

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 08/12/2022

At the author's request, the full text of this thesis / dissertation will not be available online until December 08, 2022

**NADJA NARA PEREIRA DA SILVA**

**INFLUÊNCIA DE SIMBIONTES NA APTIDÃO DE *Diatraea saccharalis*  
(LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) E *Cotesia flavipes* (HYMENOPTERA:  
BRACONIDAE) E POTENCIAL DE PRODUTOS ANTIMICROBIANOS NA  
REDUÇÃO DA INFECÇÃO DE *Nosema* sp.**

**Botucatu**

**2021**



**NADJA NARA PEREIRA DA SILVA**

**INFLUÊNCIA DE SIMBIONTES NA APTIDÃO DE *Diatraea saccharalis*  
(LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) E *Cotesia flavipes* (HYMENOPTERA:  
BRACONIDAE) E POTENCIAL DE PRODUTOS ANTIMICROBIANOS NA  
REDUÇÃO DA INFECÇÃO DE *Nosema* sp.**

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

Orientadora: Regiane Cristina de Oliveira

**Botucatu**

**2021**

|       |  |
|-------|--|
| S586i | <p>Silva, Nadja Nara Pereira da</p> <p>Influência de simbioses na aptidão de <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Crambidae) e <i>Cotesia flavipes</i> (Hymenoptera: Braconidae) e potencial de produtos antimicrobianos na redução da infecção de <i>Nosema</i> sp. / Nadja Nara Pereira da Silva. -- Botucatu, 2021</p> <p>104 p. : il., tabs.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu</p> <p>Orientadora: Regiane Cristina de Oliveira</p> <p>1. controle biológico. 2. broca-da-cana. 3. parasitoide larval. 4. microsporídio. 5. controle de qualidade. I. Título.</p> |
|-------|--|

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: INFLUÊNCIA DE SIMBIOTES NA APTIDÃO DE *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) E *Cotesia flavipes* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) E POTENCIAL DE PRODUTOS ANTIMICROBIANOS NA REDUÇÃO DA INFECÇÃO DE *Nosema* sp.

AUTORA: NADJA NARA PEREIRA DA SILVA

ORIENTADORA: REGIANE CRISTINA DE OLIVEIRA

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

Prof.ª Dr.ª REGIANE CRISTINA DE OLIVEIRA (Participação Virtual)  
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP



Prof.ª Dr.ª NADIA CALDATO (Participação Virtual)  
Pós-Doutoranda - Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu



Pesquisadora Dr.ª RANYSE BARBOSA QUERINO DA SILVA (Participação Virtual)  
Laboratório de Entomologia / Embrapa Meio Norte



Prof. Dr. DIRCEU PRATISSOLI (Participação Virtual)  
Produção Vegetal / Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. BRUNO ALEXIS ZACHRISSON SALAMINA (Participação Virtual)  
Ciências Biológicas / Instituto de Investigação Agropecuária de Panamá



Botucatu, 08 de dezembro de 2021



A minha mãe, Maria da Cruz  
A minha irmã, Wanessa  
Aos meus avós,  
Floriza e José (*in memoriam*),  
dedico





## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo dom da vida.

A toda minha família por sempre estarem presentes em todos os momentos de minha vida, motivando e torcendo por mim.

A Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA/UNESP), Campus de Botucatu, em especial ao Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas e todos os professores pelos valiosos ensinamentos repassados, os quais permitiram o mesmo crescimento profissional.

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

A minha orientadora profa. Dra. Regiane Cristina de Oliveira, pela confiança depositada em mim, pela orientação, ensinamentos, conselhos e pelo grande exemplo profissional.

A todos os integrantes do AGRIMIP pela amizade, momentos de descontração e apoio durante minha trajetória acadêmica.

A meus queridos amigos que Botucatu, em especial a Carolane, João Pedro, Bruna, Leticia, Ana Beatriz.

A Vanessa Rafaela de Carvalho pela amizade, ensinamentos e pelo auxílio na execução das análises moleculares.

Ao professor Carlos Frederico Wilcken pela disponibilização dos laboratórios do LCBPF, para execução dos experimentos de morfometria.

A professora Silvia Renata Siciliano Wilcken pela disponibilização dos laboratórios de Biologia Molecular, para execução dos experimentos de morfometria.

A todos que direta e indiretamente fizeram parte desta conquista, os meus sinceros agradecimentos!



## RESUMO

A utilização de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) na regulação populacional da broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) está entre os programas de controle biológico aplicado mais eficiente e reconhecido mundialmente. Entretanto, a qualidade deste parasitoide pode ser comprometida devido a contaminações pelo microsporídio *Nosema* sp. (Microspora: Nosematidae) em produções massais de *D. saccharalis*, o que compromete a eficiência de *C. flavipes*. Exemplos como este, demonstram a relevância de compreender as interações simbióticas e o efeito de tais associações em populações de *D. saccharalis* e *C. flavipes*, a fim de detectar possíveis alterações biológicas e morfológicas mediadas pela ação desses microrganismos, bem como alternativas que mitiguem os efeitos deletérios de tal associação. Com isso, este trabalho objetivou detectar a presença dos simbiossitos facultativos do gênero *Arsenophonus*, *Hamiltonella*, *Cardinium*, *Spiroplasma*, *Rickettsia*, *Serratia*, *Wolbachia*, *Sodalis* e *Nosema* em *D. saccharalis* e *C. flavipes*, bem como, avaliar o efeito da infecção por esses microrganismos no desenvolvimento do seu hospedeiro; avaliar as alterações morfológicas em *C. flavipes* ocasionadas pela infecção de *Nosema* sp. e o potencial de óleos essenciais e produtos antimicrobianos na redução da infecção de *Nosema* sp. em *D. saccharalis*. Para isso, foi realizado PCR diagnóstico por meio de primers específicos para a detecção dos organismos simbiossitos e as características biológicas e morfológicas do hospedeiro infectado e não infectado foram comparadas. Foram analisadas a atividade de voo e as deformações de *C. flavipes* mantidas em lagartas de *D. saccharalis* não contaminadas e contaminadas com  $1 \times 10^1$ ;  $1 \times 10^2$ ;  $1 \times 10^3$  esporos de *Nosema* sp./lagarta e foram avaliados o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de: *Cymbopogon citratus*, *Schinus terebinthifolius*, *Baccharis dracunculifolia*, *Origanum vulgare* e *Syzygium aromaticum* e dos antibióticos: Albendy<sup>®</sup> (Albendazol), Flagimax<sup>®</sup> (Metronidazol) e Pletil<sup>®</sup> (Tinidazol) na redução da infecção de *Nosema* sp. em *D. saccharalis*, bem como, avaliados os efeitos do tratamento na biologia deste lepidóptero e de *C. flavipes*. Nas amostras de *D. saccharalis* analisadas não foi detectada a presença das espécies de simbiossitos estudadas. Em *C. flavipes* foi detectada a presença do endossimbionte *Wolbachia*, sendo que, tal associação resultou em alterações biológicas neste parasitoide. *Nosema* sp. compromete a capacidade de voo de *C. flavipes* e, isso se deve principalmente pelas alterações em medidas morfológicas e deformações nas asas ocasionadas pela infecção desse patógeno no parasitoide. Nas avaliações sobre o efeito de produtos antimicrobianos no desenvolvimento de *Nosema* sp. os antibióticos albendazol (0,5 mg/mL) e metronidazol (1 mg/mL) e os óleos essenciais de *S. aromaticum* (0,01%), *O. vulgare* (0,01%) e de *S. terebinthifolius* (0,02 e 0,05%) demonstraram maior redução na infecção deste microsporídio em *D. saccharalis*, os quais apresentaram pouco ou nenhum efeito deletério em parâmetros biológicos deste

lepidóptero e em *C. flavipes*. Os resultados apresentados neste estudo evidenciam a importância do controle de qualidade durante o processo de produção massal de inimigos naturais, bem como, fornecem informações que servirão como base para o aprimoramento e manutenção da qualidade de *C. flavipes*.

**Palavras-chave:** controle biológico; broca-da-cana; parasitoide larval; microsporídio; controle de qualidade.

## ABSTRACT

The use of *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) in the population regulation of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) is among the most efficient and recognized biological control programs applied worldwide. However, the quality of this parasitoid may be compromised due to contamination by the intracellular parasite *Nosema* sp. (Microspora: Nosematidae) in mass productions of *D. saccharalis*, which compromises the efficiency of *C. flavipes*. Examples such as this demonstrate the relevance of understanding the symbiotic interactions and the effect of such associations on populations of *D. saccharalis* and *C. flavipes*, in order to detect possible biological and morphological changes mediated by the action of these microorganisms, as well as alternatives that reduce the deleterious effects of such association. With this, this work aimed to detect the presence of facultative symbionts of the genus *Arsenophonus*, *Hamiltonella*, *Cardinium*, *Spiroplasma*, *Rickettsia*, *Serratia*, *Wolbachia*, *Sodalis* and *Nosema* in *D. saccharalis* and *C. flavipes*, as well as to evaluate the effect of infection by these microorganisms on the fitness of their host; to evaluate morphological changes in *C. flavipes* caused by *Nosema* sp. infection and the potential of antimicrobial products in reducing *Nosema* sp. infection in *D. saccharalis*. For this, diagnostic PCR was performed by means of specific primers for the detection of symbiont organisms and the biological and morphological characteristics of the infected and non-infected host were compared. Flight activity and deformations of *C. flavipes* maintained in caterpillars of *D. saccharalis* not contaminated and contaminated with  $1 \times 10^1$  were analyzed;  $1 \times 10^2$ ;  $1 \times 10^3$  spores of *Nosema* sp./caterpillar and the antimicrobial potential of essential oils of: *Cymbopogon citratus*, *Schinus terebinthifolius*, *Baccharis dracunculifolia*, *Origanum vulgare* and *Syzygium aromaticum* and antibiotics were evaluated: Albendy® (Albendazole), Flagimax® (Metronidazole) and Pletil® (Tinidazole) in reducing *Nosema* sp. in *D. saccharalis*, as well as, evaluated the effects of treatment on the biology of this lepidopteran and *C. flavipes*. In the samples of *D. saccharalis* analyzed, the presence of the species of symbionts studied was not detected. In *C. flavipes*, the presence of the endosymbiont *Wolbachia* was detected, and this association resulted in biological changes in this parasitoid. *Nosema* sp. compromises the flight capacity of *C. flavipes* and, this is mainly due to changes in morphological measurements and deformations in the wings caused by infection of this pathogen in the parasitoid. In the evaluations on the effect of antimicrobial products on the development of *Nosema* sp. albendazole (0.5 mg/mL) and metronidazole (1 mg/mL) and essential oils of *S. aromaticum* (0.01%), *O. vulgare* (0.01%) and *S. terebinthifolius* (0.02 and 0.05%) showed a greater reduction in infection of this microsporidium in *D. saccharalis*, which showed little or no deleterious effect on biological parameters of this lepidopteran and in *C. flavipes*. The results presented in this study show the importance of quality control during the mass production process

of natural enemies, as well as provide information that will serve as a basis for the improvement and maintenance of the quality of *C. flavipes*.

**Keywords:** biological control; sugarcane borer; larval parasitoid; microsporidium; quality control.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1 - ASSOCIAÇÃO E INFLUÊNCIA DE SIMBIONTES NA APTIDÃO DE *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) E *Cotesia flavipes* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)

- Figura 1 - Características biológicas de *Cotesia flavipes* infectada (W+) e não (W-) infectada por *Wolbachia*. Desenvolvimento (dias) ovo-pupa (A) e pupa-adulto (B), viabilidade de pupas (C) e razão sexual (D). As letras diferentes dentro de cada gráfico são significativamente diferentes entre si (Teste de Wilcoxon Mann-Whitney  $p < 0,05$ ) ..... 39
- Figura 2 - Sobrevivência de *Cotesia flavipes* infectada (W+) e não infectada (W-) por *Wolbachia*. Fêmeas (W+ e W-) (A) e machos (W+ e W-) (B). Teste de LogRank ( $p < 0,05$ )..... 40
- Figura 3 - Tamanho (mm) do comprimento do corpo (A), comprimento da asa direita (B), largura da asa anterior direita (C) e comprimento da tíbia direita (D) de fêmeas e machos de *Cotesia flavipes* infectada (W<sup>+</sup>) (caixas pretas) e não infectada (W<sup>-</sup>) (caixas brancas) por *Wolbachia* (W<sup>-</sup>). Os gráficos de caixas representam a mediana e os quartis médios de 75 e 25%, os bigodes representam os limites superior e inferior e os pontos representam os valores discrepantes. As letras diferentes dentro de cada gráfico são significativamente diferentes entre si (Teste t  $p < 0,05$ ) ..... 41
- Figura 4 - Porcentagem de adultos voadores, caminhadores e não voadores de *Cotesia flavipes* previamente infectados (W+) e não (W-) infectados por *Wolbachia*. Os gráficos de caixas representam a mediana e os quartis médios de 75 e 25%, os bigodes representam os limites superior e inferior e os pontos representam os valores discrepantes. Colunas com a mesma letra minúscula (entre as populações) e maiúscula (dentre a população) não são significativamente diferentes entre si pelos teste de Wilcoxon Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ , respectivamente ..... 42



## CAPÍTULO 2 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE *Cotesia flavipes* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) EM DECORRÊNCIA DA INFECÇÃO DE *Nosema* sp. (MICROSPORA: NOSEMATIDAE)

- Figura 1 – Unidade para teste de voo de *Cotesia flavipes*. Fonte: Adaptado de Prezotti et al. (2002) ..... 57
- Figura 2 - Adultos voadores (%), caminhadores (%) e não voadores (%) de *Cotesia flavipes* provenientes de lagartas de *Diatraea saccharalis* não infectadas (população 1) e infectadas com  $1 \times 10^1$  (população 2),  $1 \times 10^2$  (população 3) e  $1 \times 10^3$  (população 4) esporos de *Nosema* sp./lagarta. Colunas com a mesma letra minúscula (entre as populações) e maiúscula (dentro a população) não são significativamente diferentes entre si (Teste de Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ) ..... 60
- Figura 3 - Tamanho (mm) do comprimento do corpo (A), comprimento do tórax (B), largura do tórax (C), comprimento do abdome (D), largura do abdome (E), comprimento da tíbia (F), comprimento da asa anterior direita (G) e da largura da asa anterior direita (H) de fêmeas de *Cotesia flavipes* provenientes de lagartas de *Diatraea saccharalis* não infectadas (população 1) e infectadas com  $1 \times 10^1$  (população 2),  $1 \times 10^2$  (população 3) e  $1 \times 10^3$  (população 4) esporos de *Nosema* sp./lagarta. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes entre si (<sup>1</sup>Teste de Tuckey ou <sup>2</sup>Teste de Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ) ..... 62
- Figura 4 - Tamanho (mm) do comprimento do corpo (A), comprimento do tórax (B), largura do tórax (C), comprimento do abdome (D), largura do abdome (E), comprimento da tíbia (F), comprimento da asa anterior direita (G) e da largura da asa anterior direita (H) de machos de *Cotesia flavipes* provenientes de lagartas de *Diatraea saccharalis* não infectadas (população 1) e infectadas com  $1 \times 10^1$  (população 2),  $1 \times 10^2$  (população 3) e  $1 \times 10^3$  (população 4) esporos de *Nosema* sp./lagarta. Colunas com a mesma letra minúscula não são

|  |    |
|--|----|
| significativamente diferentes entre si ( <sup>1</sup> Teste de Tuckey ou <sup>2</sup> Teste de Kruskal-Wallis $p < 0,05$ ) .....   | 64 |
| Figura 5 - Deformações em <i>Cotesia flavipes</i> (Hymenoptera: Braconidae) em decorrência da infecção por <i>Nosema</i> sp. ....  | 65 |
| Figura 6 - Porcentagem de fêmeas (A) e machos (B) de <i>Cotesia flavipes</i> com deformações em asas em decorrência da infecção da infecção por <i>Nosema</i> sp. em lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i> não infectadas (população 1) e infectadas com $1 \times 10^1$ (população 2), $1 \times 10^2$ (população 3) e $1 \times 10^3$ (população 4) esporos de <i>Nosema</i> sp./lagarta. Colunas com a mesma letra minúscula (dentro de cada população) e maiúscula [entre as populações dentro de cada categoria (asas não deformadas e deformadas)] não são significativamente diferentes entre si pelos testes teste- t ( $p < 0,05$ ) e de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ), respectivamente ..... | 66 |
| Figura 7 - Porcentagem de fêmeas e machos de <i>Cotesia flavipes</i> com asas não deformadas (A) e deformadas (B) em decorrência da infecção da infecção por <i>Nosema</i> sp. em lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i> não infectadas (população 1) e infectadas com $1 \times 10^1$ (população 2), $1 \times 10^2$ (população 3) e $1 \times 10^3$ (população 4) esporos de <i>Nosema</i> sp./lagarta. Colunas com letras diferentes são significativamente diferentes entre si pelos testes teste- t ( $p < 0,05$ ) .....   | 67 |

**CAPÍTULO 3 - POTENCIAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS E PRODUTOS ANTIMICROBIANOS NA REDUÇÃO DA INFECÇÃO DE *Nosema* sp. (MICROSPORA: NOSEMATIDAE) EM *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Mortalidade (%) de <i>Diatraea saccharalis</i> alimentada com dieta artificial contendo óleos essências de <i>Cymbopogon citratus</i> (A), <i>Syzygium aromaticum</i> (B), <i>Origanum vulgare</i> (C), <i>Schinus terebinthifolius</i> (D) e <i>Baccharis dracunculifolia</i> (E). Colunas sem e com mesma letra não diferiram estatisticamente entre si (Teste de Kruskal-Wallis $p < 0,05$ ) ..... | 86 |
|--|----|

|  |    |
|--|----|
| Figura 2 – Período de desenvolvimento (dias $\pm$ EP) das fases de ovo (A), larva (B) e pupa (C) e a viabilidade (%) dos ovos (D) de <i>Diatraea saccharalis</i> mantidas em dietas artificiais sem e com óleos essenciais e produtos antimicrobianos. Colunas sem e com a mesma letra não diferem entre si (Teste de Kruskal-Wallis $p < 0,05$ ) .....            | 89 |
| Figura 3 – Sobrevivência de fêmeas (A) e machos (B) adultos de <i>Diatraea saccharalis</i> mantidas em dietas artificiais com e sem óleos essenciais e produtos antimicrobianos .....  | 91 |
| Figura 4 – Período de desenvolvimento (dias) de ovo-adulto (A), viabilidade (%) de pupas (B) e razão sexual (C) de adultos de <i>Cotesia flavipes</i> mantidas em <i>Diatraea saccharalis</i> criadas em dieta artificial contendo óleos essenciais e produtos antimicrobianos. Colunas sem letra não diferem entre si (Teste de Kruskal-Wallis $p < 0,05$ ) ..... | 92 |
| Figura 5 – Sobrevivência de fêmeas (A) e machos (B) adultos de <i>Cotesia flavipes</i> mantidas em <i>Diatraea saccharalis</i> criadas em dieta artificial contendo óleos essenciais e produtos antimicrobianos .....  | 93 |
| Figura 6 - Cromatograma do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> obtido por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas .....   | 94 |

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1 - ASSOCIAÇÃO E INFLUÊNCIA DE SIMBIONTES NA APTIDÃO DE *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) E *Cotesia flavipes* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)**

Tabela 1 - Lista de primers utilizados na detecção de simbiontes de *Diatraea saccharalis* e *Cotesia flavipes* ..... 32

### **CAPÍTULO 3 - POTENCIAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS E PRODUTOS ANTIMICROBIANOS NA REDUÇÃO DA INFECÇÃO DE *Nosema* sp. (MICROSPORA: NOSEMATIDAE) EM *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

Tabela 1 – Média ( $\pm$ EP) do número de esporos de *Nosema* sp. em lagartas de 2º instar de *Diatraea saccharalis* submetidas a tratamento com óleos essenciais e produtos antimicrobiano ..... 88

Tabela 2 – Razão sexual e peso (g) de pupas ( $\pm$  EP) de *Diatraea saccharalis* mantidas em dietas artificiais sem e com óleos essenciais e produtos antimicrobiano ..... 90



## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| INTRODUÇÃO GERAL .....  | 23        |
| <b>CAPÍTULO 1 - Associação e influência de simbioses na aptidão de <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Crambidae) e <i>Cotesia flavipes</i> (Hymenoptera: Braconidae) .....</b> | <b>26</b> |
| 1.1 INTRODUÇÃO .....  | 28        |
| 1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....   | 29        |
| 1.2.1 Obtenção e multiplicação dos insetos .....  | 30        |
| 1.2.3 Detecção de simbioses de <i>Diatraea saccharalis</i> e <i>Cotesia flavipes</i> .....  | 30        |
| 1.2.3.1 Extração do DNA genômico .....  | 30        |
| 1.2.3.2 Reação em cadeia de polimerase (PCR) e sequenciamento.....  | 31        |
| 1.2.4 Produção de linhagens de <i>Cotesia flavipes</i> aposimbioses.....  | 34        |
| 1.2.5 Alterações no desenvolvimento de <i>Cotesia flavipes</i> associada à infecção de <i>Wolbachia</i> .....   | 35        |
| 1.2.5.1 Características biológicas .....  | 35        |
| 1.2.5.2 Morfometria .....   | 36        |
| 1.2.5.3 Capacidade de voo .....   | 36        |
| 1.2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....  | 37        |
| 1.3 RESULTADOS.....   | 37        |
| 1.3.1 Simbioses de <i>Diatraea saccharalis</i> e <i>Cotesia flavipes</i> .....  | 37        |
| 1.3. Alterações no desenvolvimento de <i>Cotesia flavipes</i> associada à infecção de <i>Wolbachia</i> .....  | 38        |
| 1.3.2.1 Características biológicas .....  | 38        |
| 1.3.2.2 Morfometria .....   | 40        |
| 1.3.2.3 Capacidade de voo .....   | 41        |
| 1.4 DISCUSSÃO .....   | 43        |
| REFERÊNCIAS.....  | 45        |
| <b>CAPÍTULO 2 - Alterações morfológicas de <i>Cotesia flavipes</i> (Hymenoptera: Braconidae) em decorrência da infecção de <i>Nosema</i> sp. (Microspora: Nosematidae).....</b>       | <b>49</b> |
| RESUMO .....  | 49        |
| 2.1 INTRODUÇÃO .....  | 51        |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS.....  | 52        |

|       |   |           |
|-------|---|-----------|
| 2.1   | Obtenção e multiplicação dos insetos .....  | 52        |
| 2.2   | Identificação da infecção de <i>Nosema</i> sp. em <i>Diatraea saccharalis</i> e <i>Cotesia flavipes</i> .....   | 52        |
| 2.3   | Infecções de <i>Diatraea saccharalis</i> e <i>Cotesia flavipes</i> com esporos de <i>Nosema</i> sp. ....  | 54        |
| 2.3.1 | Preparação do inóculo de <i>Nosema</i> sp.....  | 54        |
| 2.3.2 | Infecção das lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i> .....  | 54        |
| 2.3.3 | Parasitismo de <i>Cotesia flavipes</i> em lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i> infectadas por <i>Nosema</i> sp.....  | 55        |
| 2.3.  | Efeito de <i>Nosema</i> sp. na capacidade de voo de <i>Cotesia flavipes</i> .....   | 56        |
| 2.4   | Alterações em medidas morfológicas de <i>C. flavipes</i> em decorrência da infecção por <i>Nosema</i> sp. ....  | 57        |
| 2.5   | Deformações em <i>Cotesia flavipes</i> em decorrência da infecção por <i>Nosema</i> sp. ....  | 57        |
| 2.4   | Análise estatística.....  | 58        |
| 2.3   | RESULTADOS .....  | 58        |
| 2.3.1 | Efeito de <i>Nosema</i> sp. na capacidade de voo de <i>Cotesia flavipes</i> .....   | 58        |
| 2.3.2 | Alterações em medidas morfológicas de <i>C. flavipes</i> em decorrência da infecção por <i>Nosema</i> sp. ....  | 61        |
| 2.3.3 | Deformações em <i>Cotesia flavipes</i> em decorrência da infecção por <i>Nosema</i> sp. ....  | 65        |
| 2.4   | DISCUSSÃO .....   | 68        |
|       | REFERÊNCIAS .....   | 71        |
|       | <b>CAPÍTULO 3 - Potencial de óleos essenciais e produtos antimicrobianos na redução da infecção de <i>Nosema</i> sp. (Microspora: Nosematidae) em <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Crambidae).....</b> | <b>73</b> |
|       | RESUMO.....   | 73        |
|       | ABSTRACT .....  | 74        |
| 3.1   | INTRODUÇÃO .....  | 75        |
| 3.2   | MATERIAL E MÉTODOS .....  | 76        |
| 3.2.1 | Obtenção e multiplicação dos insetos .....  | 76        |
| 3.2.2 | Obtenção e extração dos óleos essenciais .....  | 77        |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 3.2.3   | Efeito dos óleos essenciais em dieta artificial sobre <i>Diatraea saccharalis</i>   | 78  |
| 3.2.4   | Avaliação de óleos essenciais e produtos antimicrobianos no desenvolvimento da infecção de <i>Nosema</i> sp. em <i>Diatraea saccharalis</i>                                   | 79  |
| 3.2.4.1 | Confirmação da infecção de <i>Nosema</i> sp. em <i>Diatraea saccharalis</i> .....   | 79  |
| 3.2.4.2 | Preparação do inóculo de <i>Nosema</i> sp. ....   | 80  |
| 3.2.4.3 | Infecção das lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i> .....  | 81  |
| 3.2.4.4 | Tratamento das lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i> com óleos essenciais e produtos antimicrobianos .....  | 81  |
| 3.2.5   | Aspectos biológicos de <i>Diatraea saccharalis</i> criadas em dieta artificial contendo óleos essenciais e produtos antimicrobianos .....                                     | 82  |
| 3.2.6   | Aspectos biológicos de <i>Cotesia flavipes</i> mantidas em <i>Diatraea saccharalis</i> criadas em dieta artificial contendo óleos essenciais e produtos antimicrobianos ..... | 83  |
| 3.2.7   | Determinação do perfil químico dos óleos essenciais.....  | 84  |
| 3.2.8   | Análise estatística .....   | 85  |
| 3.3     | <b>RESULTADOS</b> .....   | 85  |
| 3.3.1   | Efeito dos óleos essenciais em dieta artificial sobre <i>Diatraea saccharalis</i>   | 85  |
| 3.3.2   | Avaliação de óleos essenciais e produtos antimicrobianos no desenvolvimento da infecção de <i>Nosema</i> sp. em <i>Diatraea saccharalis</i>                                   | 87  |
| 3.3.3   | Aspectos biológicos de <i>Diatraea saccharalis</i> criadas em dieta artificial contendo óleos essenciais e produtos antimicrobianos .....                                     | 89  |
| 3.3.4   | Aspectos biológicos de <i>Cotesia flavipes</i> mantidas em <i>Diatraea saccharalis</i> criadas em dieta artificial contendo óleos essenciais e produtos antimicrobianos ..... | 91  |
| 3.3.5   | Determinação do perfil químico dos óleos essenciais.....  | 93  |
| 3.4     | <b>DISCUSSÃO</b> .....  | 94  |
|         | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 98  |
|         | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....   | 102 |
|         | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 103 |





## INTRODUÇÃO GERAL

A broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) é uma importante praga da cana-de-açúcar em todo o continente americano, principalmente no Brasil, o principal produtor mundial desta cultura. Infestações desta praga em canaviais acarretam em perdas econômicas, devido aos danos diretos ocasionados pela alimentação das lagartas e pelos danos indiretos, os quais são acarretados pela presença de fungos oportunistas, que desenvolvem podridões e, com isso, diminuem o rendimento e a qualidade do açúcar e do etanol (VARGAS et al., 2015; FERREIRA et al., 2018).

As larvas deste lepidóptero se desenvolvem quase que completamente dentro do colmo da planta e devido a esse comportamento o controle mais eficaz para esta praga tem sido por meio da utilização de agentes de controle biológico, com ênfase aos parasitoides. No Brasil, é utilizado o parasitoide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae), o parasitoide larval *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) e o parasitoide de pupa *Trichospilus diatraeae* (Cherian & Margabandhu) (Hymenoptera: Eulophidae) (AGROFIT, 2021).

*Cotesia flavipes* é o agente de controle biológico mais utilizado para a regulação populacional de *D. saccharalis*. No Brasil, este parasitoide é amplamente produzido, sendo liberado em aproximadamente 3,5 milhões de hectares de cana-de-açúcar para o controle deste inseto, representando um dos maiores programas de controle biológico do mundo (PARRA; COELHO, 2019; FONTES et al., 2020).

Apesar da eficiência e ampla utilização de *C. flavipes* como agente de controle de *D. saccharalis*, existe uma preocupação com a qualidade dos parasitoides produzidos massalmente e, isso se deve principalmente a diminuição significativa na capacidade de voo e dispersão deste parasitoide em campo nos últimos anos no Brasil (BOTELHO et al., 1980; VOLPE et al., 2014; DINARDO-MIRANDA et al., 2014). Tal ocorrência demonstra a importância do controle de qualidade durante o processo de produção massal deste parasitoide, a fim de se obter indivíduos com eficiência para controlar a praga alvo em campo. Dentre os fatores que podem estar relacionados com as alterações na

aptidão de *C. flavipes* é a associação com organismos simbiotes, os quais são responsáveis por uma ampla consequência ecológica e evolutiva para as espécies hospedeiras (HARRIS et al., 2010; DICKE; POELMAN, 2020).

A simbiose é um termo amplo usado para definir a associação entre duas ou mais espécies diferentes e o efeito que o simbiote tem sobre o hospedeiro, sejam benéfico (mutualismo), neutro (comensalismo) ou prejudicial (parasitismo) é utilizado para definir a forma de simbiose observada (DE BARY, 1879).

Os insetos são hospedeiros naturais de inúmeros microrganismos simbiotes, os quais podem ser obrigatórios, desempenhando funções ecológicas e biológicas essenciais para a sobrevivência e facultativos, os quais muitas vezes infectam apenas uma parte da população, e são mantidos por meio do fornecimento de benefícios condicionais ou por manipulação da reprodução do hospedeiro. A eliminação desses simbiotes facultativos frequentemente resulta em pouco ou nenhum custo ou benefício aparente para o inseto hospedeiro (DOUGLAS, 1989; DURON et al., 2008; BROWNLIE; JOHNSON, 2009).

Interações simbióticas mutualísticas entre polidnavírus (PDVs) e *Cotesia* spp. são comumente relatadas, e tal simbiote permite o desenvolvimento do parasitoide imaturo dentro do hospedeiro (STOLTZ; VINSON, 1979; HERNIOU et al., 2013; CÔNSOLI; KITAJIMA, 2017; TAN et al., 2018). São relatadas também a infecção de *Nosema* sp. (Microspora: Nosematidae) em criações de *D. saccharalis* e *C. flavipes*, entretanto, tal associação acarreta em efeitos deletérios para estes hospedeiros (SIMÕES et al., 2012; 2015).

Tais microsporídios são parasitas intracelulares obrigatórios, com aproximadamente 1400 espécies descritas representando 200 gêneros, dentre os quais estão associados a muitas espécies de invertebrados e vertebrados, incluindo os insetos (HAN; WEISS, 2017). Infecções por este microrganismo em insetos são geralmente crônicas, ocasionando patologias no hospedeiro, tais como fecundidade e longevidade reduzida (BJORNSON; OI, 2014).

Infecções por *Nosema* sp. em criações de *D. saccharalis* são comuns em biofábricas brasileiras, desencadeando diversos efeitos deletérios neste lepidóptero e em *C. flavipes*, visto que, alterações em parâmetros biológicos e no comportamento de busca destes hospedeiros são afetados devido a contaminação pelo microsporídio (SIMÕES et al., 2012; 2015). Aliado a isto,

indícios que populações de *C. flavipes* infectadas por este patógeno apresentam capacidade de voo reduzida, com uma porcentagem maior de indivíduos caminhadores, entretanto, tais evidências necessitam ser investigadas, a fim de associar a infecção pelo microsporídio com a redução na atividade de voo e dispersão do parasitoide (PAES, 2018).

Evidências como estas, apontam a necessidade de estudos que abordem os impactos desse microsporídio em aspectos morfológicos de *C. flavipes*, bem como, alternativas que eliminem ou reduzam a infecção de *Nosema* sp. em criações de *D. saccharalis* e de *C. flavipes*. Além disso, a prospecção de novos simbiosites desses insetos deve ser investigada, a fim de detectar possíveis alterações biológicas e morfológicas mediadas pela ação desses microrganismos. Partindo disso, neste estudo serão investigados: (1) detecção de simbiosites do gênero *Arsenhoponus*, *Hamiltonella*, *Cardinium*, *Spiroplasma*, *Rickettsia*, *Serratia*, *Wolbachia*, *Sodalis* e *Nosema* em *D. saccharalis* e *C. flavipes* mantidos em laboratório; (2) Alterações morfológicas e na capacidade de voo de *C. flavipes* ocasionadas pela infecção por *Nosema* sp. e (3) avaliar os efeitos *in vivo* dos antibióticos Albendy® (Albendazol) Flagimax® (Metronidazol) e Pletil® (Tinidazol) e dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Schinus terebinthifolius*, *Baccharis dracunculifolia*, *Origanum vulgare* e *Syzygium aromaticum* no desenvolvimento da infecção de *Nosema* sp. em *D. saccharalis*, bem como, avaliar os efeitos de tais produtos em parâmetros biológicos deste lepidóptero e de *C. flavipes*.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo proporcionou resultados inéditos que servirão de base para o aprimoramento de estratégias de controle de qualidade em produções massais de *D. saccharalis* e *C. flavipes*.

Como principais resultados foram obtidos: (1) a primeira associação entre *C. flavipes* e *Wolbachia*, sendo observadas alterações em parâmetros biológicos e na sobrevivência das fêmeas em decorrência desta associação; (2) infecções de *Nosema* sp. em *C. flavipes* afetam a atividade de voo deste parasitoide e, isso se deve principalmente, às alterações observadas em medidas morfológicas e deformações nas asas; (3) foram descobertos produtos antimicrobianos promissores para a redução da infecção de *Nosema* sp. em *D. saccharalis*, os quais apresentaram pouco ou nenhum efeito deletério em parâmetros biológicos deste lepidóptero e em *C. flavipes*.

Tais resultados fornecem informações valiosas sobre a influência de microrganismos simbiotes no desenvolvimento de *C. flavipes*, bem como, servirá como base para o aprimoramento de medidas de controle para infecções microsporídias em criações de *D. saccharalis* e deste parasitoide.

## REFERÊNCIAS

- AGROFIT (2020). Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- BJORNSON, S.; OI, D. **Microsporidia biological control agents and pathogens of beneficial insects**. 2014.
- BOTELHO, P.S.M. et al. Aspects of the population dynamics of *Apanteles flavipes* (Cameron) and support capacity of its host *Diatraea saccharalis* (Fabr.) In: CONGRESS OF INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 17, 1980, Manila. Proceedings.
- BROWNLIE, J. C; JOHNSON, K. N. Symbiont-mediated protection in insect hosts. **Trends in microbiology**, 17: 348-354, 2009.
- CÔNSOLI, F. L.; KITAJIMA, E. W. Symbiofauna associated with the reproductive system of *Cotesia flavipes* and *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera, Braconidae). **Journal of Morphological Sciences**, 23: 0-0, 2017
- DE BARY A (1879) Die erscheinung der symbiose: **Verlag von Karl J. Trübner**.
- DICKE M, C. A.; POELMAN, E. H. Microbial symbionts of parasitoids. **Annual review of entomology**, 65: 171-190, 2020.
- DINARDO-MIRANDA, L. L. et al. Dispersal of *Cotesia flavipes* in sugarcane field and implications for parasitoid releases. **Bragantia**, v. 73, p. 163-170, 2014.
- DOUGLAS, A. E (1989) Mycetocyte symbiosis in insects. *Biological Reviews*, 64: 409-434.
- DURON O, et al. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. **BMC biology**, 6: 1-12, 2008.
- FERREIRA, C. A. S. et al. Yield and technological quality of sugarcane cultivars under infestation of *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, 2018.
- FONTES et al. Estratégias de uso e histórico In: FONTES, EMG; VALADARES-INGLIS, M. C. Controle biológico de pragas da agricultura. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2020.
- HAN, B.; WEISS, L. M. Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 2, p. 5.2. 03, 2017.
- HARRIS, H. L. et al. Bacterial symbionts in insects: balancing life and death. **Symbiosis**, 51: 37-53, 2010.
- HERNIOU, E. A., et al. When parasitic wasps hijacked viruses: genomic and

functional evolution of polydnviruses. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 368: 20130051, 2013.

PAES, J. P. P. **Controle de qualidade de parasitoides multiplicados em *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae)** (Tese de doutorado), 2018.

PARRA, J. R. P.; COELHO, A. Applied biological control in Brazil: from laboratory assays to field application. **Journal of Insect Science**, v. 19, n. 2, p. 5, 2019.

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

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

STOLTZ, D. B.; VINSON, S. B. Viruses and parasitism in insects. **Advances in virus research**, 24: 125-171, 1979.

TAN, C. W. et al. Symbiotic polydnvirus of a parasite manipulates caterpillar and plant immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 115: 5199-5204, 2018.

VARGAS, G. et al. Sugarcane stem borers of the Colombian Cauca River Valley: current pest status, biology, and control. **Florida entomologist**, v. 98, n. 2, p. 728-735, 2015.

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