitoides e os microrganismos, como fungos, bactérias e vírus. Os predadores, como insetos e ácaros, possuem alta capacidade de busca por presas, sendo geralmente generalistas, se alimentam de vários outros insetos, podendo inclusive preda a própria espécie, limitando com isso a utilização desses agentes. Os parasitoides, em sua grande maioria, são específicos, podendo ser utilizados em conjunto com outros agentes ou técnica de controle, favorecendo a eficiência de controle (Alves et al., 1985; Mendonça et al., 1996; Parra et al., 2002; Nava et al., 2009; Parra, 2014).

Os parasitoides mais utilizados para o controle de pragas no Brasil são *Trichogramma* spp. e *C. flavipes*, e o uso de *C. flavipes* é considerado como o maior programa de controle biológico do mundo em extensão de área, com mais de 3 milhões de hectares tratados (Parra et al., 2002; Parra, 2014), sendo eles precedidos pela criação e liberação de dípteros Tachinidae para a mesma finalidade, que no comparativo apresentavam menor eficiência (Macedo et al., 1984).

2.8. Importância da criação massal de *Cotesia flavipes*

O uso de *C. flavipes* é essencial para a redução da densidade populacional da broca-da-cana, uma vez que essa praga causa enorme prejuízo econômico e, muitas das vezes, é mais econômico que o custo do controle por meio de agrotóxicos, que no caso de *D. saccharalis* é oneroso e de baixa eficiência (Prezotti et al., 2002).

Para a criação dessa vespa é necessário a criação do hospedeiro (ainda não é disponível “hospedeiro artificial”), que no caso é a lagarta de *D. saccharalis*. Portanto, todos os laboratórios que mantêm criação massal de *C. flavipes*, possuem uma criação de *D. saccharalis* (Pinto et al., 2006a, b). A produção massal desse parasitoide foi estudada em institutos de pesquisa, faculdades e laboratórios

particulares, com sua técnica aprimorada com o passar dos anos, sendo hoje devidamente dominada (Botelho et al., 1980; Viel, 2009).

Cotesia flavipes vem sendo utilizada no Brasil para o controle da broca da cana-de-açúcar desde 1971, sendo que atualmente aproximadamente 3,5 milhões de hectares são tratados com esse parasitoide. Devido a essa demanda, a criação massal é necessária para tal suprimento, sendo que a liberação da vespa ocorre pelo menos uma vez por ano nas áreas afetadas pela praga, com essa demanda por parasitoides sendo suprida por biofábricas de muitas empresas sucroalcooleiras, bem como de algumas de natureza exclusivamente comercial (Parra et al., 2002; Viel, 2009; Parra, 2014). Saliente-se também que ainda temos no Brasil perto de 6 milhões de hectares de cana-de-açúcar que não recebem liberações de *C. flavipes* (Parra, 2014).

2.9. Controle de qualidade em criações massais de *Cotesia flavipes*

Nas duas últimas décadas tem ocorrido significativa expansão na indústria do controle biológico, sendo exigido cada vez mais que os padrões de qualidade dos agentes, medidos pelo controle de qualidade, sejam devidamente incorporados nas linhas de produção, antes dos organismos que serão colocados no mercado, para que, segundo van Lenteren (2003), os indivíduos da produção massal de laboratório possam ter a capacidade de efetivamente controlar a praga-alvo quando liberados.

Um fator muito importante nas criações massais de agentes de controle biológico é, sem dúvida, o controle de qualidade, que é definido por Leppla e Ashley (1992) como o monitoramento e controle do complexo processo de produção nos programas de criação massal, que assegurem que o produto final (o agente de controle biológico aplicado) apresente qualidade consistente a ponto de alcançar o desempenho que dele se espera no campo, que é o efetivo controle da praga.

Muitas vezes o controle de qualidade é negligenciado por laboratórios que produzem esse tipo agente. Por isso, se faz necessário, cada vez mais, a implantação de programas que visam controlar a qualidade do inseto produzido, uma vez que, um inseto, utilizado no controle biológico, com uma baixa qualidade, além pode vir a

comprometer o programa de controle de pragas, particularmente pela baixa eficiência na redução da população da praga-alvo (Prezotti e Parra, 2002; Garcia et al., 2009).

Algumas características, como a preferência ou a adequação por determinado hospedeiro, bem como a capacidade de localização do inseto alvo para o controle, são importantes, para demonstrar a eficiência, dos inimigos naturais que são massalmente produzidos, na redução da densidade populacional da praga (Hassan, 1997).

Nas criações massais de *C. flavipes* que são realizadas por algumas biofábricas e em laboratórios de usinas produtoras de açúcar e álcool, poucas características biológicas, como a agressividade do adulto, razão sexual e a aparência externa das massas de pupas são consideradas como o padrão de qualidade para os insetos produzidos (Prezotti e Parra, 2002; BUG, 2016). Nesse sentido, Hassan (1997) menciona que para o efetivo controle de qualidade devem ser avaliadas características no laboratório, em semi-campo e em campo, sendo algumas delas: (1) laboratório - preferência e adequação hospedeira; (2) semi-campo – capacidade de busca; e (3) campo – eficiência, adaptação, localização do habitat, localização do hospedeiro, aceitação de hospedeiro, adequação do hospedeiro e sincronização com o hospedeiro.

Para se estimar a qualidade da *C. flavipes* produzida massalmente em biofábricas, Hivizi et al. (2009) propuseram as seguintes avaliações: do parasitismo e da fecundidade; da porcentagem de emergência; da razão sexual, da longevidade dos adultos e da capacidade de voo.

Um dos grandes obstáculos para se executar um bom protocolo de controle de qualidade para uma espécie produzida em larga escala em uma biofábrica é a detecção da perda da variabilidade genética da população (Trevisan, 2014). Nesse contexto, dos mecanismos envolvidos na deterioração da variabilidade genética de uma população em laboratório, parecem ser mais relevantes a deriva genética (ou efeito fundador), o cruzamento consanguíneo e a seleção.

A deriva genética influencia a frequência dos genes da colônia (Joslyn, 1984), com o efeito fundador sendo um exemplo extremo (Wright, 1977). A população de laboratório é “fechada”, com as eventuais mudanças ocorrendo dentro de uma limitada variabilidade genética (Bartlett, 1984). Nesse sentido, o tamanho numérico e

a origem geográfica da população fundadora afetam diretamente o “pool” genético da espécie na colônia de laboratório, afetando a habilidade de respostas à eventos e à seleção (Bartlett, 1985; van Lenteren, 2009). O problema da homoziguidade é que geralmente os genes recessivos carregam caracteres indesejáveis, às vezes deletérios, que antes eram mascarados pela heteroziguidade (Bartlett, 1984; Charlesworth e Charlesworth, 1987; Cassel et al., 2001; Ralls et al., 2007).

As colônias de *C. flavipes* existentes nas diferentes biofábricas brasileiras foram fundadas a partir de indivíduos introduzidos há cerca de 40 anos, não havendo relato de novas introduções de indivíduos “selvagens”. Assim, as populações formadas nas diferentes biofábricas são oriundas de indivíduos aparentados, uma vez que suas árvores genealógicas têm ancestrais comuns. Sendo assim, embora divididas em várias “sub-populações” (biofábricas), as populações seriam de alguma forma endogâmicas (Griffiths et al., 2008).

Nesse sentido, Freitas et al. (2018) analisaram, com o uso de microssatélites, insetos oriundos de biofábricas de seis estados brasileiros (Alagoas, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Paraná e São Paulo) e verificaram a existência de variação genética moderada entre as populações estudadas, mesmo com elas tendo ancestrais comuns e após mais de 40 anos da primeira introdução.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção de *Cotesia flavipes*

Os insetos das diferentes regiões do Brasil, dos municípios de Coruripe, Alagoas-AL; Campo Novo do Parecis, Mato Grosso-MT; Quirinópolis, Goiás-GO; e Promissão, São Paulo-SP, foram enviados ao Laboratório de Biologia e Criação de Insetos da FCAV-Unesp, Jaboticabal, via Correio, sempre armazenados em caixa de isopor e ainda em fase de pupa.

Para a realização dos testes com os insetos oriundos das diferentes biofábricas foram utilizadas lagartas de *D. saccharalis* fornecidas pelo Laboratório de Entomologia da Usina do Grupo São Martinho, Pradópolis, SP, iniciando-se todos os testes assim que os parasitoides emergiram. Aproximadamente após 12 horas da emergência dos adultos as fêmeas foram utilizadas para o parasitismo em lagartas de broca, sendo os testes realizados sempre com a geração seguinte e, quando em laboratório, em sala climatizada com temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

3.2. Imagens e morfometria de *Cotesia flavipes*

As imagens e a morfometria foram realizadas no Laboratório de Sistemática e Bioecologia de Parasitoides e Predadores (LSBPP), da APTA de Ribeirão Preto, sob a orientação do Dr. Nelson Wanderley Perito e da Dra. Rogéria Inês Rosa Lara, com insetos oriundos dos testes de avaliação dos parâmetros biológicos, sendo eles armazenados em etanol 100%, com posterior secagem, em secador de ponto crítico Leica EM CPD030.

Após a secagem, os insetos foram montados em alfinetes entomológicos e em placas de isopor, com as imagens obtidas em microscópio estereoscópio Leica M205C APO e câmera digital Leica DFC 295 com domo de iluminação difusa Leica LED5000 IDH, com posterior utilização do software Helicon Focus (versão 5.3), para formar imagem multifocal (sequencial).

As medidas tomadas foram: comprimento do corpo; comprimento do e largura do tórax; comprimento e largura da tíbia posterior direita; comprimento e largura da asa anterior direita; comprimento e largura do escapo e do pedicelo; e o comprimento e largura dos três primeiros antenômeros. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (D.I.C.), sendo que os dados que não apresentaram os pré-requisitos para a normalidade e homocedasticidade foram transformados e posteriormente foi realizada a análise da variância (ANOVA), com as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

As análises estatísticas dos dados morfométricos foram realizadas utilizando-se o programa SAS University Edition[®] - versão gratuita (SAS Institute, 2015).

3.3. Parâmetros biológicos de *Cotesia flavipes*

Os adultos com 12 horas de emergência, das remessas das diferentes biofábricas foram utilizados para realização do parasitismo em lagartas de *D. saccharalis*, sendo a avaliação dos parâmetros biológicos realizada com indivíduos da próxima geração. Foram utilizadas 50 lagartas parasitadas de cada biofábrica, tendo elas idade aproximada de 14 dias. As lagartas parasitadas foram então colocadas individualmente em placas de Petri de 8 cm de diâmetro X 3 cm de altura, contendo a mesma dieta utilizada pela Usina São Martinho (Singh e Moore, 1985).

Acompanhando-se o desenvolvimento desses indivíduos foi determinado o período desde o parasitismo até a formação das pupas, bem como o período pupal. Das pupas obtidas foram separadas 10 massas por biofábrica, sendo cada considerada uma repetição; essas massas foram utilizadas para a determinação do número de machos, de fêmeas (a razão sexual) e de pupas inviáveis.

Ainda, das massas de pupas obtidas foram separados adultos recém-emergidos (20 casais por biofábrica) que foram acondicionadas em tubos de ensaio de fundo chato (8 cm x 2 cm), com cada tubo contendo 2 casais de *C. flavipes*, sendo assim realizadas 10 repetições, com 2 casais cada, para cada biofábrica, com a longevidade dos adultos avaliada a cada 6 horas.

Para a análise dos resultados foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com testes paramétricos de Análise de Variância (ANOVA) quando as

amostras apresentaram os requisitos de homocedasticidade e normalidade; quando não apresentavam esses requisitos, mesmo com as devidas transformações, foram realizadas análises não paramétricas de comparação de médias, utilizando o método de Kruskal-Wallis, sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SAS University Edition® - versão gratuita (SAS Institute, 2015).

3.4. Teste de atividade de voo de *Cotesia flavipes*

Para os testes de voo foram utilizadas gaiolas (unidades-teste) feitas de tubos de PVC, com 30 centímetros de diâmetro, sendo o interior coberto com papel cartolina de cor preta, evitando a entrada de luz pela lateral. A 6 cm da base do papel, colocado dentro da gaiola, foi realizado uma marcação, tentando cobrir todo o diâmetro interno, com 1 cm de largura onde foi colocado cola entomológica, enquanto na parte superior foi colocado um vidro também impregnado com cola entomológica; a base da gaiola foi revestida com uma espuma de três centímetros de largura, coberta com saco plástico escuro com um furo no meio para encaixe do tubo de ensaio (Figura 1), proposta por Hivizi et al. (2007) e adaptada por Hivizi et al. (2009).

No interior da gaiola foi colocado um tubo de ensaio de fundo chato (8 cm x 2 cm) contendo 3 massas de pupas (com até 24 horas da formação do casulo) e após a emergência dos adultos, foram contabilizados o número de indivíduos que permaneceram colados no anel a 6 cm da base (caminhadores), o número de insetos que ficaram colados no topo da gaiola (voadores) e o número de insetos que ficaram na base da gaiola (não voadores).

A localização das pupas no interior dos tubos e a distância do anel de cola no papel foram suficientes para permitir distância suficiente para que os adultos caminhassem durante o processo de distensão das asas, processo que geralmente demora em torno de 15 minutos, evitando assim que os voadores ficassem aderidos à cola antes de terem condições de voo.

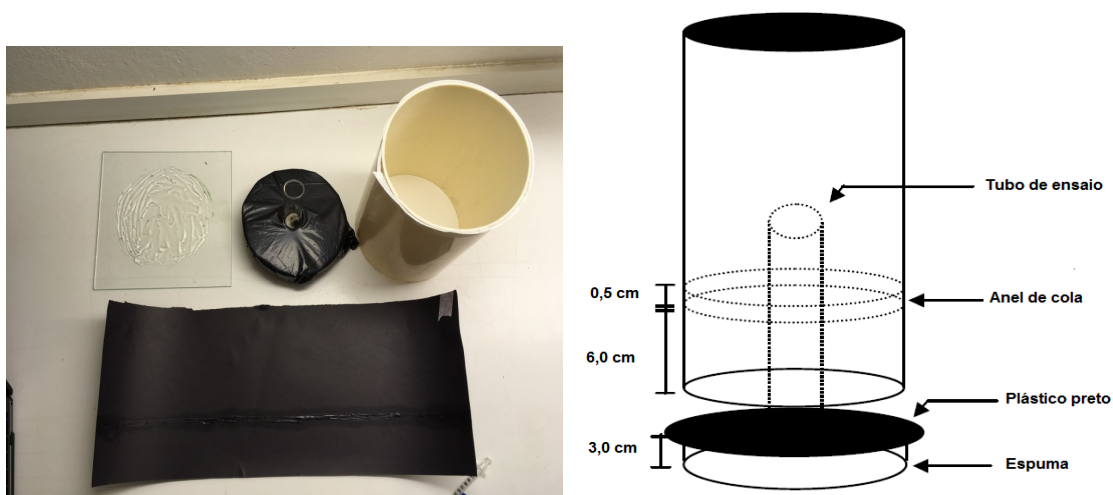


Figura 1 – Gaiola utilizada para teste de voo, proposta por Hivizi et al. (2007) e adaptada por Hivizi et al. (2009).

3.5. Avaliação do parasitismo de *Cotesia flavipes* em campo

A avaliação do parasitismo no campo foi realizada em área de plantio da Usina do Grupo São Martinho, localizada no município de Pradópolis, sendo selecionada por meio de amostragem previamente, para a confirmação de que não havia infestação de broca.

No desenho experimental foram utilizadas 8 direções, Norte, Sul, Leste, Oeste, Noroeste, Sudoeste, Nordeste e Sudeste. Em cada direção foram colocadas 2 brocas, a cada 5 metros, até atingir a distância final de 35 metros. Assim, várias circunferências foram formadas, sendo o raio aumentado progressivamente, conforme a Figura 1. No centro das circunferências formadas foram liberados um copo contendo 15 massas de parasitoides.

Para a infestação das brocas na cana-de-açúcar foram utilizadas furadeiras manuais, sendo realizados orifícios nos colmos da cana, onde foram colocadas lagartas de aproximadamente 14 dias de idade, uma por orifício.

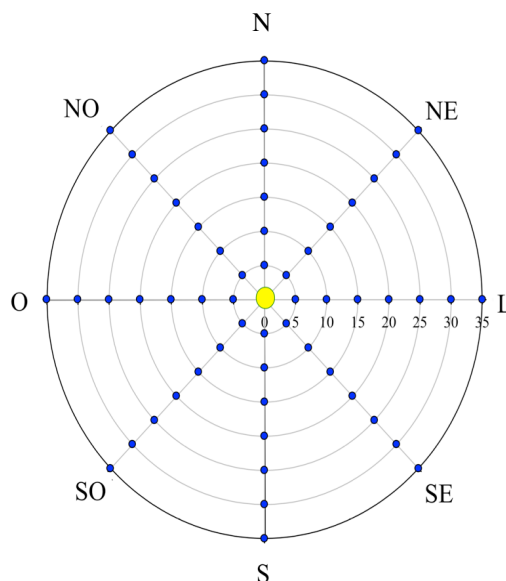


Figura 2 – Esquema da metodologia utilizada para avaliação do parasitismo de *Cotesia flavipes* em campo. Em amarelo o ponto de liberação dos parasitoides e em azul os pontos onde foram inoculadas, artificialmente, as brocas-da-cana. Norte – N; Leste – L; Oeste – O; Sul – S; Noroeste – NO; Nordeste – NE; Sudoeste – SO; e Sudeste – SE.

Após dois dias de realizada a liberação dos parasitoides, os colmos em que foram colocadas as lagartas eram colhidos e levados ao laboratório onde as lagartas recuperadas eram colocadas, individualmente, em pacas de Petri (8 cm X 3 cm) contendo dieta artificial, obtendo-se na sequência as massas de pupas, computando-se assim o número de lagartas que foram parasitadas.

Os resultados de número de lagartas parasitadas por distância foram submetidos ao contraste com níveis equidistantes, para verificar qual o modelo adequado para representar os dados (linear, quadrático ou cúbico), sendo utilizado o maior grau significativo ($P < 0,05$). Em seguida, os dados de lagartas parasitadas em cada distância foram submetidos à análise de regressão utilizando o SAS University Edition® - versão gratuita (SAS Institute, 2015). Os números de lagartas parasitadas em cada distância e em cada ponto cardinal (norte, sul, leste e oeste) e colateral (nordeste, sudeste, noroeste e sudoeste) foram utilizados para a construção do

gráfico de dispersão do parasitoide liberado, utilizando o “software” Sigmaplot v.10.0-SYSTAT (SAS Institute, 2015).

3.6. Análise do DNA de *Cotesia flavipes*

Nessa parte experimento foram utilizados insetos oriundos das quatro biofábricas brasileiras, além de uma amostra contendo exemplares de *C. flavipes*, coletada na cidade de Islamabad, Paquistão-PK.

3.6.1. Coleta e preservação de *Cotesia flavipes* para a realização do sequenciamento do DNA mitocondrial

Os parasitoides do Paquistão foram coletados em cultura do milho (*Zea mays* L.) emergidos de lagartas de *Chilo paterillus* Swinhoe, 1885 (Lepidoptera: Crambidae), hospedeiro comum de *C. flavipes* naquele país.

Os indivíduos do Brasil e do Paquistão foram armazenados em etanol 95-100% para preservação, inclusive do DNA. As análises moleculares foram realizadas com a supervisão do Prof. Dr. Neil Crickmore, no “*Bacillus thuringiensis* Laboratory, School of Life Sciences, University of Sussex”, Brighton, Inglaterra.

3.6.2. Condições para realização do PCR

A região mitocondrial Citocromo C Oxidase subunidade I (COI) do DNA foi amplificada a partir do DNA extraído, usando dois “primers”, “Forward” C1-J-1718 e “Reverse” C1-N-2329 (Tabela 1). A concentração inicial dos “primers” foi de 100 pmol/ μ L, sendo eles diluídos a 10 pmol/ μ L ou 10 μ M (1:10). A solução de DNA para a realização do PCR foi preparada com 25 μ L de “PfuUltra II Hotsart x 2 Master mix”, 1 μ L do “primer Forward” (1:10), 1 μ L do “primer Reverse” (1:10), 1 μ L do molde de DNA (100 ng/ μ L) e 22 μ L de H₂O destilada, com o volume total do produto de DNA de 50 μ L. O mesmo volume final foi utilizado para todas as amostras.

Tabela 1 – Sequência e volume inicial dos “primers” utilizados para a amplificação da região COI do DNA mitocondrial de *Cotesia flavipes*.

Primers	Sequência (5' > 3')	Vol. 10 pmol/μL
C1-J-1718 (Forward)	GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC (26)	254
C1-N-2329 (Reverse)	ACTGTAAATATATGATGAGCTCA (23)	261

A PCR foi desenvolvida por 3 minutos a 95 °C para desnaturação inicial, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95° C por 45 segundos, anelamento a 50° C por 45 segundos, extensão de 72° C por 30 segundos e uma extensão final a 72° C por 3 minutos. Subsequentemente, os produtos dos PCRs foram colocados em um Gel de agarose a 2% (0,6 gramas de agarose diluída em 30 ml de TBE 1 solução x [44,58 M Tris; ácido bórico M 0,44; 12,49 mM EDTA] e 1,5 μL de GelRed™). As amostras foram preparadas com 5 μL do produto do PCR (DNA) e 2 μL de solução tampão, com 5 μL do marcador de DNA (“Marker” 100 bp), usado como uma referência para o peso e o tamanho das amostras.

3.6.3. Ajuste para uma ótima extração do DNA

Antes da extração do DNA foi realizado um teste preliminar para se observar quantos indivíduos eram necessários para obter um bom sinal de DNA no gel de agarose.

O DNA foi extraído utilizando o kit de extração Dneasy® Blood & Tissue Kit-Qiagen. Para tanto, foram empregados 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 indivíduos. Cada indivíduo foi macerado utilizando um pilão próprio. Após serem macerados foram adicionados 180 μL do “buffer” ATL e depois a solução foi transferida para um Eppendorf de 1,5 ou 2 ml, com subsequente agitação utilizando o “vortex” e, posteriormente, 20 μL de enzima proteinase-K foi adicionada. A solução foi mais uma vez agitada em “vortex” e incubada a 56 °C por uma hora para a quebra do tecido.

Após esse processo, utilizou-se “vortex” por 15 segundos para mistura da solução, adicionando 200 µL do “buffer” AL e 200 µL de etanol (96-100%) e mais uma vez a solução foi levada ao “vortex”. Essa mistura foi pipetada e colocada em um tubo de coleta de 2 ml com uma coluna de DNeasy “mini spin”, sendo essa solução centrifugada por 1 minuto em 8000 rpm, com o líquido filtrado e o tubo de coleta sendo descartados. A coluna de DNeasy “spin” foi colocada em um novo tubo de coleta e 500 µL do “buffer” AW1 foi adicionado, sendo essa solução centrifugada por 1 minuto em 8000 rpm. O líquido filtrado e o tubo de coleta foram descartados novamente. A coluna de DNeasy “mini spin” foi colocada em um novo tubo de coleta de 2 ml e 500 µL do “buffer” AW2, sendo centrifugado por 3 minutos em 14000 rpm, com o líquido e o tubo de coleta descartados novamente. A coluna de DNeasy foi transferida para um tubo Eppendorf de micro centrífuga de 1,5 ou 2 ml. O DNA foi lavado com 200 µL do “buffer” AE e colocado no centro da membrana da coluna; após esse processo a solução foi incubada por 1 minuto na temperatura da sala (15-25 °C) e posteriormente centrifugada por 1 minuto a 8000 rpm. O produto total de DNA foi preservado em um tubo Eppendorf de 1,5 ou 2 ml, na temperatura 20 °C.

Para confirmar a extração do DNA foi realizada a eletroforese em gel de agarose na concentração 1% (0,3 gramas de agarose diluída em 30 ml de solução 1x TBE [44,58 M Tris; 0,44 M Ácido Bórico; 12,49 mM EDTA] e 1,5 µL de GelRed™). As amostras utilizadas no gel foram preparadas usando 5 µL do DNA extraído, 5 µL de H₂O destilada e 2 µL de “loading buffer”. A eletroforese foi realizada por 30 minutos utilizando uma corrente de 120 V/ 400 mA.

3.6.4. Extração do DNA de *Cotesia flavipes*

O DNA foi extraído utilizando o kit de extração Dneasy® Blood & Tissue Kit-Qiagen. Após a realização do teste para saber quantos indivíduos eram necessários para obter uma banda forte de DNA, determinou-se o número de 10 indivíduos para a extração final, sendo, então, utilizados 10 indivíduos para cada amostra. O DNA foi extraído seguindo os mesmos passos mencionados anteriormente.

O produto total de DNA foi preservado em tubo Eppendorf de 1,5 ou 2 ml na temperatura 20 °C. A extração foi realizada para as seguintes amostras de *C. flavipes* (São Paulo-SP, Goiás-GO, Alagoas-AL, Mato Grosso-MT e Paquistão-PK).

Para confirmar a extração do DNA foi feito a eletroforese em gel de agarose na concentração 1% (0,3 gramas de agarose diluída em 30 ml de solução 1x TBE [44,58 M Tris; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA] e 1,5 µL de GelRed™). As amostras utilizadas no gel foram preparadas usando 5 µL do DNA extraído, 5 µL de H₂O destilada e 2 µL de “loading buffer”. A eletroforese foi processada por 30 minutos utilizando uma corrente de 120 V/ 400 mA.

3.6.5. Purificação do DNA

As bandas obtidas no gel de agarose foram visualizadas em transiluminador (comprimento de onda do ultravioleta fonte 360 nm). Posteriormente, as bandas foram removidas ainda no interior do transiluminador utilizando um bisturi, cortando-se somente a parte desejada. Em seguida, cada parcela de DNA foi colocada, separadamente, em tubos Eppendorf de 1,5 ml. Foram utilizados 600 µL de “buffer” do QG-solubilização, sendo que após a adição do “buffer” a solução foi aquecida a 50-55 °C, em um termostato de bloco e agitado ocasionalmente até que a banda do gel de DNA fosse dissolvida por completo. Após a total dissolução, o conteúdo foi centrifugado por 5 segundos, então todos os DNA purificados foram transferidos, com o auxílio de uma pipeta, para uma coluna (fornecida com o Kit) e centrifugados por 30 segundos. Após a filtragem do DNA, o líquido não aproveitado foi descartado manualmente. Após a filtragem, 500 µL de tampão QG foram adicionados e na sequência centrifugado por 30 segundos, sendo novamente descartado o líquido não utilizado. Mais 750 µL de “buffer” PE foi adicionado e centrifugado por 30 segundos. Após esse procedimento, a coluna (filtro) foi colocada em um novo tubo Eppendorf. Mais 30 µL de “buffer” foram adicionados.

A concentração das amostras de DNA (ng/µL) foram medidas utilizando Nano Drop 2000 Thermo Scientific. Antes e depois de cada medição, 1 µL do “buffer” EB, foi utilizado para limpar a máquina, sendo o mesmo processo seguido para todas as amostras.

3.6.6. Sequenciamento do DNA purificado

Após a purificação do DNA, 15 µL de cada amostra foi colocada, separadamente, em um Eppendorf, além de 30 µL do “primer forward” (5 µL para cada amostra) também foi colocado em outro Eppendorf. As amostras (15 µL) e o “primer forward” (30 µL) (todas as amostras) foram enviadas ao serviço de sequenciamento (Eurofins Genomics).

3.7. BLAST/Análise filogenética

As sequências obtidas foram analisadas comparando com outras sequências do gene COI do DNA de *C. flavipes* de outras partes do mundo, disponíveis no banco de dados N.C.B.I (“National Center for Biotechnology Information”) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A sequência de alinhamento foi comparada usando Clustal W, sendo uma árvore filogenética gerada pelo programa MEGA7 (MUSCLE) (Kumar et al., 2016), pelo método de máxima verossimilhança, para análise da similaridade genética entre os insetos das diferentes biofábricas produtoras de *C. flavipes* no Brasil e os insetos coletados no Paquistão, para sequências do gene COI.

4. RESULTADOS

4.1. Imagens e morfometria de *Cotesia flavipes*

As imagens obtidas de *C. flavipes* foram utilizadas para a realização da morfometria da tíbia, antena, tórax e asa, bem como para ilustrar as características morfológicas dos adultos, machos e fêmeas (Figuras 3 a 12), sendo as medidas tomadas sempre na maior extensão.



Figura 3 – Vista lateral de fêmea de *Cotesia flavipes* (foto: R.F. Santos).



Figura 4 – Vista lateral de macho de *Cotesia flavipes* (foto: R.F.Santos).



Figura 5 – Vista lateral do tórax de *Cotesia flavipes* (foto: R.F. Santos).



Figura 6 – Vista lateral da tíbia posterior direita de *Cotesia flavipes* (foto: R.F. Santos).

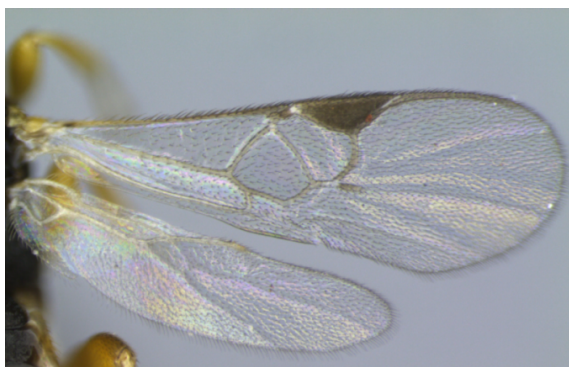


Figura 7 – Asas posterior e anterior direitas de *Cotesia flavipes* (foto: R.F. Santos).



Figura 8 – Vista lateral das antenas de fêmea de *Cotesia flavipes* (foto: R.F. Santos).



Figura 9 – Vista dorsal das antenas de *Cotesia flavipes* (foto: R.F. Santos).



Figura 10 – Vista lateral da cabeça de *Cotesia flavipes*, em detalhe o escapo e o pedicelo (foto: R.F. Santos).



Figura 11 – Vista frontal da cabeça de *Cotesia flavipes*, em detalhe o escapo e o pedicelo (foto: R.F. Santos).

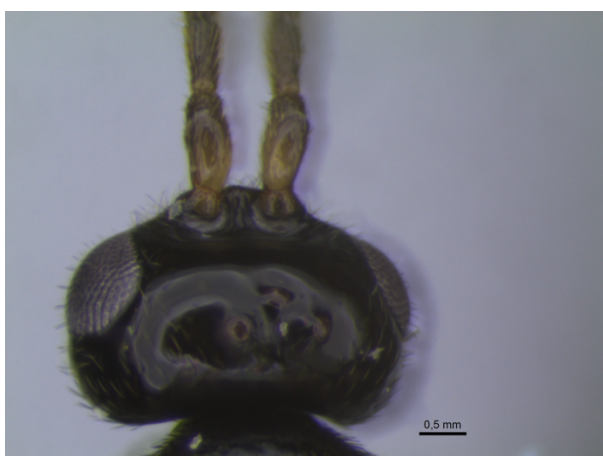


Figura 12 – Vista dorsal da cabeça de *Cotesia flavipes*, em detalhe o escapo e o pedicelo (foto: R.F. Santos).

Analisando-se as medições realizadas nas imagens obtidas para os caracteres morfológicos dos insetos das diferentes biofábricas verificou-se que para machos de *C. flavipes* o comprimento do corpo dos insetos oriundos da biofábrica de Alagoas (AL) foi o menor, com valor médio de $1,96 \pm 0,03$ mm, diferente estatisticamente dos demais, com estes semelhantes entre si e com as seguintes dimensões: $2,09 \pm 0,03$

mm (SP), $2,14 \pm 0,02$ mm (MT) e $2,15 \pm 0,04$ (GO), com o comprimento e a largura do tórax apresentando as mesmas tendências e com valores de $0,80 \pm 0,01$ mm (AL), $0,83 \pm 0,01$ (GO), $0,84 \pm 0,01$ (MT) e $0,85 \pm 0,01$ (SP), para o comprimento, e $0,42 \pm 0,01$ mm (AL), $0,44 \pm 0,01$ mm (GO e SP) e $0,46 \pm 0,01$ mm (MT) para a largura (Tabela 2). Ainda, a Tabela 2 mostra que o comprimento da tibia posterior direita e o comprimento da asa anterior direita não diferiram estatisticamente entre os insetos das quatro biofábricas; já, em relação à largura da referida asa, a biofábrica de SP produziu insetos com maior valor para o parâmetro ($0,65 \pm 0,01$ mm), com os menores para aqueles oriundos das biofábricas de MT e AL, com valores iguais a $0,61 \pm 0,01$ mm.

Tabela 2 – Comprimento do corpo, comprimento e largura do tórax, comprimento da tibia posterior direita, e comprimento e largura da asa anterior direita de machos de *Cotesia flavipes* produzidos nas diferentes biofábricas.

Biofábricas	Medidas (mm)					
	Comp. Corpo	Comp. tórax	Larg. Tórax	Tibia	Comp. Asa	Larg. asa
GO	$2,15 \pm 0,04$ a	$0,83 \pm 0,01$ ab	$0,44 \pm 0,01$ ab	$0,60 \pm 0,01$ a	$1,86 \pm 0,02$ a	$0,63 \pm 0,01$ ab
MT	$2,14 \pm 0,02$ a	$0,84 \pm 0,01$ a	$0,46 \pm 0,01$ a	$0,60 \pm 0,01$ a	$1,78 \pm 0,03$ a	$0,61 \pm 0,01$ b
AL	$1,96 \pm 0,03$ b	$0,80 \pm 0,01$ b	$0,42 \pm 0,01$ b	$0,57 \pm 0,01$ a	$1,84 \pm 0,01$ a	$0,61 \pm 0,01$ b
SP	$2,09 \pm 0,03$ a	$0,85 \pm 0,01$ a	$0,44 \pm 0,01$ ab	$0,58 \pm 0,01$ a	$1,90 \pm 0,01$ a	$0,65 \pm 0,01$ a

¹Médias \pm erro padrão seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).
GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

Quanto às fêmeas (Tabela 3), não foram encontradas diferenças significativas para os insetos produzidos nas quatro biofábricas e para comprimento do corpo, comprimento do tórax, comprimento da tibia anterior direita e o comprimento da asa anterior direita. Somente para a largura do tórax houve diferença entre os insetos, com o maior valor para aqueles oriundos do MT ($0,43 \pm 0,01$ mm) e o menor para os produzidos pela biofábrica de SP ($0,39 \pm 0,01$ mm).

Tabela 3 – Comprimento do corpo, comprimento e largura do tórax, comprimento da tíbia posterior direita, e comprimento e largura da asa anterior direita de fêmeas de *Cotesia flavipes* produzidas nas diferentes biofábricas.

Biofábrica	Medidas (mm)					
	Comp. Corpo	Comp. Tórax	Larg. Tórax	Tíbia	Comp. Asa	Larg. asa
GO	2,13 ± 0,03 a	0,81 ± 0,01 a	0,41 ± 0,01 ab	0,60 ± 0,01 a	1,80 ± 0,01 a	0,58 ± 0,01 a
MT	2,08 ± 0,02 a	0,81 ± 0,01 a	0,43 ± 0,01 a	0,58 ± 0,01 a	1,75 ± 0,01 a	0,56 ± 0,01 a
AL	2,03 ± 0,03 a	0,77 ± 0,03 a	0,41 ± 0,02 ab	0,59 ± 0,01 a	1,82 ± 0,02 a	0,59 ± 0,01 a
SP	2,03 ± 0,04 a	0,80 ± 0,01 a	0,39 ± 0,01 b	0,59 ± 0,01 a	1,78 ± 0,02 a	0,58 ± 0,01 a

¹Médias ± erro padrão seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem pelo teste de Tukey (P > 0,05).
GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

A largura dos três primeiros antenômeros contados a partir do pedicelo das antenas dos machos de *C. flavipes* produzidos nas quatro biofábricas apresentaram diferenças estatísticas, enquanto que para as fêmeas isso não ocorreu (Tabelas 4 e 5). Machos de SP tiveram as maiores dimensões para os três artículos, sendo 0,068±0,001 mm para o primeiro, 0,070±0,001 mm para o segundo e 0,071±0,001 mm para o terceiro, enquanto que os menores foram para os insetos das outras três biofábricas, variando de 0,063±0,001 mm a 0,065±0,001 mm.

Tabela 4 – Largura dos três primeiros antenômeros (A1, A2 e A3) das antenas de machos de *Cotesia flavipes* produzidos nas diferentes biofábricas.

Biofábricas	Largura (mm)		
	A1	A2	A3
GO	0,065 ± 0,001 ab	0,064 ± 0,001 c	0,065 ± 0,001 bc
MT	0,065 ± 0,001 ab	0,064 ± 0,001 c	0,064 ± 0,001 c
AL	0,063 ± 0,001 b	0,065 ± 0,001 bc	0,065 ± 0,001 bc
SP	0,068 ± 0,001 a	0,070 ± 0,001 a	0,071 ± 0,001 a

¹Médias ± erro padrão seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem pelo teste de Tukey (P > 0,05).
GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

Tabela 5 – Largura dos três primeiros antenômeros (A1, A2 e A3) das antenas de fêmeas de *Cotesia flavipes* produzidas nas diferentes biofábricas.

Bioábricas	Largura (mm)		
	A1	A2	A3
GO	0,060 ± 0,002 a	0,060 ± 0,002 a	0,060 ± 0,002 a
MT	0,058 ± 0,001 a	0,058 ± 0,001 a	0,058 ± 0,001 a
AL	0,060 ± 0,001 a	0,060 ± 0,001 a	0,060 ± 0,001 a
SP	0,059 ± 0,001 a	0,059 ± 0,001 a	0,059 ± 0,001 a

¹Médias ± erro padrão seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey (P > 0,05).
GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

Em relação ao comprimento dos três antenômeros de machos e fêmeas de *C. flavipes* (Tabelas 6 e 7), não ocorreram diferenças estatísticas entre os insetos oriundos das quatro biofábricas para nenhum deles, tendo como menores valores para o parâmetro 0,09±0,004 mm (SP e MT em A1, A2 e A3) e maior 0,12±0,025 mm (GO em A1, A2 e A3).

Tabela 6 – Comprimento dos três primeiros antenômeros (A1, A2 e A3) das antenas de machos de *Cotesia flavipes* produzidos nas diferentes biofábricas.

Biofábricas	Comprimento (mm)		
	A1	A2	A3
GO	0,14 ± 0,003 a	0,14 ± 0,003 a	0,13 ± 0,003 a
MT	0,15 ± 0,003 a	0,15 ± 0,002 a	0,14 ± 0,003 a
AL	0,14 ± 0,003 a	0,14 ± 0,003 a	0,13 ± 0,003 a
SP	0,14 ± 0,003 a	0,14 ± 0,003 a	0,14 ± 0,003 a

¹Médias ± erro padrão seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem pelo teste de Tukey (P > 0,05).
GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

Tabela 7 – Comprimento dos três primeiros antenômeros (A1, A2 e A3) das antenas de fêmeas de *Cotesia flavipes* produzidas nas diferentes biofábricas.

Biofábricas	Comprimento (mm)		
	A1	A2	A3
GO	0,120 ± 0,025 a	0,120 ± 0,025 a	0,120 ± 0,025 a
MT	0,090 ± 0,004 a	0,090 ± 0,004 a	0,090 ± 0,004 a
AL	0,100 ± 0,003 a	0,100 ± 0,003 a	0,100 ± 0,003 a
SP	0,090 ± 0,004 a	0,090 ± 0,004 a	0,090 ± 0,004 a

¹Médias ± erro padrão seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).
GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

Na Tabela 8 encontram-se os resultados médios para o comprimento e a largura do escapo e do pedicelo de machos produzidos nas quatro biofábricas, sendo que tanto para o comprimento quanto para a largura não ocorreram diferenças significativas, com valores médios variando de $0,09 \pm 0,03$ mm a $0,11 \pm 0,02$ mm e $0,04 \pm 0,001$ mm e $0,06 \pm 0,01$ mm, respectivamente para o comprimento do escapo e do pedicelo, e de $0,08 \pm 0,001$ mm a $0,10 \pm 0,03$ mm e $0,05 \pm 0,001$ mm e $0,07 \pm 0,02$ mm, respectivamente para a largura dessas estruturas, respectivamente.

Em relação às fêmeas (Tabela 9), a mesma situação foi encontrada (sem diferença significativa), sendo a variação dos valores médios para o comprimento e para a largura do escapo de $0,08 \pm 0,003$ mm a $0,12 \pm 0,027$ mm e $0,07 \pm 0,002$ mm a $0,08 \pm 0,002$ mm, respectivamente, enquanto que para o pedicelo foram de $0,05 \pm 0,002$ mm a $0,06 \pm 0,014$ mm e de $0,05 \pm 0,001$ mm, respectivamente comprimento e largura.

Tabela 8 – Comprimento e largura do escapo e do pedicelo das antenas de machos de *Cotesia flavipes* produzidos nas diferentes biofábricas.

Biofábricas	Comprimento (mm)		Largura (mm)	
	Escapo	Pedicelo	Escapo	Pedicelo
GO	0,11 ± 0,020 a	0,05 ± 0,002 a	0,08 ± 0,001 a	0,05 ± 0,001 a
MT	0,10 ± 0,030 a	0,05 ± 0,002 a	0,10 ± 0,030 a	0,07 ± 0,020 a
AL	0,09 ± 0,030 a	0,04 ± 0,001 a	0,08 ± 0,001 a	0,05 ± 0,001 a
SP	0,10 ± 0,030 a	0,06 ± 0,010 a	0,08 ± 0,001 a	0,05 ± 0,001 a

¹Médias ± erro padrão seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem pelo teste de Kruskal Wallis ($P > 0,05$).
GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

Tabela 9 – Comprimento e largura do escapo e do pedicelo das antenas de fêmeas de *Cotesia flavipes* produzidas nas diferentes biofábricas.

Biofábricas	Comprimento (mm)		Largura (mm)	
	Escapo	Pedicelo	Escapo	Pedicelo
GO	0,09 ± 0,004 a	0,06 ± 0,014 a	0,07 ± 0,002 a	0,05 ± 0,001 a
MT	0,12 ± 0,027 a	0,05 ± 0,001 a	0,07 ± 0,002 a	0,05 ± 0,001 a
AL	0,09 ± 0,002 a	0,05 ± 0,001 a	0,08 ± 0,001 a	0,05 ± 0,001 a
SP	0,08 ± 0,003 a	0,05 ± 0,002 a	0,08 ± 0,002 a	0,05 ± 0,001 a

¹Médias ± erro padrão seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Kruskal Wallis ($P > 0,05$).
GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

4.2. Parâmetros biológicos de *Cotesia flavipes*

A Tabela 10 contém os resultados médios obtidos para o período que vai da oviposição até a formação das massas de pupas, mostrando diferenças estatísticas entre as biofábricas e nas quatro remessas. Na primeira remessa, a biofábrica de SP se destacou das demais por apresentar o menor período de tempo para o parâmetro ($10,90 \pm 0,10$ dias), com os indivíduos oriundos da biofábrica do MT tendo o maior valor ($16,60 \pm 0,16$ dias); na segunda remessa, SP continuou com o mesmo valor, enquanto MT e GO apresentaram o maior período ($14,20 \pm 0,13$ dias); na terceira remessa SP manteve-se com o menor valor ($12,90 \pm 0,10$ dias), semelhante à AL, enquanto GO apresentou o período mais longo para o parâmetro ($14,20 \pm 0,13$ dias); na quarta remessa repetiu-se o encontrado para a primeira, com SP apresentando o menor valor ($10,90 \pm 0,10$ dias) e MT o maior ($14,90 \pm 0,10$). Assim, de uma maneira geral observa-se que os insetos das biofábricas de SP, AL e GO completaram os períodos de incubação + larval em um tempo mais curto, enquanto que o mais longo ficou para aqueles da biofábrica do MT. A Tabela 10 ainda mostra, em relação ao parâmetro comentado, certa falta de uniformidade na produção em relação às remessas das quatro biofábricas.

Tabela 10 – Período de tempo desde a oviposição até a formação das massas de pupas de *Cotesia flavipes* produzidas nas diferentes biofábricas, valores médios de quatro remessas.

Biofábricas	Período de oviposição a pupa (dias)			
	1ª remessa	2ª remessa	3ª remessa	4ª remessa
MT	16,60 ± 0,16 Aa	14,20 ± 0,13 Ca	10,90 ± 0,10 Dc	14,90 ± 0,10 Ba
GO	12,50 ± 0,16 Bb	14,20 ± 0,13 Aa	14,20 ± 0,13 Aa	11,70 ± 0,15 Cc
AL	11,60 ± 0,16 Bc	12,90 ± 0,10 Ab	12,90 ± 0,10 Ab	12,90 ± 0,10 Ab
SP	10,90 ± 0,10 Bd	10,90 ± 0,10 Bc	12,90 ± 0,10 Ab	10,90 ± 0,10 Bd

Médias ± erro padrão seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

A Tabela 11 mostra os resultados médios para o período pupal de *C. flavipes* para as quatro biofábricas e remessas, evidenciando diferenças estatísticas entre as biofábricas, bem como entre as remessas. Na primeira remessa, a biofábricas de GO se destacou das demais por apresentar o menor período de tempo para a fase de pupa (5,70±0,15 dias), com os indivíduos oriundos das demais biofábricas tendo os maiores valores para o parâmetro (6,90±0,23 dias, 6,90±0,19 e 7,10±0,23 dias, respectivamente para AL, SP e MT); na segunda remessa, o menor valor foi para MT, com 3,10±0,10 dias, e os maiores para GO e AL, respectivamente 6,70±0,15 dias e 6,60±0,16 dias; na terceira remessa, MT apresentou o menor valor (3,70±0,26 dias), com os maiores para AL, GO e SP, sendo, respectivamente, 6,50±0,16 dias, 6,30±0,15 dias e 6,20±0,24 dias, semelhantes entre si; na quarta remessa repetiu-se o ocorrido na terceira, com os valores sendo 3,10±0,10 dias para MT, 5,80±0,13 dias para AL, 5,90±0,18 para GO e 5,90±0,10 para SP. Assim, analisando as quatro remessas conjuntamente verifica-se que os indivíduos produzidos na biofábrica do MT apresentam o período pupal mais curto. Pela Tabela 12 observa-se também que, em relação ao período pupal e as remessas, as biofábricas de SP e MT apresentam maior uniformidade de produção em relação à AL e GO.

Tabela 11 – Período de pupa até a emergência de adultos (pupal) de *Cotesia flavipes* produzidas nas diferentes biofábricas, valores médios de quatro remessas.

Biofábricas	Período pupal (dias)			
	1ª remessa	2ª remessa	3ª remessa	4ª remessa
MT	7,10 ± 0,23 Aa	3,10 ± 0,10 Bc	3,70 ± 0,26 Bb	3,10 ± 0,10 Bb
GO	5,70 ± 0,15 Bb	6,70 ± 0,15 Aa	6,30 ± 0,15 ABa	5,90 ± 0,18 Ba
AL	6,90 ± 0,23 Aa	6,60 ± 0,16 Aa	6,50 ± 0,16 Aa	5,80 ± 0,13 Ba
SP	6,90 ± 0,19 Aa	5,10 ± 0,10 Cb	6,20 ± 0,24 Ba	5,90 ± 0,10 Ba

Médias ± erro padrão seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

O número médio de machos produzidos (Tabela 12) apresentou diferenças estatísticas tanto entre as biofábricas quanto entre as remessas. Na primeira remessa, a biofábrica de GO se destacou das demais por apresentar o maior número de machos produzidos ($31,30 \pm 5,90$), diferindo das demais ($5,70 \pm 1,04$, $11,60 \pm 4,70$ e $20,70 \pm 5,90$, respectivamente para AL, MT e SP). Nas outras três remessas os valores foram semelhantes entre as biofábricas, variando de cerca de 8 a 24 machos produzidos. A referida tabela também mostra uma maior uniformidade de produção de machos para as biofábricas de SP e MT.

Tabela 12 – Número de machos de *Cotesia flavipes* produzidos nas diferentes biofábricas, valores médios de quatro remessas.

Biofábricas	1ª remessa	2ª remessa	3ª remessa	4ª remessa
AL	5,70 ± 1,04 Bb	16,50 ± 2,70 Aa	15,10 ± 4,40 ABa	14,50 ± 5,20 Aba
GO	31,30 ± 5,90 Aa	12,20 ± 3,60 ABa	11,90 ± 1,60 ABa	9,10 ± 3,90 Ba
MT	11,60 ± 4,70 Ab	13,70 ± 5,10 Aa	14,00 ± 3,40 Aa	23,10 ± 8,30 Aa
SP	20,70 ± 5,90 Aab	7,90 ± 1,50 Aa	16,50 ± 2,70 Aa	17,80 ± 3,80 Aa

Médias ± erro padrão seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

A produção média de fêmeas (Tabela 13) apresentou diferenças estatísticas tanto entre as biofábricas, quanto entre as remessas. Na primeira remessa, a biofábrica de AL se destacou das demais por apresentar o maior número de fêmeas produzidas ($40,0 \pm 5,1$), diferindo das demais ($9,8 \pm 4,6$, $18,1 \pm 3,5$ e $27,2 \pm 7,2$, respectivamente para GO, MT e SP). Na segunda, bem como na terceira remessa, os valores foram semelhantes para o número de fêmeas produzidas nas diferentes biofábricas, apresentando variação de 25,9 a 42,1 e 23,7 a 48,4 fêmeas, respectivamente na segunda e terceira remessas. Já, na quarta também ocorreu diferença estatística entre as biofábricas, com AL e SP produzindo, respectivamente, $60,3 \pm 3,3$ e $52,1 \pm 2,5$ fêmeas, enquanto GO e MT apresentaram $17,4 \pm 4,2$ e $21,7 \pm 8,6$ fêmeas, respectivamente. A Tabela 13 ainda evidencia a maior uniformidade da biofábrica de MT em produzir fêmeas.

Tabela 13 – Número de fêmeas de *Cotesia flavipes* produzidas nas diferentes biofábricas, valores médios de quatro remessas.

Biofábricas	1ª remessa	2ª remessa	3ª remessa	4ª remessa
AL	$40,0 \pm 5,1$ ABa	$25,9 \pm 5,0$ Ba	$48,4 \pm 7,8$ ABa	$60,3 \pm 3,3$ Aa
GO	$9,8 \pm 4,6$ Bb	$33,9 \pm 8,6$ ABa	$44,1 \pm 7,5$ Aa	$17,4 \pm 4,2$ ABb
MT	$18,1 \pm 3,5$ Ab	$33,4 \pm 4,6$ Aa	$38,2 \pm 7,1$ Aa	$21,7 \pm 8,6$ Ab
SP	$27,2 \pm 7,1$ Bab	$42,1 \pm 7,5$ ABa	$23,7 \pm 4,9$ Ba	$52,1 \pm 2,5$ Aa

Médias \pm erro padrão seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

O número de pupas inviáveis (Tabela 14) mostrou diferenças estatísticas entre as biofábricas, bem como nas remessas. Na primeira remessa, a biofábrica do MT se

destacou das demais por apresentar o menor número de pupas inviáveis ($5,5 \pm 0,9$), diferindo das demais ($10,3 \pm 2,7$, $18,1 \pm 4,4$ e $19,6 \pm 2,2$, respectivamente para AL, GO e SP). Na segunda a biofábrica de MT continuou produzindo um menor número de pupas inviáveis ($6,8 \pm 2,0$) com AL apresentando o maior valor ($18,5 \pm 4,0$). Na terceira remessa ocorreu uma brusca alteração com a biofábrica de MT dando o maior número de pupas inviáveis ($37,7 \pm 10,6$) e AL o menor ($4,6 \pm 1,9$). Já, na quarta remessa maiores valores para o parâmetro em análise foram para MT ($29,0 \pm 6,5$) e GO ($28,4 \pm 5,6$), enquanto AL e SP tiveram os menores números de pupas inviáveis, $3,8 \pm 1,6$ e $6,0 \pm 1,2$, respectivamente. Considerando-se as quatro remessas pode-se verificar que os menores números de pupas inviáveis foram encontrados com insetos oriundos das biofábricas de AL e SP, e que a desuniformidade de produção medida por esse parâmetro aconteceu para todas as quatro biofábricas.

Tabela 14 – Número de pupas inviáveis de *Cotesia flavipes* produzidas nas diferentes biofábricas, valores médios de quatro remessas.

Biofábricas	1ª remessa	2ª remessa	3ª remessa	4ª remessa
AL	$10,3 \pm 2,7$ ABab	$18,5 \pm 4,0$ Aa	$4,6 \pm 1,9$ Bb	$3,8 \pm 1,6$ Bb
GO	$18,1 \pm 4,4$ ABa	$14,5 \pm 2,1$ ABab	$9,8 \pm 2,2$ Bb	$28,4 \pm 5,6$ ABa
MT	$5,5 \pm 0,9$ Bb	$6,8 \pm 2,0$ Bb	$37,7 \pm 10,6$ Aa	$29,0 \pm 6,5$ Aa
SP	$19,6 \pm 2,2$ Aa	$9,5 \pm 1,4$ ABab	$15,1 \pm 5,5$ ABab	$6,0 \pm 1,2$ Bb

Médias \pm erro padrão seguidas de letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

A razão sexual de *C. flavipes* foi significativamente diferente nas remessas 1, 2 e 3, para todas as biofábricas, exceto SP, e entre as biofábricas apenas nas remessas 1 e 4 (Tabela 15), mostrando uma enorme variação entre as biofábricas e as remessas, com valores entre $0,10 \pm 0,20$ a $0,60 \pm 0,10$.

Tabela 15 – Médias da razão sexual de *Cotesia flavipes* produzidas nas biofábricas, valores de quatro remessas.

Biofábricas	1ª remessa	2ª remessa	3ª remessa	4ª remessa
MT	0,20 ± 0,10 ABb	0,30 ± 0,20 ABa	0,60 ± 0,30 Aa	0,10 ± 0,20 Bb
GO	0,60 ± 0,10 Ca	0,40 ± 0,30 ABa	0,50 ± 0,30 Aa	0,10 ± 0,20 BCb
AL	0,40 ± 0,20 ABab	0,30 ± 0,20 Ba	0,60 ± 0,30 Aa	0,60 ± 0,20 Aa
SP	0,20 ± 0,20 Ab	0,50 ± 0,30 Aa	0,20 ± 0,20 Aa	0,50 ± 0,20 Aa

Médias ± erro padrão seguidas de letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

4.3. Longevidade de adultos de *Cotesia flavipes*

A longevidade média de fêmeas e de machos de *C. flavipes* nas diferentes biofábricas e remessas estão descritas nas Tabelas 16 e 17, observando-se diferenças estatísticas tanto para as biofábricas como para as quatro remessas.

Para as fêmeas (Tabela 16), nas quatro remessas e entre biofábricas ocorreram diferenças estatísticas nas amostragens. Na primeira remessa o maior período de vida foi para fêmeas oriundas de SP (40,00±8,00 horas), enquanto que o menor foi com aqueles de AL e GO (ambos com 24,00±6,53 horas). Já na segunda remessa SP foi o menor (16,00±5,65 horas) e MT o maior (32,00±7,30 horas), sendo que MT continuou mais longo na terceira remessa (36,00±7,65 horas) e GO o menos (20,00±6,11 horas). Na quarta remessa, os indivíduos oriundos da biofábrica de AL tiveram a maior longevidade (24,00±17,3 horas), enquanto que os de GO foram os menos longevos (12,00±5,16 horas). Não ocorreu uniformidade na longevidade das fêmeas medida nas quatro remessas.

Para os machos (Tabela 17), SP na primeira remessa, AL na segunda, MT na terceira e GO na quarta foram as biofábricas que produziram indivíduos mais longevos (40,00±8,00 horas, 32,00±7,30 horas, 40,00±8,00 horas e 32,0±7,39 horas, respectivamente), sendo, no geral, os insetos originários de GO aqueles que apresentaram período de vida adulta mais curto. Também para os machos, as

produções das quatro biofábricas não demonstraram uniformidade nas remessas para o parâmetro longevidade.

Tabela 16 – Longevidade, em horas, de fêmeas de *Cotesia flavipes* produzidas nas diferentes biofábricas.

Biofábrica	1ª remessa	2ª remessa	3ª remessa	4ª remessa
MT	32,00 ± 7,30 Bb	32,00 ± 7,30 Ba	36,00 ± 7,65 Aa	20,00 ± 6,11 Cb
AL	24,00 ± 6,53 Ac	20,00 ± 6,11 Ac	24,00 ± 6,53 Ac	24,00 ± 6,53 Ba
GO	24,00 ± 6,53 Ac	24,00 ± 6,53 Ab	20,00 ± 6,11 Bd	12,00 ± 5,16 Cd
SP	40,00 ± 8,00 Aa	16,00 ± 5,65 Cd	28,00 ± 6,92 Bb	16,00 ± 5,65 Cc

Médias ± desvio padrão seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

Tabela 17 – Longevidade, em horas, de machos de *Cotesia flavipes* produzidos nas diferentes biofábricas.

Biofábrica	1ª remessa	2ª remessa	3ª remessa	4ª remessa
MT	16,00 ± 5,65 Cc	24,00 ± 6,53 Bc	40,00 ± 8,00 Aa	24,00 ± 6,53 Bb
AL	24,00 ± 6,53 Bb	32,00 ± 7,30 Aa	16,00 ± 5,65 Cc	12,00 ± 5,16 Dc
GO	24,00 ± 6,53 Cd	28,00 ± 6,92 Bb	16,00 ± 5,65 Dc	32,00 ± 7,30 Aa
SP	40,00 ± 8,00 Aa	20,00 ± 6,11 Cd	24,00 ± 6,53 Bb	12,00 ± 5,16 Dc

Médias ± desvio padrão seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

4.4. Teste de voo de *Cotesia flavipes*

Nos testes de voo os insetos são classificados em três categorias, voadores, caminhadores e não voadores, o que permite averiguar a proporção de voadores nos

lotes produzidos pelas diferentes biofábricas, sendo esse parâmetro biológico uma característica importante para medir a qualidade da *C. flavipes* produzida massalmente.

Os resultados médios dos testes de voo para os insetos oriundos das quatro biofábricas e diferentes remessas encontram-se nas Tabelas 18, 19, 20 e 21, onde se pode verificar diferenças estatísticas entre as biofábricas e remessas.

Nesse sentido, a Tabela 18 mostra que na primeira remessa as biofábricas de MT, GO e AL produziram as maiores porcentagens de insetos voadores, sendo $89,8 \pm 2,2\%$ para MT, $87,8 \pm 1,6\%$ para GO e $84,6 \pm 1,8\%$ para AL, semelhantes entre si, enquanto que para SP foi obtido o valor mais baixo ($2,3 \pm 0,3\%$), com esta biofábrica produzindo a maior porcentagem de caminheiros ($74,2 \pm 5,2\%$). Com uma pequena redução, na segunda remessa (Tabela 19) as biofábricas de MT, GO e AL continuaram produzindo mais voadores ($52,6 \pm 5,8\%$, $36,4 \pm 6,8\%$ e $56,6 \pm 6,6\%$, respectivamente), enquanto SP apresentou maior número de caminheiros, $58,4 \pm 6,4\%$.

Na remessa três (Tabela 20), com $81,2 \pm 2,8\%$, $76,6 \pm 2,8\%$ e $75,4 \pm 5,5\%$, respectivamente, as biofábricas de AL, SP e GO foram aquelas com os maiores percentuais de insetos voadores, sobrepujando MT, que nesse lote apresentou a maior quantidade de caminheiros ($39,8 \pm 11,2\%$).

No último lote avaliado (remessa 4) (Tabela 21), SP e MT com, respectivamente, $73,8 \pm 2,0\%$ e $69,4 \pm 3,5\%$, apresentaram os maiores valores para adultos voadores diferindo de AL ($47,6 \pm 5,9\%$) e, especialmente de GO ($3,8 \pm 1,5\%$), com esta biofábrica produzindo o maior número de caminheiros ($54,6 \pm 5,1\%$).

Tabela 18 – Porcentagens de adultos voadores, caminhadores e não voadores de *Cotesia flavipes* produzidas nas diferentes biofábricas, na primeira remessa.

Biofábricas	Voador	Caminhador	Não voador
MT	89,8 ± 2,2 Aa	2,5 ± 0,5 Cb	9,6 ± 2,1 Ba
GO	87,8 ± 1,6 Aa	5,6 ± 1,7 Bb	8,8 ± 0,9 Ba
AL	84,6 ± 1,8 Aa	3,0 ± 2,0 Cb	14,6 ± 3,6 Ba
SP	2,3 ± 0,3 Cb	74,2 ± 5,2 Aa	24,6 ± 4,9 Ba

Médias ± erro padrão seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

Tabela 19 – Porcentagens de adultos voadores, caminhadores e não voadores de *Cotesia flavipes* produzidas nas diferentes biofábricas, na segunda remessa.

Biofábricas	Voador	Caminhador	Não voador
MT	52,6 ± 5,8 Aa	19,6 ± 3,7 Bb	27,8 ± 6,8 Ba
GO	36,4 ± 6,8 Aa	32,4 ± 5,1 Ab	31,0 ± 3,1 Aa
AL	56,6 ± 6,6 Aa	12,6 ± 3,8 Bb	29,7 ± 3,7 Ba
SP	7,4 ± 1,9 Cb	58,4 ± 6,4 Aa	34,2 ± 6,4 Ba

Médias ± erro padrão seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

Tabela 20 – Porcentagens de adultos voadores, caminhadores e não voadores de *Cotesia flavipes* produzidas nas diferentes biofábricas, na terceira remessa.

Biofábricas	Voador	Caminhador	Não voador
MT	53,0 ± 11,0 Ab	39,8 ± 11,2 ABa	14,0 ± 2,1 Ba
GO	75,4 ± 5,5 Aab	3,0 ± 1,04 Cb	21,4 ± 6,1 Ba
AL	81,2 ± 2,8 Aa	1,5 ± 0,5 Cb	18,2 ± 2,5 Ba
SP	76,6 ± 2,8 Aab	3,2 ± 2,7 Cb	20,2 ± 2,1 Ba

Médias ± erro padrão seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

Tabela 21 – Porcentagens de adultos voadores, caminhadores e não voadores de *Cotesia flavipes* produzidas nas diferentes biofábricas, na quarta remessa.

Biofábricas	Voador	Caminhador	Não voador
MT	69,4 ± 3,5 Aa	10,2 ± 2,3 Bbc	20,2 ± 2,7 Bb
GO	3,8 ± 1,5 Bc	54,8 ± 5,1 Aa	41,4 ± 4,7 Aa
AL	47,6 ± 5,9 Ab	24,8 ± 5,9 Bb	27,4 ± 4,2 ABab
SP	73,8 ± 2,0 Aa	3,0 ± 1,6 Cc	23,4 ± 1,9 Bb

Médias ± erro padrão seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

GO = Goiás, MT = Mato Grosso, AL = Alagoas e SP = São Paulo.

4.5. Avaliação do parasitismo de *Cotesia flavipes* em campo

O experimento realizado no campo avaliou a capacidade ou o alcance do parasitismo por *C. flavipes* oriundas das biofábricas de Promissão-SP, Campo Novo do Parecis-MT, Quirinópolis-GO e Coruripe-AL, em raios concêntricos até o limite máximo de 35 metros, posicionado nas direções norte (N), sul (S), leste (L), oeste (O), nordeste (NE), noroeste (NO), sudeste (SE) e sudoeste (SO), relacionando o parâmetro com a direção predominante do vento, do dia em que foram liberadas as vespas, até quando foram recolhidas as lagartas instaladas na cultura.

A biofábrica de Promissão-SP produziu insetos que conseguiram realizar o parasitismo em todas as direções avaliadas, atingindo o limite máximo, 35 metros do ponto de liberação, nas direções oeste e sudoeste, com a maior intensidade de parasitismo na direção sul, onde foram encontradas lagartas em todos os pontos, exceto a 35 metros. Nos pontos próximos ao local de liberação ocorreu maior intensidade de lagartas parasitadas, favorecido pela direção do vento, destacando-se, porém, que também foi constatado parasitismo em direções opostas à direção predominante do vento (Figura 13).

Os resultados obtidos para as vespas produzidas na biofábrica de Promissão permitem também saber a relação entre o número de lagartas parasitadas e as

distâncias obtidas para o parasitismo em relação ao ponto de liberação. Na distância de 35 metros foram recuperadas duas lagartas parasitadas, sendo que a 5 metros houve, normalmente, o dobro do valor (Figura 14).

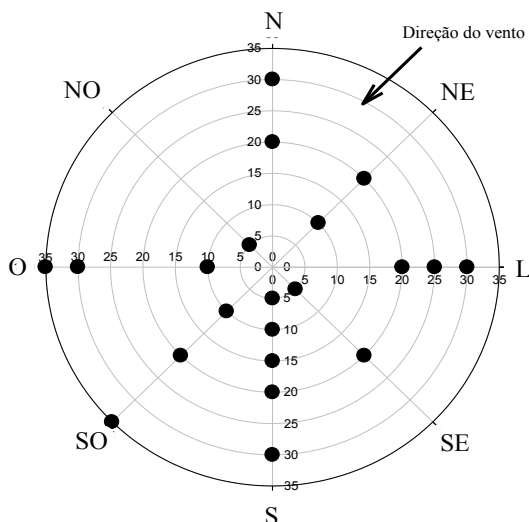


Figura 13 – Raios do parasitismo de *Cotesia flavipes* produzida pela biofábrica de Promissão-SP. Os pontos escuros demonstram a distância e a direção em que foram recuperadas lagartas parasitadas. A seta indica a direção predominante do vento.

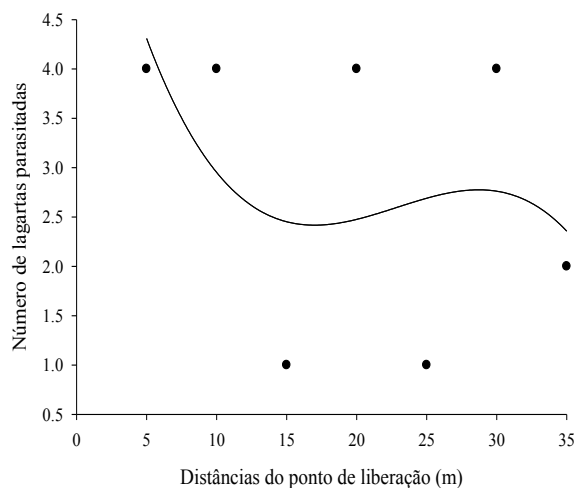


Figura 14 – Relação entre lagartas parasitadas e as distâncias do ponto de liberação. Biofábrica de Promissão-SP.

A Figura 15 mostra os raios do parasitismo realizado pelas vespas da biofábrica de Campo Novo de Parecis-MT, onde nota-se a ocorrência de brocas parasitadas nos pontos mais distantes do local de liberação, 30 (NE) e 35 (O) metros, havendo parasitismo também nos pontos mais próximos e com maior intensidade. Essa mesma figura 15 mostra também que a maior intensidade do parasitismo aconteceu no sentido da direção do vento, exceto da direção NE.

Quando se relaciona a distância em que as brocas parasitadas foram recuperadas (Figura 16), verifica-se que a 15 metros do ponto de liberação teve o maior número de brocas parasitadas (5 lagartas), sendo que a 10, 30 e 35 metros apenas uma lagarta parasitada foi recuperada (Figura 16).

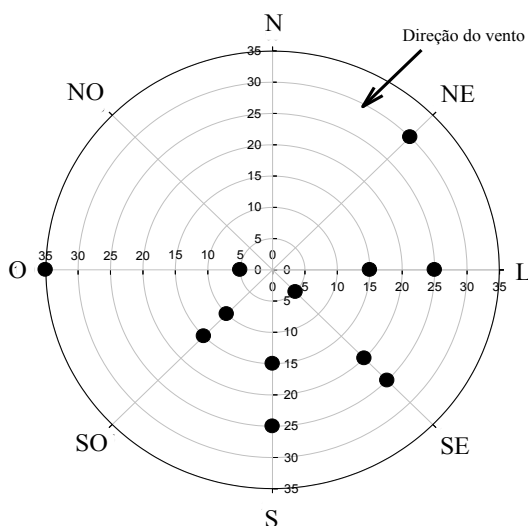


Figura 15 – Raios do parasitismo de *Cotesia flavipes* produzida pela biofábrica de Campo Novo de Parecis-MT. Os pontos escuros demonstram a distância e a direção em que foram recuperadas lagartas parasitadas. A seta indica a direção predominante do vento.

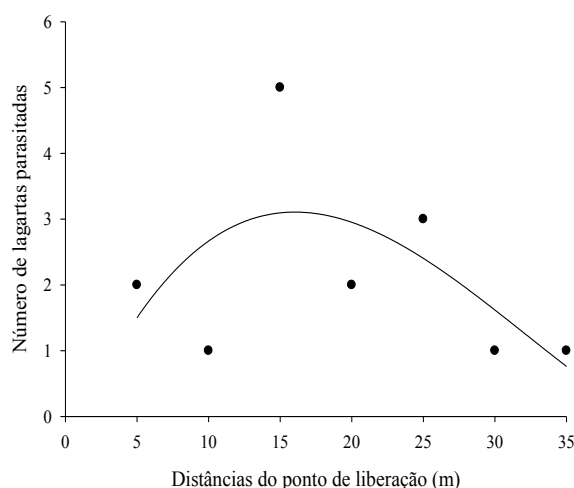


Figura 16 – Relação entre lagartas parasitadas e as distâncias do ponto de liberação. Biofábrica de Campo Novo de Parecis-MT.

A biofábrica de Quirinópolis-Goiás (Figura 17) produziu *C. flavipes* que após liberação alcançaram os hospedeiros e realizaram o parasitismo também até 35 metros de distância do ponto de soltura, na direção N, NO e SE, com a maior intensidade de parasitismo nos pontos mais próximos, com a direção sul e sudeste tendo parasitismo apenas a 5 metros do ponto de liberação, enquanto na direção oeste nada foi encontrado. A referida figura ainda mostra a concentração do parasitismo em direção contrária ao vento, exceto para SO.

O maior número de lagartas parasitadas foi recuperado a 5 metros (5 indivíduos), enquanto o menor foi a 30 metros, com a maioria dos pontos registrando 2 lagartas parasitadas (Figura 18).

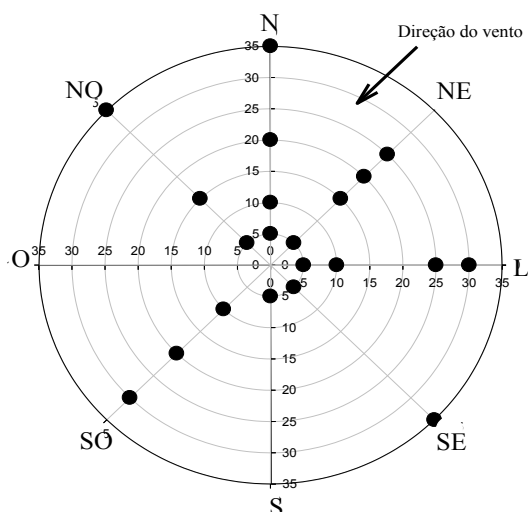


Figura 17 – Raios de parasitismo de *Cotesia flavipes* produzida pela biofábrica de Quirinópolis-GO. Os pontos escuros demonstram a distância e a direção em que foram recuperadas lagartas parasitadas. A seta indica a direção predominante do vento.

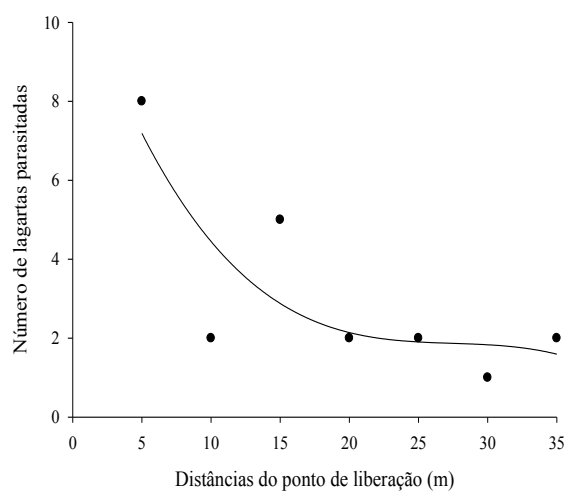


Figura 18 – Relação entre lagartas parasitadas e as distâncias do ponto de liberação. Biofábrica de Quirinópolis-GO.

Os adultos de *C. flavipes* produzidos na biofábrica de Coruripe-AL conseguiram realizar o parasitismo em um menor número de direções que os das biofábricas de SP e MT, com a inexistência de lagartas parasitadas recuperadas para SO e SE, salientando-se que nesse caso a concentração do parasitismo se deu em direção contrária à do vento (Figura 19).

A maior quantidade de brocas recuperadas e parasitadas ocorreu na distância de 5 metros do ponto de liberação, enquanto que a 30 e 35 metros apenas uma lagarta, em cada ponto, foi recuperada (Figura 20).

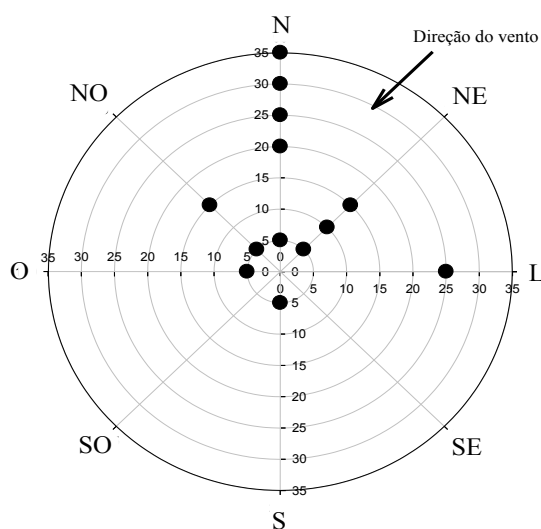


Figura 19 – Raios de parasitismo de *Cotesia flavipes* produzida pela biofábrica de Coruripe-AL. Os pontos escuros demonstram a distância e a direção em que foram recuperadas lagartas parasitadas. A seta indica a direção predominante do vento.

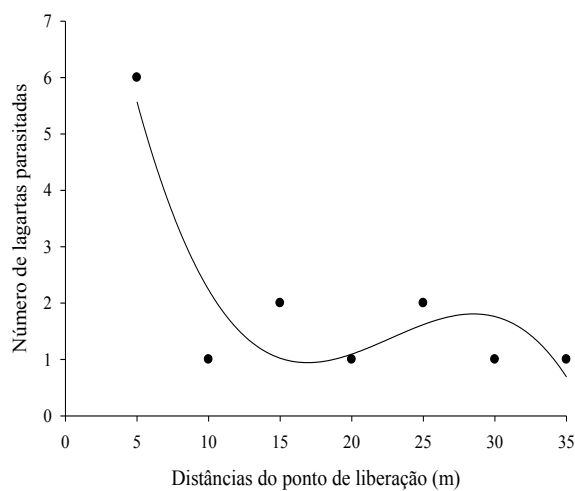


Figura 20 – Relação entre lagartas parasitadas e as distâncias do ponto de liberação. Biofábrica de Coruripe-AL.

4.6. Extração do DNA e condições para realização do PCR

Foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1% para a confirmação da extração do DNA de cada amostra. As bandas no gel indicam que a extração do DNA foi realizada com sucesso (Figura 21).

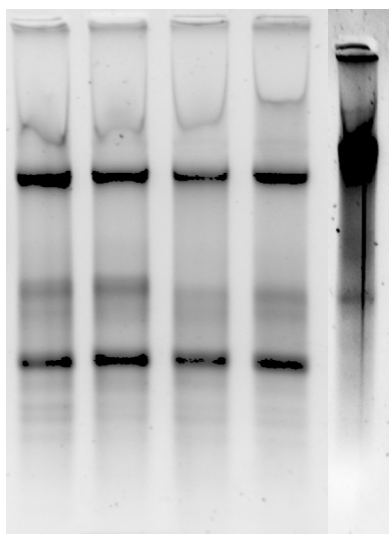


Figura 21 – Resultado da eletroforese em gel de agarose a 1%: Esquerda para direita: Alagoas (AL), Goiás (GO), Mato Grosso (MT), São Paulo (SP) e Paquistão (PK).

Após a confirmação da extração do DNA das amostras, foi realizada a reação em cadeia de polimerase (PCR) para amplificar a região do COI (Citocromo C Oxidase Subunidade I). A Figura 22 mostra a amplificação do produto de DNA que possui comprimento de aproximadamente 670 pares de base. Todas as amostras tiveram sucesso na amplificação. Por esse gel ter sido realizado apenas para a confirmação da amplificação do fragmento de DNA não foram utilizadas as amostras do Paquistão nesta etapa. Devido a baixa quantidade de insetos coletados do Paquistão, decidimos realizar diretamente a purificação do DNA.

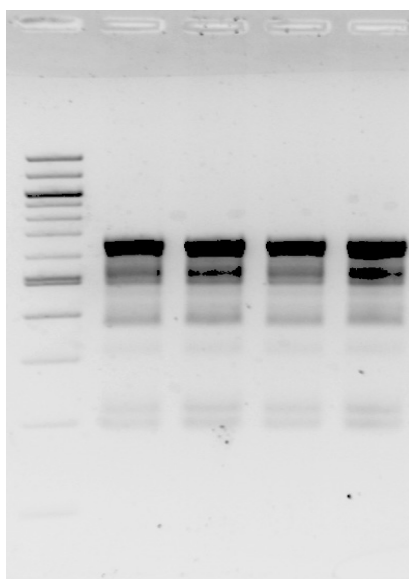


Figura 22 – Resultado da eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR com amplificação do COI das amostras das biofábricas: Da esquerda para a direita: Marcador molecular de 1000 bp, Mato Grosso (MT), Alagoas (AL), Goiás (GO) e São Paulo (SP).

4.7. Purificação do DNA

A Figura 23 mostra o gel com as amostras de DNA purificados, esse gel foi necessário para que se pudesse extrair as bandas referentes ao COI, purificar o DNA e, por fim, realizar o sequenciamento.

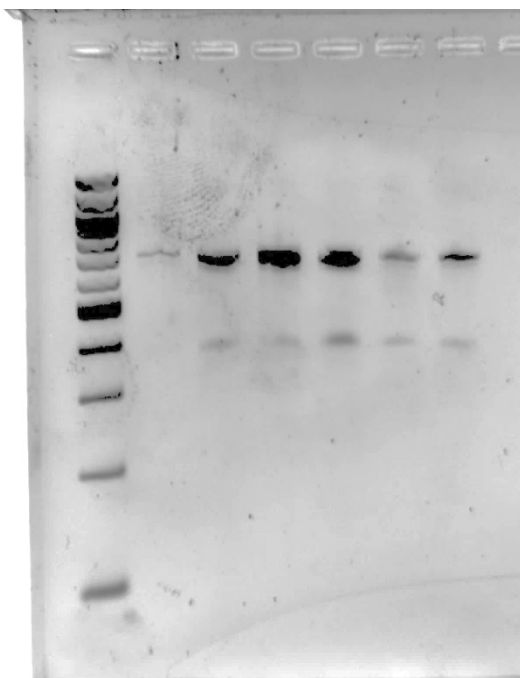


Figure 23 – Resultado da eletroforese em gel de agarose a 2%, Da esquerda para direita: Marcador molecular de 1000 bp, Mato Grosso (MT), Alagoas (AL), São Paulo (SP), Goiás (GO) e Paquistão (PK).

4.8. NBCI- BLAST/ Análise filogenética

Algumas sequências obtidas, do banco de dados do NBCI – BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), foram utilizadas para comparar a similaridade genética com outras linhagens de *C. flavipes*, de diferentes países. Foi necessário realizar uma leitura reversa dos nucleotídeos nos alinhamentos obtidos, para a comparação. A espécie *Cotesia glomerata* L. do mesmo gênero *Cotesia*, foi utilizada como um indicador de um grupo exterior, facilitando a compreensão das diferenças no

sequenciamento dos nucleotídeos. *C. glomerata* apresenta 96% de similaridade na sequência, quando comparado com as espécies deste estudo. Linhagens de *C. flavipes* que vieram de Piracicaba-BR e do Quênia apresentaram 100% de similaridade, as linhagens dos EUA, Tailândia, Flórida-EUA e Tailândia II apresentaram 99% no alinhamento dos aminoácidos; as outras linhagens avaliadas apresentaram 98% de similaridade no alinhamento. Utilizando-se os alinhamentos dos aminoácidos construiu-se uma árvore filogenética usando um método de probabilidade por máxima similaridade (Figura 24). Esse método posiciona os indivíduos com 100% de similaridade nas sequências dos nucleotídeos no mesmo ramo, no entanto, mesmo quando as sequências apresentam uma mesma porcentagem de nucleotídeos alinhados, o programa pode colocá-los em um ramo diferente, isso porque, a posição dos nucleotídeos no alinhamento pode ser diferente, nas diferentes linhagens.

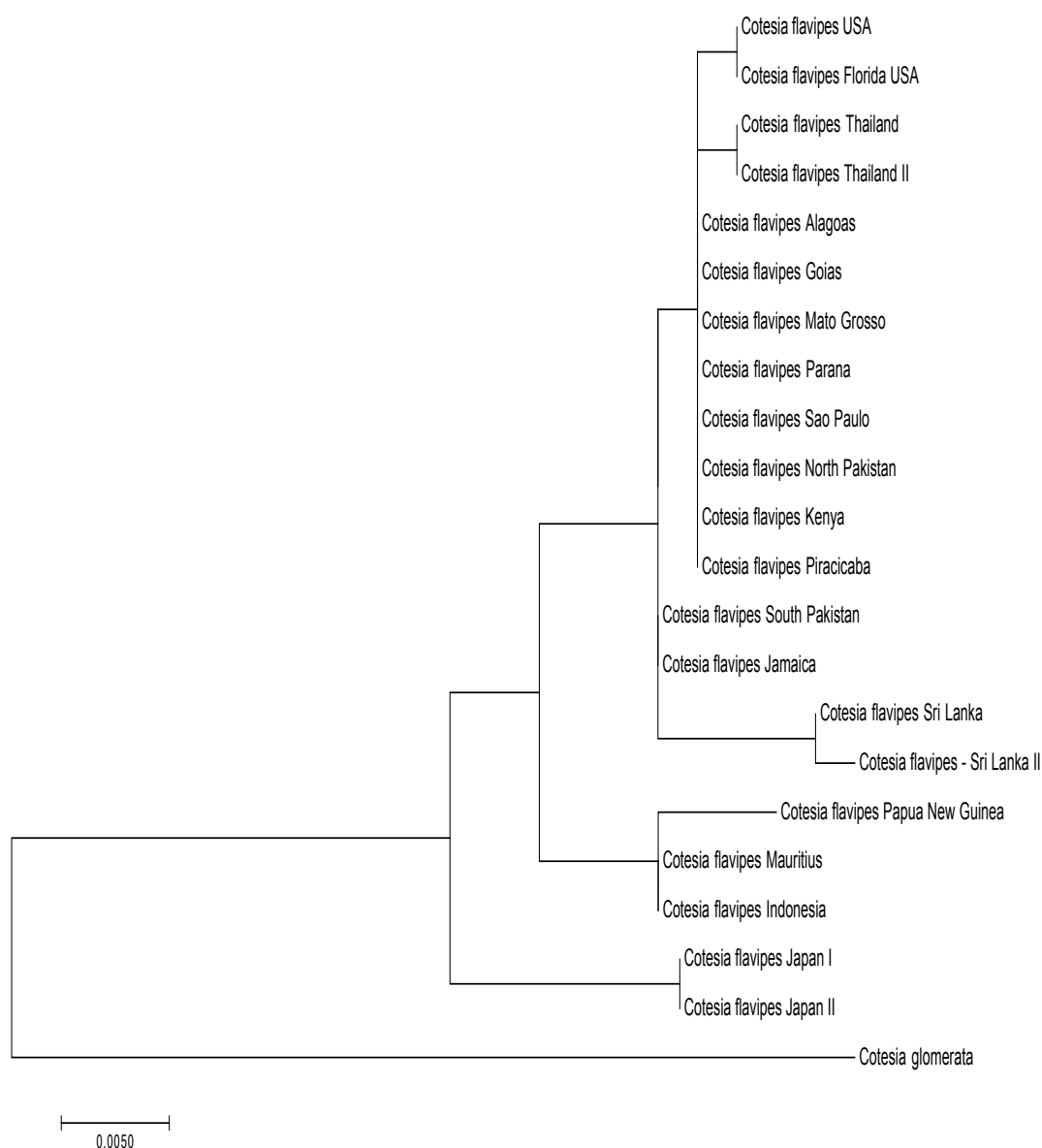


Figura 24 – Árvore filogenética construída utilizando análise molecular realizada pelo método de máxima similaridade. Espécies localizadas no mesmo ramo são semelhantes quanto a sequência de nucleotídeos da região COI do DNA mitocondrial. A análise compreendeu 22 sequências de *Cotesia* spp. (Kumar et al., 2016).

5. DISCUSSÃO

O objetivo de um laboratório de produção massa de inimigos naturais (insetos) é, segundo Prezotti et al. (2002), produzir grandes populações com indivíduos aptos para liberações em programas de controle biológico inundativo, devendo esses indivíduos passar por rigoroso controle para avaliar de forma efetiva sua qualidade, para que, quando liberados em campo alcancem o sucesso desejado no controle do

organismo-alvo. Os mesmos autores ainda citam que inimigos naturais com baixa qualidade comprometem o avanço na área de controle biológico e que os protocolos para controle de qualidade nas biofábricas são fundamentais e imprescindíveis, uma vez que o que se espera de um agente de controle biológico, segundo van Lenteren (2003), é que quando liberados sejam capazes de controlar a praga-alvo eficientemente.

Atualmente no Brasil existem vários laboratórios que produzem massalmente *C. flavipes*, mas devido à falta de protocolos que visam o controle de qualidade da criação, a eficiência dessas criações, quando os insetos são liberados no campo, pode estar seriamente comprometida (Hivizi et al., 2007; Hivizi et al., 2009; van Lenteren, 2009; Parra et al., 2011; Parra, 2014), com a espécie tendo um agravante, os produzidos no Brasil são de ancestrais comuns.

Nesse sentido, alguns autores já propuseram testes para determinar a qualidade da *C. flavipes* produzida no laboratório, como por exemplo, Hivizi et al. (2009) sugerindo que se faça a avaliação do parasitismo e da fecundidade, avaliação da porcentagem de emergência de adultos, a determinação da razão sexual, avaliação da longevidade dos adultos e a atividade de voo de machos e fêmeas recém emergidos, existindo ainda incerteza quanto aos padrões necessários para se medir qual seria a *C. flavipes* ideal a ser produzida nas biofábricas.

Apesar dessa incerteza a respeito dos padrões necessários para se produzir o inseto ideal, o estudo realizado por Trevisan et. al. (2016) mostra que, apesar de terem ancestrais comuns e por terem passado por longo processo de endogamia, *C. flavipes* não mostrou alteração em sua atividade de voo ou na capacidade de parasitismo, em testes de laboratório, mesmo com o parasitoide sendo criado por 10 gerações consecutivas e em completa consanguinidade.

Além de problemas relativos a terem ancestrais de introdução comuns e longos períodos de consanguinidade, outros fatores também podem contribuir para a maior ou menor qualidade dos insetos produzidos nas diferentes biofábricas, podendo-se citar: (1) a troca constante de material biológico entre biofábricas; (2) diferenças nas técnicas de criação, uma vez que, mesmo com padrões semelhantes, a simples alteração de procedimentos, de produtos utilizados ou de tipos recipientes de manutenção dos insetos pode resultar em efeito negativo na qualidade do inseto

produzido; (3) as condições abióticas das biofábricas; (4) modo de seleção de matrizes, tanto de *D. saccharalis* como de *C. flavipes*; (5) alterações nas dietas para *D. saccharalis*; (6) contaminações por microrganismos, como por exemplo, com *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae), que afeta a qualidade, tanto da broca como do parasitoide; e (7) número de indivíduos por recipiente de criação (Diniz et al., 2008; Simões et al., 2012; Vacari et al., 2012).

Os resultados encontrados e apresentados neste trabalho, em relação às características morfológicas e biológicas de *C. flavipes*, demonstram que as biofábricas brasileiras analisadas produzem insetos de qualidade diferente quando comparadas entre si, além de terem dificuldade em manter padrão de qualidade nos diferentes lotes, como já foi citado por Carvalho (2017), analisando insetos de 5 biofábricas do Estado de São Paulo.

Em relação aos parâmetros morfológicos avaliados, neste trabalho foram encontradas diferenças para comprimento e largura do tórax (machos), assim como para a largura da asa anterior direita (machos). Os valores obtidos para esses parâmetros foram maiores para os insetos oriundos das biofábricas de Campo Novo do Parecis (MT) e de Promissão (SP), com intervalo de variação de 0,80 a 0,85 mm e 0,42 a 0,46 mm, respectivamente para comprimento e largura do tórax, e de 0,61 a 0,65 mm para a largura da asa anterior direita também dos machos (Tabela 2). A largura das asas dos machos encontrada no presente trabalho é relativamente maior do que aquelas citadas por Trevisan (2014), que obteve valores entre 0,5 e 0,6 mm, e semelhante ao relatado por Carvalho (2017) que foi de 0,61 a 0,68 mm.

Dos parâmetros morfológicos analisados, o volume do tórax dos machos (comprimento e largura), bem como a largura de suas asas anteriores são capazes de discriminar os insetos produzidos pelas biofábricas e podem ser acrescentados à protocolos de controle de qualidade de *C. flavipes*. O maior volume do tórax e a maior largura da asa dos machos podem melhorar a capacidade e eficiência de voo, facilitando a busca e o encontro das fêmeas para a cópula, o que pode determinar uma maior eficiência do parasitismo em campo.

Nos resultados obtidos para as características biológicas de *C. flavipes* também foram observadas diferenças entre os insetos das diferentes biofábricas, assim como entre os lotes avaliados. O período que vai desde a oviposição até a

formação das massas de pupas foi mais curto para os insetos produzidos na biofábrica de Promissão-SP, variando de 10,9 dias (em 3 lotes) até 12,9 dias no outro lote (Tabela 10). Com esse período mais curto, a biofábrica, ao longo das gerações, pode incrementar significativamente a quantidade de indivíduos produzida, o que repercutirá na maior eficiência de produção e, conseqüente, no maior número de insetos disponíveis para a liberação, concorrendo para o aumento da redução dos danos de *D. saccharalis* no campo. Considerando-se apenas o período pupal (Tabela 11), as biofábricas de Campo Novo do Parecis (MT) e de Quirinópolis (GO) mostraram os valores mais curtos para o parâmetro, variando de 3,1 a 5,7 dias. Com esses dados, pode-se também inferir que os insetos produzidos em SP têm o período de incubação + larval mais curto, que, segundo Macedo e Araújo (2000), é de 10 a 15 dias, sendo de 3 a 4 dias o período embrionário (Parra, 2000).

Os resultados para número de machos e fêmeas (Tabelas 12 e 13) mostram que a biofábrica de Quirinópolis-GO produz mais machos, com mais de 30% dos indivíduos, enquanto na biofábrica de Coruripe-AL 40 a 60% são fêmeas. Em relação ao número de machos e fêmeas em uma população, de acordo com Hopper et al. (1993), quanto maior for o número de fêmeas liberado maior será o parasitismo, e a conseqüente e subsequente maior produção de outras fêmeas, como ocorreu na biofábrica de Coruripe-AL, podendo também aumentar a contribuição biológica para uma possível manutenção do parasitoide no campo. Por outro lado, de acordo com Stouthamer et al. (1992), o aumento do número de machos na população tende a levar a uma diminuição na taxa de crescimento populacional, com o conseqüente potencial de extinção para a população, podendo este ser considerado um dos mais graves efeitos da depressão endogâmica, o que compromete o sucesso reprodutivo da espécie. No entanto, Niyibigira et al. (2004) não verificaram aumento na proporção de machos em *C. flavipes*, trabalhando com cruzamentos consanguíneos por 25 gerações consecutivas.

O número de pupas inviáveis (Tabela 14) apresentou uma grande variação entre as remessas de cada biofábrica, a ponto de a de Campo Novo do Parecis-MT ter as menores quantidades de pupas inviáveis na primeira (5,5) e na segunda (6,8), enquanto na terceira e na quarta remessas foram as maiores (37,7 e 29,0,

respectivamente, ressaltando-se que Castilho (1982), Trevisan (2014) e Carvalho (2017) encontraram taxas de viabilidade de pupas próximas a 80%.

A razão sexual de *C. flavipes* (Tabela 15) mostrou uma grande variação entre as biofábricas e entre as remessas, com valores variando de 0,10 a 0,60, sendo que a maior média dentre as quatro remessas avaliadas foi próximo de 0,5 para Coruripe-AL, com Campos-Farinha et al. (2000), Veiga et al. (2013) e Carvalho (2017) citando valores que variam entre 0,57 e 0,71. Dessa forma, a razão sexual mostrou valores insatisfatórios para os insetos da biofábricas estudadas, especialmente para Campo Novo do Parecis-MT, Quirinópolis-GO e Promissão-SP, além de grandes variações entre os lotes analisados.

Outro parâmetro biológico que também mostrou falta de consistência nas biofábricas, evidenciada pela desuniformidade de valores encontrados nas diferentes remessas, foi longevidade de adultos, tanto de machos quanto de fêmeas (Tabelas 16 e 17), com boa parte da literatura pertinente citando que adultos de *C. flavipes* vivem, em média, dois dias. As fêmeas oriundas de insetos da biofábrica de Promissão-SP foram as mais longevas, chegando a viver, em média, por 40 horas, enquanto aquelas de Quirinópolis-GO tiveram apenas 12 horas de vida. Quanto aos machos, os insetos de Promissão-SP foram aqueles com a maior média de longevidade (40 horas), com os de Coruripe-AL sendo os menos longevos. Carvalho (2017) encontrou valores de longevidade de machos e fêmeas variando de 30 a 90 horas para insetos de 10 biofábricas localizadas no Estado de São Paulo, enquanto Sipriano-Nascimento (2017), trabalhando também com insetos das biofábricas de Campo Novo dos Parecis-MT e Quirinópolis-GO, entre outras, cita que as fêmeas viveram cerca de 56 horas, enquanto os machos apenas 47 horas. Ainda, nesse sentido, Cueva et al. (1980) e Uehara (2000) citam valores para longevidade de adultos variando de 48 a 72 horas.

Nos testes de atividade de voo, verificou-se que as biofábricas produziram, no geral, um bom número de insetos voadores, com valores até próximos a 90%, em relação à caminheiros e não voadores. Por sua vez, Hivizi et al. (2009) citam 51% de voadores para a produção de uma biofábrica do MT, enquanto Trevisan (2014) conseguiu valores próximos 60%. Ainda nesse sentido, Carvalho (2017), trabalhando com insetos de diversas biofábricas do Estado de São Paulo, não conseguiu obter

mais que 40% de voadores. Assim, pode-se dizer que os valores obtidos nesse trabalho foram bons, e que esse parâmetro de avaliação se prestou a discriminar as biofábricas, salientando-se também que, em relação à uniformidade da produção, importante para o controle de qualidade do inimigo natural produzido, as biofábricas de MT e AL se destacaram, além de gerarem mais adultos voadores.

Em relação à atividade de voo de *C. flavipes* e consequente capacidade de dispersão nos canaviais, os primeiros estudos que visavam entender essa aptidão do inseto foram realizados ainda na década de 1980, quando foi verificado que esta vespa poderia alcançar o hospedeiro a até 35 metros de distância do ponto onde foi realizada a liberação (Botelho, 1980). No mesmo sentido, buscando entender o comportamento desse parasitoide em campo, Volpe et al. (2014) obtiveram parasitismo por *C. flavipes* em lagartas de *D. saccharalis* a 25 metros do ponto de soltura dos parasitoides, 10 metros a menos que o citado por Botelho et al. (1980). Em investigação semelhante, Dinardo-Miranda et al. (2014) também encontraram redução na capacidade de busca pelo hospedeiro, dessa vez coletando brocas parasitadas a apenas 15 metros de distância do ponto de liberação. Assim, ainda existe grande preocupação quanto a essa possível perda de capacidade de voo pela manutenção contínua do parasitoide em cruzamentos consanguíneos nas biofábricas, o que poderia impactar significativa e negativamente o controle biológico aplicado realizado por *C. flavipes* em *D. saccharalis* nos canaviais brasileiros.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que, de modo geral, os insetos das quatro biofábricas analisadas podem alcançar os 35 metros para o parasitismo, conforme mencionado por Botelho et al. (1980), ocorrendo uma menor porcentagem de lagartas parasitadas nas distâncias de 30 e 35 metros do ponto de liberação, sendo que os maiores índices de parasitismo ocorreram até 25 metros.

Outro ponto importante para a dispersão do inseto é sua relação com a direção do vento e com as coordenadas cartesianas, sendo que para os insetos das quatro biofábricas aconteceram situações até contrastantes, uma vez que, para algumas as maiores porcentagens de lagartas parasitadas ocorreram a favor da direção eólica (Promissão-SP e Campo Novo do Parecis-MT), enquanto que para a de Quirinópolis-GO, os maiores números de lagartas recuperadas e parasitadas aconteceram contra a direção do vento. Outra situação muito interessante ocorrida neste trabalho e com

os insetos oriundos da biofábrica de Coruripe-AL, é que no sentido da direção eólica somente foi encontrado parasitismo a 5 metros além do ponto de liberação.

Segundo Pomari (2013), a determinação da capacidade de parasitismo e do padrão de dispersão dos parasitoides, bem como dos fatores que os afetam, devem nortear as estratégias de liberação para que se possa alcançar eficácia no controle das pragas-alvo. Nesse sentido, foi constatado que, em cultivos de soja e milho, a liberação do parasitoide de ovos *Telenonus remus* (Nixon, 1937) (Hymenoptera: Platygasteridae), para controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), a direção do vento influencia diretamente o padrão de dispersão desse inseto, o que não ficou totalmente evidenciado neste trabalho com *C. flavipes*, *D. saccharalis* e cana-de-açúcar, uma vez que essa variável abiótica deve atuar diferentemente nas condições onde e como as pesquisas foram feitas, pois as espécies de parasitoides, os métodos de determinação do parasitismo, os métodos de liberação, as culturas trabalhadas e condições locais, entre outras, foram diferentes nas pesquisas com as duas espécies de inimigos naturais (Pomari, 2013; Pomari-Fernandes et al., 2018).

Em relação à comparação genética das *C. flavipes* brasileiras com a de Islamabad-Paquistão, de acordo com o método da probabilidade por máxima similaridade (Figura 24), os parasitoides analisados das biofábricas de Campo Novo do Parecis-MT, Coruripe-AL, Quirinópolis-GO e Promissão-SP encontram-se localizados em um mesmo ramo da árvore de filogenia, tendo, portanto, 100% de similaridade na sequência dos nucleotídeos da região COI do DNA mitocondrial, com aqueles de Islamabad-Paquistão, mostrando que os insetos produzidos no Brasil não sofreram nenhum tipo de hibridação que implicasse em mudança de ramo/similaridade genética.

Muirhead et al. (2006) encontraram diferenças genéticas em *C. flavipes* de populações de diversas regiões do mundo, entre elas Índia, Paquistão, África (vários países), Indonésia, Tailândia, USA, Austrália e Brasil, enquanto que Joyce et al. (2010), trabalhando com *C. flavipes* da Austrália e do Texas-USA, também relacionam diferenças genéticas, podendo estar correlacionadas com os diferentes hospedeiros e barreiras geográficas, com o comportamento de uma população podendo variar em função da região geográfica de ocorrência.

Essa não alteração genética em cruzamentos consanguíneos por muitas gerações, como mostra este trabalho, provavelmente é devido ao superparasitismo co-específico que ocorre em endoparasitoides gregários, como é o caso de *C. flavipes*. Segundo Gu et al. (2003), Dorn e Beckage (2007) e Elias et al. (2010), em *C. glomerata*, e Hivizi et al. (2009), em *C. flavipes*, as fêmeas podem colocar ovos em lagartas já parasitadas, criando assim exocruzamentos, cruzamentos esses que também podem ser facilitados pelo hábito poligâmico que ocorre na espécie, sendo que, de acordo com Ridley (1993), em pelo menos 2/3 das espécies de parasitoides gregários é o que acontece. Tal situação pode ser efetivada facilmente nas criações de *C. flavipes* das diferentes biofábricas (Cano et al., 2006), uma vez que várias massas de casulos oriundas de fêmeas diferentes são acondicionadas em um mesmo recipiente até emergência e liberação dos adultos no campo. Com isso, uma progênie gerada com “cargas” genéticas diferentes oferece a oportunidade de variação, mesmo que haja cruzamento entre irmãos (Trevisan, 2014).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- (a) os insetos das biofábricas de Campo Novo do Parecis-MT, Querinópolis-GO, Coruripe-AL e Promissão-SP apresentam diferenças morfológicas;
- (b) os insetos das biofábricas de MT, GO, AL e SP são biologicamente diferentes;
- (c) os lotes produzidos nas biofábricas não são uniformes;
- (d) volume do tórax (comprimento e largura) e largura da asa anterior direita dos machos são parâmetros morfológicos que discriminam os insetos das biofábricas;
- (e) período desde a oviposição até a emergência dos adultos, período pupal, viabilidade de pupas, longevidade de adultos e número de insetos voadores são parâmetros biológicos que discriminam os insetos das biofábricas;
- (f) a dispersão do parasitismo chega a 35 metros para os insetos das diferentes biofábricas, porém eficientemente apenas até 25 ou 30 metros do ponto de liberação;
- (g) a direção do vento se mostrou inconsistente quanto à dispersão do parasitismo para os insetos das biofábricas de MT, GO, AL e SP;
- (h) os insetos das biofábricas de MT, GO, AL e SP têm 100% de similaridade genética nas sequências de nucleotídeos da região COI do DNA mitocondrial em relação aos Islamabad-Paquistão.

7. REFERÊNCIAS

- ABC BIO (2018) Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico. São Paulo: ABCBio, 18. Disponível em: <<http://www.abcbio.org.br>>. Acesso em: 05 julho 2018.
- AGROFIT (2018) Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Coordenação geral de agrotóxicos e afins. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>>. Acesso em: 22 jun. 2018.
- Almeida LC, Stingel E (2005) Curso de monitoramento e controle de pragas da cana-de-açúcar. Centro de Tecnologia Canavieira. Piracicaba, 32 p.
- Almeida LC, Stingel E, Arrigoni EB (2008) Monitoramento e controle de pragas da cana-de-açúcar. Piracicaba: CTC, 35 p. (apostila).
- Alves SB, Pádua LEM, Azevedo EMM, Almeida LC (1985) Controle da broca da cana-de-açúcar pelo uso de *Beauveria bassiana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 20(2):403-406.
- Arakaki N, Ganaha Y (1986) Emergence pattern and mating behavior of *Apanteles flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). **Applied Entomology and Zoology** 21(3):382-388.
- Assefa Y, Conlong DE, Mitchell A (2006). First record of the stem borer complex (Lepidoptera: Noctuidae; Crambidae; Pyralidae) in sugarcane estates of Ethiopia, their host plants and natural enemies. **Proceeding of South African Sugar Technologist Association** 80:202-213.
- Bartlett AC (1984) Genetic changes during insect domestication. In: King EG, Leppla NC (Eds.) **Advances and challenges in insect rearing**. Washington: Agricultural Research Service, p. 2-8.
- Bartlett AC (1985) Guidelines for diversity in laboratory colony establishment and maintenance. In: Singh P, Moore RF (Eds.) **Insect handbook rearing**. Amsterdam: Elsevier, v. 1, p. 7-17.
- Benedini MS (2006) Controle biológico de pragas na cana-de-açúcar. In: Marques MO, Mutton MA, Azania AAPM, Tasso Júnior LC, Nogueira GA, Vale DW (Eds.) **Tópicos em tecnologia sucroalcooleira**. Jaboticabal: Multipress, p. 101-120.
- Botelho PSM (1992) Quinze anos de controle biológico da *Diatraea saccharalis* utilizando parasitoides. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 27:255- 262.
- Botelho PSM, Macedo N (2002) *Cotesia flavipes* para o controle *Diatraea saccharalis*. In: Parra JRP, Botelho PSM, Correa-Ferreira BS, Bento JMS (Eds.) **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, p. 409-425.

Botelho PSM, Macedo N, Mendes AC (1980) Aspects of the population dynamics of *Apanteles flavipes* (Cameron) and support capacity of its host *Diatraea saccharalis* (Fabr.). In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 17, **Proceedings\ ISSCT**. Manila, Philippines. v. 2, p. 1736-1745.

BUG Agentes Biológicos (2016). Disponível em: <<http://bugagentesbiologicos.com.br/site/index.php/controle-de-qualidade>>. Acesso em: 22 set. 2016.

Caixeta DF (2010) **Dispersão de machos de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar**. 48 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) – Unesp, Jaboticabal.

Canaoeste (2013) Pragas da cana. Disponível em: <<http://www.canaoeste.com.br/conteudo/pragas-na-cana>>. Acesso em: 07 fev. 2018.

Campos-Farinha AEC, Chaud-Netto J, Gobbi N (2000) Biologia reprodutiva de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). Discriminação entre lagartas parasitadas e não parasitadas de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae), tempo de desenvolvimento e razão sexual dos parasitoides. **Arquivos do Instituto Biológico** 67(2):229-234.

Cano MAV, Santos EM, Pinto AS (2006) Produção de *Cotesia flavipes* para o controle da broca-da-cana. In: Pinto AS (Ed.) **Controle de pragas da cana-de-açúcar**. Biocontrol: Sertãozinho, p. 21-24.

Carvalho, VFP (2017) **Qualidade de *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae) produzida por biofábricas do Estado de São Paulo**. 66 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) - Unesp, Jaboticabal.

Carvalho-Netto OV, Bressiani JA, Soriano HL, Fiori CS, Santos JM, Barbosa GVS, Xavier MA, Landell MGA, Pereira GAG (2014) The potential of the energy cane as the main biomass crop for the cellulosic industry. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture** 1:1-20.

Cassel A, Windig J, Nylin S, Wiklund, C (2001) Effects of population size and food stress on fitness – related characters in the scare heath, a rare butterfly in western Europe. **Conservatory Biology** 15(6):1667-1673.

Castilho (HJ) (1982) **Introdução de *Apanteles flavipes* (Cam., 1891) (Hymenoptera, Braconidae) para o controle biológico da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera, Pyralidae), na região de Santa Bárbara d'Oeste, SP**. 98 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – USP, Piracicaba.

Charlesworth D, Charlesworth B (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. **Annual Review of Ecology and Sistematics** 18(1):237-268.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar. Safra 2016/2017.** Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 22 jun. 2018.

Cruz I (2007) A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, em Milho, no Brasil. Embrapa Milho e Sorgo, 12 p. **Circular Técnica 90.**

CTNBio (2018) Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Disponível em: <<http://ctnbio.mcti.gov.br/inicio>>. Acesso em: 07 Jul. 2018.

Cueva MC, Ayquipa GA, Mescua VB (1980) Estudios sobre *Apanteles flavipes* (Cameron), introducido para controlar *Diatraea saccharalis* (F.) en el Peru. **Revista Peruana de Entomologia** 23(1):73-76.

Dinardo-Miranda LL (2008) Pragas. In: Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos ACM, Landell MGA (Eds.). **Cana-de-açúcar.** Campinas: Instituto Agronômico, p. 349-404.

Dinardo-Miranda LL, Fracasso JV, Costa VP, Lopes DOT (2014) Dispersal of *Cotesia flavipes* in sugarcane field and implications for parasitoid releases. **Bragantia** 73(2):163-170.

Diniz FR, Rodrigues KF, Rossi MM (2008) Produção do parasitoide *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) para controle biológico da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) (Lepidoptera: Crambidae). **Nucleus** 1:39-48.

Dorn S, Beckage NE (2007) Superparasitism in gregarious hymenopteran parasitoids: ecological, behavioural and physiological perspectives. **Physiological Entomology** 32(3):199-211.

Elias J, Dorn S, Mazzi D (2010) Inbreeding in a natural population of gregarious parasitoid wasp *Cotesia glomerata*. **Molecular Ecology** 19(11):2336-2345.

FAO - Organização das Nações Unidas para a alimentação e a agricultura (2018). Disponível em: <http://www.fao.org/home/en/>. Acesso em: 07 Jul. 2018.

Fauquet C, Pringle C (1999) Abbreviations for vertebrate virus species names. **Archives of Virology** 144(9):1865-1880.

Ficarelli TRA, Ribeiro H (2010) Dinâmica do arrendamento de terras para o setor sucroalcooleiro: estudo de casos no Estado de São Paulo. **Informações Econômicas** 40(1):44-54.

Figueiredo P (2008) Breve histórico da cana-de-açúcar e do papel do Instituto Agronômico no seu estabelecimento no Brasil. In: Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos ACM, Landell MGA (Eds.) **Cana-de-açúcar.** Campinas: Instituto Agronômico, p. 31-44.

Fonseca PCD (1989) **Vargas: O capitalismo em construção**. São Paulo: Editora Brasiliense, 133 p.

Freitas AC, Morales-Corrêa e Castro AC, Barbosa NCCP, Fernandes AO (2018) Characterization and comparison of genetic variation in *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) mass reared for biological pest control using microsatellite markers. **Neotropical Entomology** 47(4):433-439.

Freitas MRT, Fonseca APP, Silva EL, Mendonça AL, Silva CE, Nascimento RR, Sant'Ana AEG (2006) The predominance of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) in sugar cane fields in the state of Alagoas, Brazil. **Florida Entomologist** 89(4):539-540.

Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Batista GC, Berti Filho E, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramim JD, Marchini LC, Lopes JRS, Omoto C (2002) **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 920 p.

Garcia JF, Botelho PSM, Macedo LPM (2009) Criação do parasitoide *Cotesia flavipes* em laboratório. In: BUENO VHP (Ed.) **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: Editora UFLA, p. 199-220.

Gauld IS, Hanson PE (2006) La biología de los himenópteros. In: Hanson PE, Gauld IS (Eds.) **Hymenoptera de la region neotropical**. Logan: The American Entomological Institute, p. 19-22.

Getu E, Overholt WA, Kairu E (2001). Distribution and species composition of stem borers and their natural enemies in maize and sorghum in Ethiopia. **Insect Science and its Application** 21:353-360.

Getu E, Overholt WA, Kairu E, Macopiyo L, Zhou G (2002). Predicting the distribution of *Chilo partellus* (Swinehoe) (Lepidoptera: Crambidae) and *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) in Ethiopia using correlation, step-wise regression and geographic information system. **Insect Science and its Application** 22:123-129 p.

Getu E, Overholt WA, Kairu E (2004) Comparative studies on the influence of relative humidity and temperature on life table parameters of two populations of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Biocontrol Science and Technology** 14(6):595-605.

Griffiths AJF, Wessler SR, Lewonti RC, Carroll SB (2008) **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 712 p.

Gu HN, Wang Q, Dorn, S (2003) Superparasitism in *Cotesia glomerata*: response of hosts and consequences for parasitoids. **Ecological Entomology** 28(4):422-431.

Guagliumi P (1973) **Pragas da cana-de-açúcar (Nordeste do Brasil)**. Rio de Janeiro: IAA, 622 p.

Hassan SA (1997) Seleção de espécies de *Trichogramma* para o uso em programas de controle biológico. In: Parra JRP, Zucchi RA (Eds.) **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, p. 183-205.

Hayward KJ (1943) El gusano chupador de la caña de azúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius) en Tucumán. **Boletín Estación Experimental Agrícola de Tucumán**. Buenos Aires, v. 38, 25 p.

Hivizi CL, Bueno VHP, Carvalho LM, Carvalho AR (2007). Quality control of the parasitoid *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) produced under a mass-rearing system. **Global IOBC Bulletin** 3:65–68.

Hivizi CL, Bueno VHP, Silva AC, Carvalho LM (2009). Controle de qualidade do parasitóide *Cotesia flavipes*. In: Bueno VHP (Ed.) **Controle Biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. UFLA: Lavras, p. 371–379.

Hopper KR, Roush RT, Powell W (1993) Management of genetics of biological control introductions. **Annual Review of Entomology** 28:27-51.

Joslyn DJ (1984) Maintenance of genetic variability in reared insects. In: King EG, Leppla NC (Eds.) **Advances and challenges in insect rearing**. Washington: Agricultural Research Service, p. 20-29.

Joyce AL, Hunt RE, Vinson SB, Bernal JS, Schulthess F, Medina RF (2010) Geographic variation in male courtship acoustics and genetic divergence of populations of the *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) species complex. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 137:153-164.

Kfir R (1997) Natural control of the cereal stemborers *Busseola fusca* and *Chilo partellus* in South Africa. **Insect Science and its Application** 17:61-67.

Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution** 33:1870-1874.

Leppla NC, Ashley TR (1989) Quality control in insect mass production: a review and model. **Bulletin of the Entomological Society of America** 4:33-44.

Long WH, Hensley SD (1972) Insect pests of sugar cane. **Annual Review of Entomology** 17(1):149-176.

Macedo N, Araújo JR (2000) **Controle biológico da broca da cana-de-açúcar**. Piracicaba: IAA/Planalsucar, 24 p.

Macedo N, Botelho PSM (1988) Controle integrado da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Pyralidae). **Brasil Açucareiro** 106(2):2-14.

Macedo N, Macedo D (2004) As pragas de maior incidência nos canaviais e seus controles. **Visão Agrícola** 1(1):38-46.

Macedo N, Mendonça AF, Moreno já, Pinazza AH (1984) Estimativa de benefício econômico de dez anos de controle biológico de *Diatraea* spp., através de *Apanteles flavipes* Cameron, no Estado de Alagoas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, **Resumos**, 9, Londrina, 134 p.

Machado FBP (2014) Brasil, a doce terra. Araçatuba: **UDOP – União dos Produtores de Energia**. Disponível em: <<http://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=26351#nc>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

Marconato JR (1988) **Aspectos biológicos de *Diatraea saccharalis* (Fabr, 1794) (Lep, Pyralidae) em meio artificial contendo diferentes genótipos de sorgo e milho na forma de colmos secos e triturados**. 76 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Unesp, Jaboticabal.

Matsuoka S, Ferro J, Arruda P (2009) The Brazilian experience of sugarcane ethanol industry. **In Vitro Cellular & Development Biology - Plant** 45(3):372-381.

Mendonça AF, Moreno JA, Risco SH, Rocha ICB (1996) Broca comum da cana-de-açúcar. In: Mendonça AF (Ed.). **Pragas da cana-de-açúcar**. Maceió: Insetos & Cia, p. 49-82.

Miranda, JR (2008) **História da cana-de-açúcar**. Campinas: Komedi, 168 p.

Moutia LA, Courtois CM (1952) Parasites of the moth-borers of sugarcane in Mauritius. **Bulletin of Entomological Research** 43:325-359.

Muirhead KA, Murphy NP, Sallam MN, Donnellan SC, Austin AD (2006) Mitochondrial DNA phylogeography of the *Cotesia flavipes* complex of parasitic wasps (Hymenoptera: Braconidae). **Annales de la Société Entomologique de France** 42:309–318.

Nava DE, Pinto AS, Silva SDA (2009) **Controle biológico da broca da cana-de-açúcar**. Pelotas: Embrapa, 28 p.

Niyibigira EI, Overholt WA, Stouthamer R (2004) *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) does not exhibit complementary sex determination (ii) Evidence from laboratory experiments. **Applied Entomology and Zoology** 39(4):717-725.

NOVA CANA (2018) Disponível em:<<https://www.novacana.com>>. Acesso em: 07 Jul. 2018.

Omwega CO, Overholt WA, Mbapila JC, Kimani-Njogu SW (1997) Establishment and dispersal of *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), an exotic endoparasitoid of *Chilo partellus* (Swinhoe) (Lepidoptera: Pyralidae) in northern Tanzania. **African Entomology** 5(1):71-75.

Overholt WA (1998) Biological control. In.: Polaszek A (Ed.). **African stem borers: economic importance, taxonomy, natural enemies and control**. Wellington: CAB International, p. 349- 362.

Overholt WA, Ngj-Song AJ, Omwega CO, Kimani-Njogu SW, Mbapila J, Sallam MN, Ofomata V (1997) A review of the introduction and establishment of *Cotesia flavipes* Cameron in East Africa for the biological control of cereal stem borers. **Insect Science and its Application** 17:79-88.

Overholt WA, Ochieng JO, Lammers P, Ogedah K (1994a) Rearing and field release methods for *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of tropical gramineous stem borers. **Insect Science and its Application** 15:253-259.

Overholt WA, Ogedah K, Lammers PM (1994b) Distribution and sampling of *Chilo partellus* (Swinhoe) (Lepidoptera: Pyralidae) in maize and sorghum at the Kenya Coast. **Bulletin of Entomological Research** 84:367-378.

Parra JRP (1992) Situação atual e perspectivas do controle biológico, através de liberações inundativas, no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 27(13):271-279.

Parra JRP (2000) A biologia de insetos e o manejo de pragas: da criação em laboratório à aplicação em campo. In.: Guedes JVC, Costa ID, Castiglioni E (Eds.) **Bases técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, p. 59-68.

Parra JRP (2014) Biological control in Brazil: an overview. **Scientia Agricola** 71(5):420-429.

Parra JRP, Botelho PSM, Corrêa-Ferreira BS, Bento JMS (2002) **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. Manole: São Paulo, 635 p.

Parra JRP, Botelho PSM, Pinto AS (2010). Biological control of pests as a key component for sustainable sugarcane production. In: Cortez LAB (Ed.) **Sugarcane bioethanol: R&D for productivity and sustainability**. São Paulo: Blücher, p. 441-450.

Parra JRP, Costa VA, Pinto AS (2011) Insect parasitoids = Insetos parasitoides. **Ciência e Ambiente** 43:19-36.

Pinto, AS (2006) Controle de pragas da cana-de-açúcar. Sertãozinho: Biocontrol, v. 1, 64 p. (Boletim técnico).

Pinto AS, Garcia JF, Oliveira HN (2006a) Manejo das principais pragas da cana-de-açúcar. In.: Segato SV, Pinto AS, Jendiroba E, Nóbrega JCM (Eds.) **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livrocere, p. 257-280.

Pinto AS, Garcia JF, Botelho PSM (2006b) Controle biológico da cana-de-açúcar. In: Pinto AS, Nava DE, Rossi MM, Malerbo-Souza DT (Eds.) **Controle biológico de pragas na prática**. Piracicaba: CP2, p. 65-74.

Pinto AS, Botelho PSM, Oliveira HN (2009) **Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos da cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP2, 160 p.

PLANALSUCAR (1982) **Guia das principais pragas da cana-de-açúcar no Brasil**. Piracicaba: Planalsucar, 28 p.

Polaszek A, Walker AK (1991) The *Cotesia flavipes* species complex: parasitoids of cereal stemborers in the tropics. **Redia** 74:335–341.

Pomari AF (2013) **Características biológicas de *Telenomus remus* Nixon em ovos de *Corcyra cephalonica* (Stainton) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith): bases para o desenvolvimento de programas de controle biológico aplicado para as culturas da soja e milho**. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências-Entomologia) – USP, Ribeirão Preto.

Pomari-Fernandes AF, Bueno AF, De Bortoli AS, Favetti BM (2018) Dispersal capacity of the egg parasitoid *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Platygasteridae) in maize and soybean crops. **Biological Control**. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.009>.

Potting RP, Overholt WA, Danso FO, Takasu K (1997) Foraging behavior and life history of the stemborer parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Insect Behavior** 10(1):13-29.

Prezotti L, Parra JRP, Vencovsky R, Dias CTS, Cruz I, Chagas MCM (2002) Teste de voo como critério de avaliação da qualidade de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae): adaptação de metodologia. **Neotropical Entomology** 31:411-417.

Prezotti L, Parra JRP (2002) Controle de qualidade em criações massais de parasitoides e predadores. In: Parra JRP, Botelho PSM, Corrêa Ferreira BS, Bento JMS (Eds.) **Controle biológico no Brasil, parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, p. 295-308

Ralls K, Frankhan R, Ballou JD (2007) Inbreeding and outbreeding. In: Levin AS (Ed.) **Encyclopedia of biodiversity**. Oxford: Elsevier, p. 1-9.

Ricklefs RE (2003) **A economia da natureza**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 503 p.

Ridley M (1993) Clutch size and mating frequency in parasiti Hymenoptera. **The American Naturalist** 142(5):893-910.

Rodriguez LM, Ostheimer E, Woolwine A, Reagan TE, Pollet DK, White WH (1995) Efficacy of aerial application of selected insecticides against sugarcane borer. **Arthropod Management Tests** 20:254-255.

Rossi MN, Fowler HG (2004) Predaceous ant fauna in new sugarcane fields in the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 47(5):805-811.

Santos RF, Vacari AM, De Bortoli SA, De Bortoli CP, Santos JA (2015) Development of a new container for storage and release of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Economic Entomology** 108(3):969-974.

SAS Institute Inc. 2015. SAS/IML® 14.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Silva MA, Carlin SD, Campana MP, Landell MGA, Perrecin D, Vasconcelos ACM (2003) Brotação da cana-de-açúcar em condições de casa de vegetação. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos** 22(1): 28-33.

Simões RA, Reis LG, Bento JMS, Solter LF, Delalibera Júnior I (2012) Biological and behavioral parameters of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) are altered by the pathogen *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae). **Biological Control** 63(2):164-171.

Singh P (1977) **Artificial diets for insects, mites and spiders**. New York: Plenum Press. 594 p.

Singh P, Moore RF (1985) **Handbook of insect rearing**. Amsterdam: Elsevier, v.1, 489 p.

Sipriano-Nascimento TP (2017) **Influência da temperatura na performance de populações de *Cotesia flavipes* de biofábricas do Brasil**. 63 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Unesp, Jaboticabal.

Sousa-Silva CR, Sgrillo RB, Oliveira AR, Pacheco, JM (1992) Uso de P-32 no estudo de predadores de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 21(1):133-138.

Stouthamer R, Luck RF, Werren JH (1992) Genetics of sex determination and the improvement of biological using parasitoids. **Environmental Entomology** 21(3):427-435.

Teran FO, Precetti AACM, Derneika O (1983) Broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*. In: REUNIÃO TÉCNICA AGRONÔMICA COPERSUCAR, Piracicaba, SP, p. 4-15.

Trevisan M (2014) **Efeito da endogamia em *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) criada em *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) ao longo de gerações.** 72 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) - Unesp, Jaboticabal.

Trevisan M, De Bortoli SA, Vacari AM, Laurentis VL, Ramalho DG (2016) **Quality of the exotic parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) does not show deleterious effects after inbreeding for 10 generations.** *PLoS ONE* 11(8): e0160898 (doi:10.1371/journal.pone.0160898).

Uehara MT (2000) **Avaliação da aptidão “fitness” das populações do parasitoide *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891).** 94 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – USP, Ribeirão Preto.

UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar (2018). Disponível em:< <http://english.unica.com.br>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

Vacari AM, De Bortoli SA, Borba, DF, Martins MIEG (2012) Quality of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) reared at different host densities and the estimated costs of its commercial production. *Biological Control* 63(2):102-106.

van Lenteren JC (2003) Need for quality control of mass-produced biological control agentes. In: van Lenteren JC (Ed.) **Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedure.** Wallingford: CAB, p. 1-18.

van Lenteren JC (2009) Controle de qualidade de agentes de controle biológicos produzidos massalmente. In.: Bueno VHP (Ed.) **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade.** Lavras: Editora UFLA, p. 311–338.

Veiga ACP, Vacari AM, Volpe HXL, Laurentis AL, De Bortoli SA (2013) Quality control of *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) from different Brazilian bio-factories. *Biocontrol Science and Technology* 23(6):665-673.

Viel SR (2009) Criação de *Diatraea saccharalis* e *Cotesia flavipes*. In: De Bortoli SA (Ed.) **Criação de insetos – da base à biofábrica.** Jaboticabal: Edição própria, p. 76-140.

Viel SR (2011) Avaliação da qualidade de produção e de busca pelo hospedeiro de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) em laboratório. 109 f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Unesp, Jaboticabal.

Volpe HXL, Barbosa JC, Viel SR, Goulart RM, Vacari AM, Salas C, Veiga ACP, De Bortoli SA (2014) Determination of method to evaluate parasitism and cover area for studies on *Cotesia flavipes* in sugarcane. *African Journal of Agricultural Research* 9:436–447.

Wilkinson DS (1928) A revision of the Indo-Australian species of the genus *Apanteles* (Hym.: Braconidae). Part I. *Bulletin of Entomological Research* 19(1):79-105.

Wright SW (1977) Experimental stochastic distribution of gene frequencies. In: Wright SW (Ed.) **Evolution and genetics of populations: experimental results and evolutionary deductions**. Chicago: University of Chicago Press, v. 3, p. 346-366.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A importância do parasitoide *C. flavipes* para o setor sucro-alcooleiro do Brasil tem sido muito importante e seu retorno econômico inquestionável.

Desde os trabalhos iniciais para implantação do controle biológico aplicado para *D. saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar no país, nos idos de 1950 pelo Prof. Dr. Domingos Gallo, a história mostra que os parasitoides contribuíram em muito para a redução dos danos na cultura e, conseqüentemente, dos prejuízos econômicos para o setor.

Segundo Vilela et al. (1998), até a década de 1950 o índice de infestação de *D. saccharalis* nos canaviais brasileiros era de 25%, sendo que para cada 1% desse índice perde-se, em média, 1,14% de tonelada de cana, 0,42% de açúcar e 0,21% de etanol (G.BIO, 2016). Posteriormente, com o emprego dos parasitoides, especialmente *C. flavipes*, o índice de infestação chegou a 11% em 1980 (CTC, 2009), com valores decrescentes ao longo dos anos, à medida que os parasitoides eram rotineiramente liberados, até chegar a 2,82% em 2016 (G.BIO, 2016).

Entre 1980 e 2008, por exemplo, foram liberados 72 milhões de *Lydella minense* (Towsend, 1927) e *Billaea claripalpis* (Wulp, 1895) (Diptera: Tachinidae) e de 413 milhões de massas de pupas de *C. flavipes* somente em usinas associadas da Copersucar (CTC, 2009).

De Bortoli et al. (2017) e Viel (2017), baseados em dados da CONAB (2017), citam que desde 1980 foram colhidos 202,3 milhões de hectares de cana no Brasil, com uma produção acumulada de 12,1 bilhões de toneladas, o que possibilitou a produção de 689,8 milhões de toneladas de açúcar e de 551,2 milhões de m³ de etanol. Assim, utilizando-se o dado médio do índice de infestação desde 1980 (3,94%) um valor de US\$ 21,8 bilhões de prejuízos. Se a infestação permanecesse ao nível de 25%, como era sem controle biológico, o prejuízo seria de US\$ 138,5 bilhões, com o controle biológico evitando US\$ 116,7 bilhões. É claro que outros fatores concorreram para essa redução no prejuízo, mas como o índice médio de infestação já estava abaixo de 3% em 2006, deduz-se que o controle biológico foi o maior responsável pela redução bastante significativa perdas oriundas do ataque de *D. saccharalis* na cana.

Em vista disso, deve-se tomar todo o cuidado com a produção de *C. flavipes* nas criações massais visando liberação em campo para o controle de *D. saccharalis*, uma vez que este e diversos outros trabalhos mostraram que muitas biofábricas produzem insetos que não atendem protocolos de controle de qualidade rígidos e que, a persistir essa situação, a tendência é de piorar gradativa e constantemente a qualidade e, conseqüentemente, eficiência deste tão importante agente de controle biológico.

Deve ser também salientado que, devido ao tempo que *C. flavipes* vem sendo mantida no laboratório, aproximadamente 40 anos, em cruzamentos consanguíneos, por serem descendentes de ancestrais comuns e por não ter ocorrido novas introduções desde a última há mais de 35 anos, trabalhos como os de Anjos et al. (2016) e Freitas et al. (2018), usando microssatélites, e Vacari (2017), trabalhando com DNA, mostraram a baixa diversidade genética dos insetos produzidos nas biofábricas objetos das pesquisas, sugerindo os autores novas introduções do parasitoide na tentativa de recomposição da variabilidade genética das populações de laboratório.

Estudos como o deste trabalho podem e devem ajudar as biofábricas a gerarem protocolos de controle de qualidade, de uso comum, que garantam a produção de insetos de qualidade, mais padronizada em seus lotes, que associado a métodos adequados de liberação farão com que *C. flavipes* continue trabalhando na redução significativa dos danos e prejuízos causados pela broca na cultura da cana-de-açúcar.

Referências

- Anjos LOS, Peixoto Júnior RF, Chanquinie DMS, Pinto LR, Creste AS, Dinardo-Miranda LL, Landell MGA, Tambarussi EV, Vencovsky R (2016) Microsatellite loci and genetic structure of artificial populations of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Genetics and Molecular Research** 15(4):gmr.15048851.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento (2017) **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar.** Safra 2016/2017. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 22 jun. 2018.
- CTC-Centro de Tecnologia Canavieira (2009) **Pragas da cana crua:** monitoramento e controle. Piracicaba: Orplana, 88 p.
- De Bortoli AS, Vacari AM, Dinardo-Miranda LL, Fracasso J, Pinto ZV, Corbani RZ, Viel SR (2017) Histórico e impacto econômico do controle biológico aplicado em cana-de-açúcar. In: Castilho RC, Barilli, DR, Truzzi, CC (Eds.) **Tópicos em entomologia agrícola – X.** Jaboticabal: Gráfica Multipress, p. 219-243.
- Freitas AC, Morales-Corrêa e Castro AC, Barbosa NCCP, Fernandes AO (2018) Characterization and comparison of genetic variation in *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) mass reared for biological pest control using microsatellite markers. **Neotropical Entomology** 47(4):433-439.
- G.BIO-Grupo de pesquisa e extensão em controle biológico (2016) **Manejo biológico de pragas de cana-de-açúcar.** Ribeirão Preto: G.Bio, 22 p.
- Vacari AM (2017) Inbreeding and quality of the parasitoid *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae) produced in biofactories in Brazil. Jaboticabal: Scientific Report Fapesp-BEPE, 84 p.
- Viel SR (2017) Valor econômico do controle biológico para a indústria sucro-alcooleira. In: Polanczyk RA, De Bortoli SA (Eds.) ANAIS DO 17º SICONBIOL. Ribeirão Preto: SEB. <http://www.seb.org.br/index.php/br/historico-siconbiol2.html>.
- Vilela EF, Fernandes JB, Parra JRP, Moscardi F, Rabinovitch, L (1998) Controle biológico e feromônios de insetos no âmbito do agronegócio. In: Workshop sobre Controle Biológico e Feromônios de Insetos. Viçosa: CNPq/Embrapa, 74 p.