

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor ,
o texto completo desta dissertação
será disponibilizado somente a partir
de 03/08/2019.

JOÃO PAULO PEREIRA PAES

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

Botucatu

2018

JOÃO PAULO PEREIRA PAES

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

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

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

Coorientador: Prof. Dr. Dirceu Pratissoli

Botucatu

2018

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

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

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

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

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

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

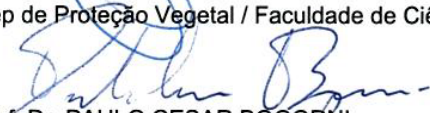
TÍTULO DA TESE: CONTROLE DE QUALIDADE DE PARASITÓIDES MULTIPLICADOS EM *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

AUTOR: JOÃO PAULO PEREIRA PAES

ORIENTADORA: REGIANE CRISTINA OLIVEIRA DE FREITAS BUENO

COORDENADOR: DIRCEU PRATISSOLI

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


Profa. Dra. REGIANE CRISTINA OLIVEIRA DE FREITAS BUENO
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu
Prof. Dr. PAULO CESAR BOGORNI
Pesquisa / Bug Agentes Biológicos
Profa. Dra. CAROLINA REIGADA MONTOYA
Ecologia e Biologia Evolutiva / UFSCAR - Universidade Federal de São Carlos
Prof. Dr. CARLOS FREDERICO WILCKEN
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas
Prof. Dr. MARCELO DE ALMEIDA SILVA
Depto de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP

Botucatu, 03 de agosto de 2018

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

Aos amigos do Agrimip pela amizade, apoio e convivência.

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

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

A todos meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

SUMÁRIO

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; PINTO, A. de S. Biological control of pests as a key component for sustainable sugarcane production. In: CORTEZ, L. A. B. (Ed.). **Sugarcane bioethanol — R&D for Productivity and Sustainability**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2010. cap. 41, p. 441–450.

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

POLANCZYK, R. A. et al. Pragas da cana-de-açúcar x métodos alternativos de controle. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília v. 33, n. 1, p. 17–17, 2004.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 2

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

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

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

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

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

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

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

Resumo

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

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

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

Abstract

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

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

2.1 INTRODUÇÃO

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 3

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

Título curto: Infecção de parasitas em parasitoides pupais

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

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

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

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

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

Resumo

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

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

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

Abstract

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

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

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

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

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

3.4 REFERÊNCIAS

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

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

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

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

- BIGLIARDI, E.; SACCHI, L. Cell biology and invasion of the microsporidia. **Microbes Infect.**, v. 3, p. 373–379, 2001.
- BJØRNSON, S.; SCHÜTTE, C. Pathogens of mass-produced natural enemies and pollinators. In: LENTEREN J.C. van (Ed.). **Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures**. Wallingford: CABI publishing, 2003. p. 133-165.
- BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; FERREIRA, B.S.C.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle Biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 477-494.
- BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P.; CHAGAS NETO, J.F.; OLIVEIRA, C.P.B. Associação do parasitoide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do parasitoide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) no controle de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, n. 3, p. 491-496, 1999.
- CANAOESTE. **Pragas da cana**. Sertazinho, 06 jun. 2013. Disponível em: <<http://www.canaoeste.com.br/conteudo/pragas-na-cana>>. Acesso em: 16 out. 2017.
- CHICHERA, R.A.; PEREIRA, F.F.; KASSAB, S.O.; BARBOSA, R.H.; PASTORI, P.L.; ROSSONI, C. Capacidade de busca e reprodução de *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Interciencia**, v. 37, n. 11, p. 852-856, 2012.
- CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Cana-de-açúcar, Safra 2017/2018, primeiro levantamento, abril/2017**. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2017, 62 p.
- CORRADI, N.; KEELING, P.J. Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, n. 1-2, p. 1-8, 2009.
- DEAN, P.; HIRT, R.P.; EMBLEY, T.M. Microsporidia: Why Make Nucleotides if You Can Steal Them? **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 11, p. 1-13, 2016.
- DINARDO-MIRANDA, L.L. Pragas. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p. 349-404.
- DINARDO-MIRANDA, L.L.; FRACASSO, J.V.; COSTA, V.P. da; ANJOS, I.A. dos; LOPES, D.O.P. Reação de cultivares de cana-de-açúcar à broca do colmo. **Bragantia**, v. 72, n.1, p. 29-34, 2013.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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