

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

S586l

Silva, Nadja Nara Pereira da

Influência de simbioses na aptidão de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) e *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) e potencial de produtos antimicrobianos na redução da infecção de *Nosema* sp. / Nadja Nara Pereira da Silva. -- Botucatu, 2021

104 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu

Orientadora: Regiane Cristina de Oliveira

1. controle biológico. 2. broca-da-cana. 3. parasitoide larval. 4. microsporídio. 5. controle de qualidade. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: 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.

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 Agrônomicas de Botucatu - UNESP



Prof.ª Dr.ª NADIA CALDATO (Participação Virtual)
Pós-Doutoranda - Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas 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 1×10^1 ; 1×10^2 ; 1×10^3 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® (Albendazol), Flagimax® (Metronidazol) e Pletil® (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 1×10^1 were analyzed; 1×10^2 ; 1×10^3 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⁺) (caixas pretas) e não infectada (W⁻) (caixas brancas) por *Wolbachia* (W⁻). 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 (dentro 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 1×10^1 (população 2), 1×10^2 (população 3) e 1×10^3 (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 1×10^1 (população 2), 1×10^2 (população 3) e 1×10^3 (população 4) esporos de *Nosema* sp./lagarta. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes entre si (¹Teste de Tuckey ou ²Teste 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 1×10^1 (população 2), 1×10^2 (população 3) e 1×10^3 (população 4) esporos de *Nosema* sp./lagarta. Colunas com a mesma letra minúscula não são

significativamente diferentes entre si (¹ Teste de Tuckey ou ² 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 1×10^1 (população 2), 1×10^2 (população 3) e 1×10^3 (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 1×10^1 (população 2), 1×10^2 (população 3) e 1×10^3 (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
CAPÍTULO 1 - Associação e influência de simbioses na aptidão de <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Crambidae) e <i>Cotesia flavipes</i> (Hymenoptera: Braconidae)	26
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
CAPÍTULO 2 - Alterações morfológicas de <i>Cotesia flavipes</i> (Hymenoptera: Braconidae) em decorrência da infecção de <i>Nosema</i> sp. (Microspora: Nosematidae)	49
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
	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)	73
	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	RESULTADOS	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	DISCUSSÃO	94
	REFERÊNCIAS	98
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
	REFERÊNCIAS	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 (BJORNSEN; 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 caminheiros, 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 simbiossomas 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 simbiossomas 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*.

CAPÍTULO 1

ASSOCIAÇÃO E INFLUÊNCIA DE SIMBIONTES NA APTIDÃO DE *DIATRAEA SACCHARALIS* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) E *COTESIA FLAVIPES* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)

RESUMO

Interações simbióticas entre microrganismos e artrópodes podem ocasionar alterações biológicas, fisiológicas e reprodutivas na população hospedeira. Com isso, o presente estudo teve como objetivo a prospecção de simbioses facultativas do gênero: *Arsenophonus*, *Hamiltonella*, *Cardinium*, *Spiroplasma*, *Rickettsia*, *Serratia*, *Wolbachia*, *Sodalis* e *Nosema* em *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) e *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) mantidos em laboratório, bem como, avaliar a influência da infecção na aptidão destes hospedeiros. Para tanto, foram utilizados primers 16S rDNA para a detecção destes simbioses facultativos em *D. saccharalis* e *C. flavipes* e, após a confirmação da associação foram realizadas avaliações biológicas e morfológicas no hospedeiro a fim de verificar possíveis alterações ocasionadas pela infecção por esses microrganismos. Nas amostras de *D. saccharalis* analisadas não foi detectada a presença das espécies de simbioses estudadas. Em *C. flavipes* foi detectada a presença do endossimbionte *Wolbachia*, sendo que, tal associação resultou em alterações em características biológicas deste parasitoide. Os resultados apresentados neste estudo fornecem informações que servirão de base para o entendimento sobre o papel de *Wolbachia* na manutenção da qualidade de populações/linhagens de *C. flavipes*.

Palavras-chave: controle biológico; controle de qualidade; endossimbionte; *Wolbachia*.

ABSTRACT

Symbiosis between microorganisms and host arthropods can cause biological, physiological, and reproductive changes in the host population. The present study aimed to survey facultative symbionts of the genera *Arsenophonus*, *Hamiltonella*, *Cardinium*, *Spiroplasma*, *Rickettsia*, *Serratia*, *Wolbachia*, *Sodalis* and *Nosema* in *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) and *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) in laboratory, and evaluate the influence of the infection on the fitness of these hosts. For this purpose, 16S rDNA primers were used to detect these facultative symbionts in the host species, and hosts' biological and morphological features were evaluated for changes resulting from the infection caused by these microorganisms. The bacterium symbiont species herein studied were not detected in the *D. saccharalis* samples analyzed, but the endosymbiont *Wolbachia* was detected in *C. flavipes* and altered biological aspects of this parasitoid insect. The results of this study provide information that can serve as a basis for understanding the role of *Wolbachia* in maintaining the quality of populations/lineages of *C. flavipes*.

Key words: biological control; quality control; endosymbionts; *Wolbachia*.

1.1 INTRODUÇÃO

A broca-da-cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae), é uma praga polífaga, tendo como plantas hospedeiras diversas espécies da família Poaceae. O ataque é comumente evidenciado em lavouras de cana-de-açúcar em todo o continente americano, principalmente no Brasil, maior produtor mundial desta cultura (ROSSATO et al., 2013; FERREIRA et al., 2018).

Os impactos econômicos ocasionados por esta praga em cultivos agrícolas se devem pelos danos diretos, causados pela alimentação das lagartas e pelos danos indiretos, os quais são acarretados pela presença de fungos oportunistas, que desenvolvem podridões. Em cana-de-açúcar, tais danos interferem na qualidade da matéria prima e reduzem o rendimento e a qualidade do açúcar e do etanol (FERREIRA et al., 2018).

O principal método de controle empregado para a regulação populacional de *D. saccharalis* é por meio da utilização do parasitoide larval, *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), utilizado em liberações inundativas em cerca de 3,5 milhões de hectares em cana-de-açúcar no Brasil, representando um dos maiores programas de controle biológico do mundo (PARRA; COELHO, 2019; FONTES et al., 2020).

Devido ao sucesso no controle de *D. saccharalis*, por meio da utilização de *C. flavipes*, medidas que visam à qualidade deste agente de controle biológico e do hospedeiro durante o processo de produção são imprescindíveis. Vários fatores estão relacionados com alterações na aptidão de insetos, dentre esses, a associação com organismos simbiotes 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 da provisão de benefícios condicionais ou por manipulação da reprodução do hospedeiro. A eliminação desses simbioss 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 polydnávirus (PDVs) e *Cotesia* spp. são comumente relatadas, os quais desempenham papel importante no 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*, o que compromete a produção de *C. flavipes*, e sua consequente utilização em programas de controle biológico, visto que, infecções por este microrganismo causam alterações em parâmetros biológicos e no comportamento de busca deste agente de controle (SIMÕES et al., 2012).

Evidências como essas 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. Com isso, o presente estudo teve como objetivo a prospecção de simbioss facultativos do gênero: *Arsenophonus*, *Hamiltonella*, *Cardinium*, *Spiroplasma*, *Rickettsia*, *Serratia*, *Wolbachia*, *Sodalis* e *Nosema* em *D. saccharalis* e *C. flavipes* mantidos em laboratório, bem como, avaliar a influência da infecção na aptidão destes hospedeiros.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

As criações e bioensaios foram realizados nos laboratórios do Grupo de Pesquisa em Manejo Integrado de Pragas na Agricultura (AGRIMIP), as análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular e as medições morfológicas no Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF) do Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita

Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo. As criações e ensaios foram realizados sob condições controladas a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, umidade relativa (UR) de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h.

1.2.1 Obtenção e multiplicação dos insetos

Os exemplares de *D. saccharalis* e *C. flavipes* foram obtidos em biofábrica do Estado de São Paulo, Brasil. Para a multiplicação de *D. saccharalis* foi utilizada a dieta artificial proposta por Hensley e Hammond (1968) adaptada (ágar substituído pela carragenina) e as metodologias de criação para este inseto hospedeiro e para o parasitoide larval *C. flavipes* seguiram recomendações descritas por Garcia et al. (2009).

1.2.3 Detecção de simbioses de *Diatraea saccharalis* e *Cotesia flavipes*

1.2.3.1 Extração do DNA genômico

Foram selecionadas aleatoriamente uma lagarta de *D. saccharalis* (4º ínstar) e 50 exemplares de *C. flavipes* para extração do DNA genômico e padronização da reação de polimerase em cadeia (PCR), provenientes da criação estoque mantidas no laboratório do AGRIMIP (FCA/UNESP).

A lagarta de *D. saccharalis* foi submetida a um processo de lavagem com solução salina (0,85% NaCl) seguida de álcool 70%, sendo posteriormente macerada em Becker de vidro estéril (10 mL), sendo removido partes do corpo do inseto. O conteúdo corporal resultante foi dissolvido em solução de 80 µl de resina Chelex100 (Bio-Rad Laboratories) a 10%, diluído em água estéril e 8 µl de proteinase K (20 microgramas/mL) em microtubos de 200 µl.

Para a extração do DNA dos parasitoides foi realizado um procedimento semelhante, diferindo apenas no processo de maceração, onde os exemplares dos parasitoides (50 indivíduos) foram macerados diretamente no microtubo de 200 µl utilizando os mesmos reagentes descritos acima.

Posteriormente, os tubos foram agitados por cinco segundos em Vortex Biomixer MOD QL901 e Mini centrífuga de bancada Ministar a 6200 rpm e

depois transferidos para termociclador Infinigen (modelo TC-96CG) a 95°C durante 20 minutos.

1.2.3.2 Reação em cadeia de polimerase (PCR) e sequenciamento

A partir do DNA extraído, foi realizada a metodologia de reação em cadeia de polimerase (PCR) para a detecção molecular dos simbiontes do gênero: *Arsenophonus*, *Hamiltonella*, *Cardinium*, *Spiroplasma*, *Rickettsia*, *Serratia*, *Wolbachia*, *Sodalis* e *Nosema* utilizando os iniciadores (primers) específicos (Tabela 1) que amplificam a região small subunit (SSU) do RNA ribossômico.

Tabela 1 - Lista de primers utilizados na detecção de simbioses de *Diatraea saccharalis* e *Cotesia flavipes*

Simbionte	Gene alvo	Sequência do Primer 5'>3'	(pb)	Referência
<i>Arsenophonus</i>	16S rRNA	F-CGTTTGATGAATTCATAGTCAAA R-GGTCCTCCAGTTAGTGTTACCCAAC	600	THAO; BAUMANN, 2004
<i>Cardinium</i>	16S rRNA	F-TACTGTAAGAATAAGCACCGGC R-GTGGATCACTTAACGCTTTTCG	900	ZCHORI-FEIN; PEARLMAN, 2004
<i>Hamiltonella</i>	16S rRNA	F-TGAGTAAAAGTCTGGAATCTGG R-AGTTCAAGACCGCAACCTC	700	ZCHORI-FEIN; BROWN, 2002
<i>Rickettsia</i>	16S rRNA	F-GCTCAGAACGAACGCTATC R-GAAGGAAAGCATCTCTGC	900	GOTTLIEB et al., 2006
<i>Serratia</i>	16S rRNA	F-CGCAGGCGGTTTGTTAAGTC R-CTTCAAGGGCACAACTCCA	268	RIBEIRO et al., 2019
<i>Sodalis</i>	16S rRNA	F-ACCGCATAACGTCGCAAGACC R-CTTAACCCAACATTTCTCAACACGAG	1000	NOVÁKOVÁ; HYPŠA, 2007
<i>Spiroplasma</i>	16S rRNA	F-GCTTAACTCCAGTTCGCC R-CCTGTCTCAATGTAACTC	800	MONTENEGRO et al., 2005
<i>Wolbachia</i>	16S rRNA	F-CGGGGGAAAAATTTATTGCT R-AGCTGTAATACAGAAAAGTAAA	700	HEDDI et al., 1999
<i>Carsonella</i>	16S rRNA	F-CACGTGCTACAATGAGTAAACAA R-GGTTCCCCTACAGCTACCTTG	279	THAO et al., 2000
<i>Nosema</i>	16S rRNA	F-CACCAGGTTGATTCTGCC R-TTATGATCCTGCTAATGGTTC	222	VOSSBRINCK et al., 1993

Para a detecção dos simbioses do gênero: *Arsenophonus*, *Hamiltonella*, *Cardinium*, *Spiroplasma*, *Rickettsia*, *Serratia*, *Wolbachia* e *Sodalis* foi realizada em um mix de PCR contendo 12,5µl de Taq DNA Polimerase (NeoBio); 7,5µl água miliQ; 1,0µl de cada primer e 3,0µl de DNA da amostra, totalizando um volume de 25µl. Para detecção de *Nosema* sp. foi utilizado um mix contendo 12,5µl de Taq DNA Polimerase (NeoBio); 5µl água miliQ; 1,25µl de cada primer e 5,0µl de DNA da amostra, totalizando um volume de 25µl.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador INFINIGEN (modelo TC-96CG), executadas seguindo as seguintes condições:

Arsenophonus e *Hamiltonella*: temperatura de desnaturação inicial a 95°C por 2 min., seguido de 30 ciclos de 95°C a 30 seg., 58°C a 30 seg., 72°C a 1 min. e extensão final de 72°C por 5 min.; *Cardinium*: temperatura de desnaturação inicial a 95°C por 2 min., seguido de 30 ciclos de 92°C a 30 seg., 57°C a 30 seg., 72°C a 30 seg. e extensão final de 72°C por 5 min; *Regiella* e *Spiroplasma*: temperatura de desnaturação inicial a 94°C por 5 min., seguido de 30 ciclos de 94°C a 1 min., 52°C a 1 min., 72°C a 2 min. e extensão final de 72°C por 5 min; *Rickettsia*: temperatura de desnaturação inicial a 95°C por 2 min., seguido de 30 ciclos de 92°C a 30 seg., 58°C a 30 seg., 72°C a 30 seg. e extensão final de 72°C por 5 min.; *Serratia*: temperatura de desnaturação inicial a 95°C por 10 min., seguido de 35 ciclos de 95°C a 1 min., 62°C a 1 min., 72°C a 1 min. e extensão final de 72°C por 1 min; *Sodalis*: temperatura de desnaturação inicial a 94°C por 5 min., seguido de 30 ciclos de 94°C a 1 min., 62°C a 1 min., 72°C a 2 min. e extensão final de 72°C por 5 min; *Wolbachia*: temperatura de desnaturação inicial a 95°C por 3 min., seguido de 30 ciclos de 95°C a 30 seg., 55°C a 30 seg., 72°C a 30 seg. e extensão final de 72°C por 5 min; *Nosema*: temperatura de desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos, seguida por 45 ciclos com desnaturação a 95 °C por 1 minuto, seguida pela fase de anelamento a 48 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto e com uma fase final de polimento por 4 minutos a 72 °C.

Para leitura dos produtos resultantes das PCRs foi empregado marcador molecular 100pb (Norgen) e gel de agarose 1%, contendo 80 ml de solução tampão TBE; 0,8g de agarose (Neo3Bio) e 0,4µl de intercalante de DNA GelRed (NeoBio), sendo visualizados em transiluminador de luz UV (Major Science).

Foi realizada a purificação dos produtos das PCRs que detectaram a presença de simbioses, a qual foi realizada por kit de purificação Cellco, de acordo com as recomendações do fabricante. As análises quantitativas foram feitas por densidade ótica e espectrofotômetro (NanoDrop MD-1000 UV-Vis).

Os fragmentos amplificados foram sequenciados por meio do sequenciador automático de DNA Sanger (Modelo: ABI 3500 – Applied Biosystems), no Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo. As sequências de DNA obtidas foram comparadas às depositadas no GenBank (NCBI – National Center for Biotechnology Information) por meio do programa BLAST

(Basic Local Alignment Search Tool) e a identificação específica dos simbiossitos foi realizada a partir de escores de similaridade de sequências e porcentagem de similaridade.

1.2.4 Produção de linhagens de *Cotesia flavipes* apossimbiossitos

Após a confirmação da infecção por *Wolbachia*) foram selecionados indivíduos para a produção de linhagens irmãs apossimbiossitos. Para isso, partes dos indivíduos foram alimentadas com mel puro mantendo a associação com *Wolbachia* (W^+), enquanto outra parte da população foi submetida à alimentação de mel puro com a adição de antibiótico (0,25% de tetraciclina) para a eliminação do simbiossito (W^-) (LI et al., 2014).

O processo de eliminação de *Wolbachia* em *C. flavipes* foi realizado por quatro gerações consecutivas, sendo posteriormente, selecionados aleatoriamente indivíduos das duas populações para a confirmação da eliminação do simbiossito por meio de PCR de acordo com as metodologias descritas anteriormente.

Após o processo de descontaminação, a população submetida à ingestão de antibióticos foi alimentada por dez gerações com mel puro sem adição de produtos para a completa restauração da microbiota intestinal e consequentemente eliminar possíveis efeitos colaterais do tratamento.

1.2.5 Alterações no desenvolvimento de *Cotesia flavipes* associada à infecção de *Wolbachia*

1.2.5.1 Características biológicas

Foram utilizadas lagartas de *D. saccharalis* aptas para o parasitismo (entre 15 a 23 mm), provenientes da criação estoque do AGRIMIP (FCA/UNESP), as quais foram ofertadas individualmente 20 para fêmeas adultas de *C. flavipes* W^+ e W^- com até 48 horas de desenvolvimento para o processo de parasitismo. Em seguida, tais lagartas foram mantidas individualmente em cápsulas de plástico (3 cm de diâmetro x 7 cm de altura), contendo no interior dieta de realimentação, sendo replicadas 20 lagartas para cada população do parasitoide.

Para avaliação das características biológicas de *C. flavipes*, após a saída das larvas do parasitoide do corpo da lagarta e a pupação, as massas de pupas foram retiradas e acondicionadas em tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro e 1cm de altura), sendo observadas diariamente para a determinação do período de desenvolvimento (dias) ovo-pupa e pupa-adulto; a viabilidade pupal (equação 1); a razão sexual (equação 2) e a sobrevivência dos adultos.

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Número de pupas do parasitoide}}{\text{Número de parasitoides}} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

$$\text{Razão sexual} = \frac{\text{Número de fêmeas}}{\text{Número de fêmeas} + \text{Número de machos}} \quad \text{Eq. 2}$$

Para a avaliação da sobrevivência dos machos e fêmeas adultos, vinte indivíduos de ambos os sexos foram selecionados aleatoriamente e individualizados em tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8 cm de altura) e observados diariamente até a constatação da mortalidade. Na parte interior desses tubos eram aplicadas finas fileiras de mel puro com o auxílio de alfinete entomológico para a alimentação dos adultos.

1.2.5.2 Morfometria

Foram realizadas as medições morfológicas de dez fêmeas e dez machos adultos de *C. flavipes* com W^+ e W^- . Os parasitoides foram colocados em lâminas contendo álcool em gel, posicionados em vista lateral direita. As lâminas com os parasitoides foram fotografadas em microscópio óptico Leica EZ4 D acoplado a uma câmera. Posteriormente, as fotografias foram medidas usando o software ImageJ – Version 2.00.

As estruturas morfológicas medidas foram: 1 - comprimento total (tórax + abdômen); 2 - comprimento da asa anterior direita; 3 - largura da asa anterior direita e 4 - comprimento da tíbia posterior, medindo da junção da tíbia com o tarso.

1.2.5.3 Capacidade de voo

Para a avaliação da capacidade de voo de *C. flavipes* W^+ e W^- foi utilizada a metodologia proposta por Dutton e Bigler, (1995) e adaptada por Prezotti et al. (2002).

Para tanto, foram utilizadas unidades-teste, as quais consistem em um cilindro de PVC, com o interior recoberto com papel cartão preto e, com o fundo vedado com papel preto ajustado sobre um disco de isopor de 1 cm de espessura e de mesmo diâmetro do cilindro. Na parte interna da unidade-teste foi pincelado um anel de cola entomológica sobre uma faixa de acetato (1cm de espessura) a 3,5 cm da extremidade inferior do cilindro, utilizado como barreira para os parasitoides caminhadores. A parte superior da unidade-teste foi vedada com uma placa de Petri transparente coberta internamente com cola entomológica, servindo como armadilha para os parasitoides em voo.

O tubo de ensaio (2,5 cm de diâmetro x 8 cm de altura) contendo uma massa de pupa, com aproximadamente 100 pupas de *C. flavipes* prestes à emergência foi fixado no centro da região inferior da unidade-teste, sobre o disco de isopor. No interior do tubo foi fornecido gotículas de mel puro para servirem de alimento para os parasitoides. Foram utilizadas vinte unidades-testes para cada população do parasitoide, as quais foram mantidas em câmara de fluxo laminar vertical sob luz fluorescente, onde permaneceram por três dias.

Posteriormente avaliou-se o número de espécimes de *C. flavipes* presentes no anel de cola (caminhadores), na placa de Petri (voadores) e no fundo do cilindro (não voadores).

1.2.7 Análise Estatística

Os dados resultantes dos bioensaios foram analisados por análises exploratórias para avaliar as premissas de normalidade e homogeneidade de variâncias pelos testes de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$) e Bartlett ($p < 0,05$). Os dados de morfometria foram submetidos à análise pelo teste t ($p < 0,05$) para comparar as diferenças entre as médias. Os dados que não apresentaram normalidade e homogeneidade de variâncias (período de desenvolvimento ovo-pupa e pupa-adulto, viabilidade, razão sexual e teste de voo) foram submetidos à análise não paramétrica. O teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($p < 0,05$) foi utilizado para comparar dois tratamentos e o de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) para comparações múltiplas.

As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier foram construídas com dados de sobrevivência em idades específicas e comparadas pelo teste de LogRank ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas no software InfoStat (DI RIENZO et al., 2011).

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Simbiontes de *Diatraea saccharalis* e *Cotesia flavipes*

Não foi detectada a associação entre as espécies de simbiontes prospectadas e a população de *D. saccharalis* estudada. No entanto, em *C. flavipes* foi detectada a presença da α – proteobacterium *Wolbachia* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) (98% de identidade com o acesso: CP037426.1 no GenBank).

Dentre as detecções de simbiontes realizadas em *C. flavipes* foi observado que os indivíduos que receberam o tratamento com antibiótico apresentaram resultados negativos na PCR para infecção por *Wolbachia* após quatro gerações sucessivas da ingestão da tetraciclina. Assim como, também foi

observada a ausência desse simbiote na população W^+ após dezessete gerações da primeira detecção de *Wolbachia* mesmo sem a adição de tratamento na sua alimentação.

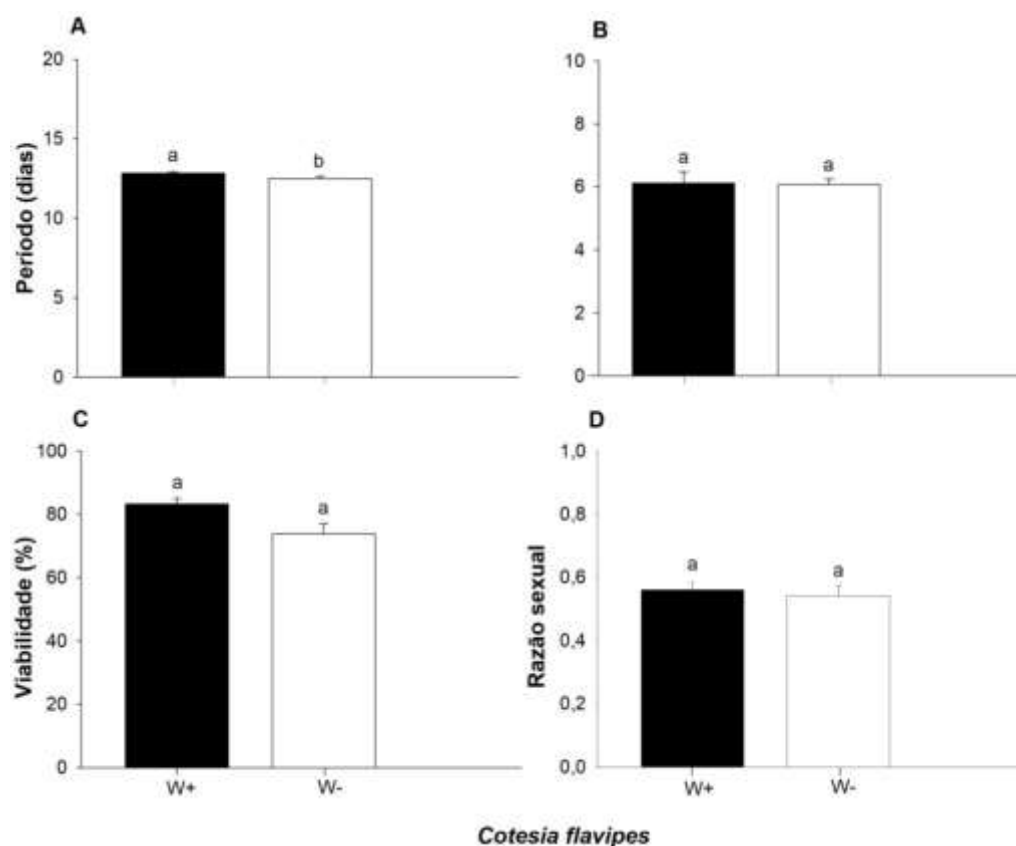
1.3.2 Alterações no desenvolvimento de *Cotesia flavipes* associada à infecção de *Wolbachia*

1.3.2.1 Características biológicas

Alterações biológicas em *C. flavipes* ocasionadas pela associação com *Wolbachia* foram observadas na duração do período de desenvolvimento (dias) de ovo-pupa ($p = 0,010$) e na sobrevivência de fêmeas adultas das duas populações ($p < 0,001$).

O período de desenvolvimento (dias) ovo-pupa de *C. flavipes* W^+ foi superior ao observado para populações W^- . Entretanto, no desenvolvimento pupa-adulto não foram observadas diferenças estatísticas entre as duas populações ($p = 0,935$) (Figura 1).

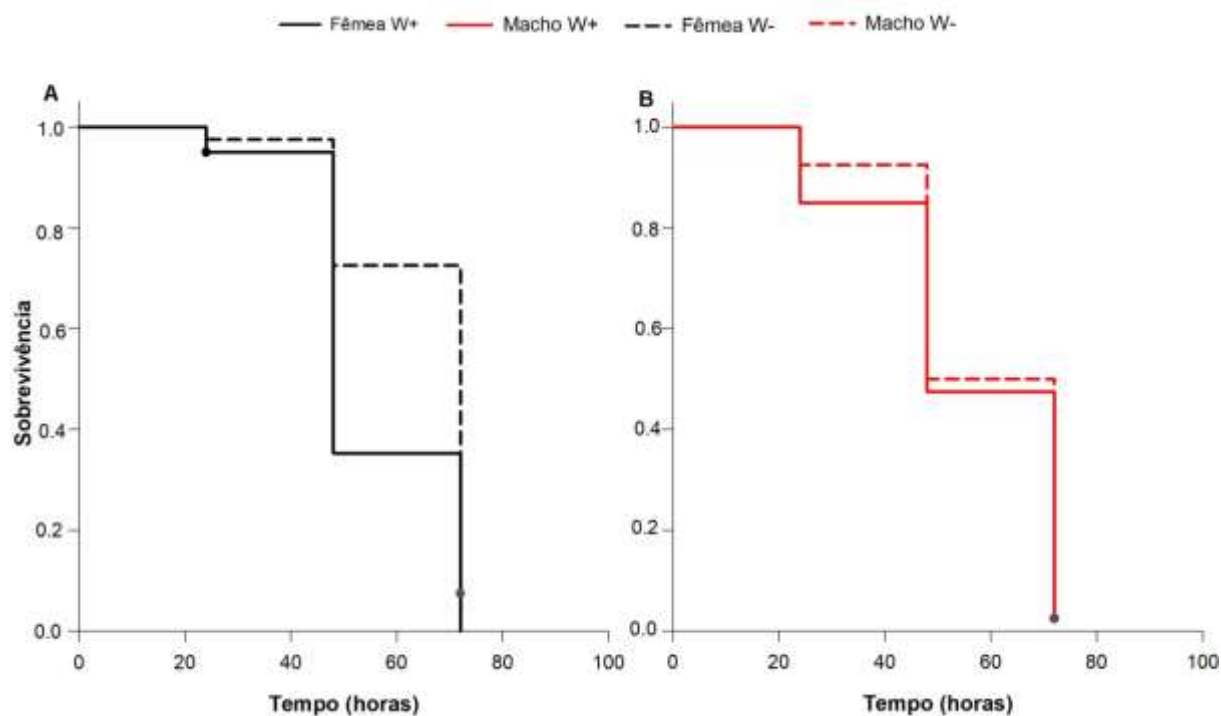
Figura 1 - Características biológicas de *Cotesia flavipes* infectada (W+) e não (W-) infectada por *Wolbachia*. Desenvolvimento (dias) ovo-pupa (A) e pupa-adulto (B), viabilidade de pupas (C) e razão sexual (D). As letras diferentes dentro de cada gráfico são significativamente diferentes entre si (Teste de Wilcoxon Mann-Whitney $p < 0,05$)



Não foram observadas diferenças entre as populações de *C. flavipes* em relação aos parâmetros biológicos viabilidade de pupas ($p = 0,234$) e razão sexual ($p = 0,958$) (Figura 1).

A análise de sobrevivência não demonstrou diferenças na longevidade entre machos das duas populações ($p = 0,663$), os quais apresentaram sobrevivência média de 48 horas (Figura 2). Entretanto, ao comparar a sobrevivência de fêmeas W⁺ e W⁻, foram observadas diferenças estatísticas ($p < 0,001$). Fêmeas de *C. flavipes* sem a presença de *Wolbachia* apresentam em média 72 horas de sobrevivência, as quais são mais longevas que fêmeas com a presença deste simbionte (Figura 2).

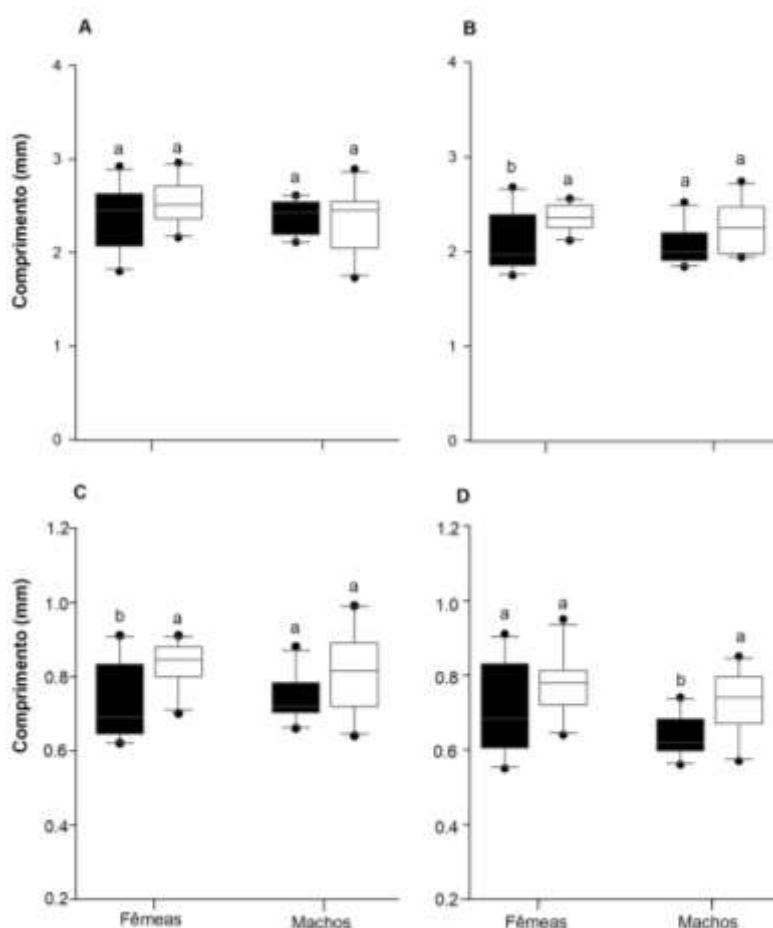
Figura 2 - Sobrevivência de *Cotesia flavipes* infectada (W+) e não infectada (W-) por *Wolbachia*. Fêmeas (W+ e W-) (A) e machos (W+ e W-) (B). Teste de LogRank ($p < 0,05$)



1.3.2.2 Morfometria

Somente foram observadas diferenças estatísticas entre fêmeas de *C. flavipes* infectadas e não infectadas por *Wolbachia* no comprimento ($p = 0,025$) e largura (mm) ($p = 0,013$) da asa anterior direita, onde, tais medidas foram superiores em fêmeas W⁺ (Figura 3). Os machos de *C. flavipes* W⁺ e W⁻ diferiram entre si somente no comprimento (mm) da tíbia ($p = 0,015$), sendo que, quando não infectados por *Wolbachia* tais indivíduos apresentam em média tamanho de tíbia maior que os com a presença deste simbiote.

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^+) (caixas pretas) e não infectada (W^-) (caixas brancas) por *Wolbachia* (W). 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 $p < 0,05$)

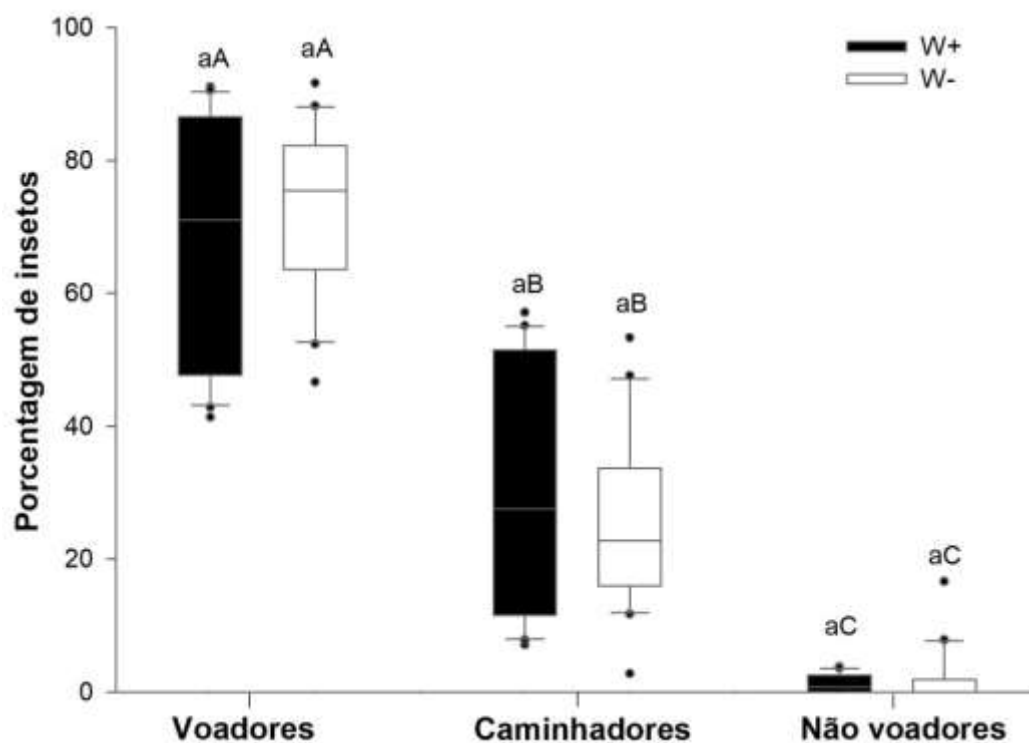


1.3.2.3 Capacidade de voo

Não foram observadas diferenças estatísticas na porcentagem de adultos voadores ($p = 0,570$), caminhadores ($p = 0,551$) e não voadores ($p = 0,703$) entre as populações de *C. flavipes* (W^+ e W^-) (Figura 5). Entretanto, ao comparar a

capacidade de voo de indivíduos da mesma população foi observada a presença de um número maior de indivíduos voadores ($p < 0,0001$) (Figura 3).

Figura 4 - Porcentagem de adultos voadores, caminheiros 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 (dentro a população) não são significativamente diferentes entre si pelos teste de Wilcoxon Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis $p < 0,05$, respectivamente.



1.4 DISCUSSÃO

Associações simbióticas entre *Wolbachia* e *Cotesia* spp. são relatadas na literatura, entretanto, a associação entre *Wolbachia* e *C. flavipes* é apresentada pela primeira vez neste estudo (MOCHIAH et al., 2002; RATTAN et al., 2011; SRINIVASA et al., 2011; BRANCA et al., 2011; 2019; MURTHY et al., 2015). *Wolbachia* é uma bactéria simbiote intracelular obrigatório, encontrada infectando uma grande diversidade de artrópodes, é transmitida verticalmente pela fêmea através do óvulo, estando presente principalmente nos tecidos reprodutivos do hospedeiro (O'NEILL et al., 1997; DURON et al., 2008). Evidências remotas também relatam a transferência horizontal entre *Wolbachia* e o hospedeiro (O'NEILL et al., 1992; WERREN et al., 1995). Contudo, não foram observadas infecções desse simbiote em *D. saccharalis*, demonstrando que a transmissão de *Wolbachia* em *C. flavipes* é realizada verticalmente.

Infecções por *Wolbachia* são responsáveis principalmente por manipulações na sexualidade ou alterações na ecologia reprodutiva do hospedeiro, induzindo a incompatibilidade citoplasmática, partenogênese, feminização e aniquilação de machos. Tais manipulações garantem o isolamento reprodutivo da população infectada e conseqüentemente o sucesso no estabelecimento desse simbiote na população hospedeira (STOUTHAMER et al., 1999; MOCHIAH et al., 2002).

Embora algumas cepas de *Wolbachia* infectem com sucesso as populações hospedeiras, outras não apresentam a capacidade de parasitar os sistemas reprodutivos de seu hospedeiro ou fazê-lo de maneira adequada (HOFFMANN et al., 1996). Tal afirmação elucida o ocorrido neste estudo, o qual não foi observado feminização e aniquilações de machos de *C. flavipes* infectado por *Wolbachia*, sugerindo que esse simbiote não apresenta a capacidade de induzir partenogênese telítica nesta população e/ ou não consigam se replicar a níveis altos no organismo deste parasitoide. Outro fato observado que pode firmar tal observação foi a descontaminação de *Wolbachia* em populações de *C. flavipes* mantidas sem a ingestão de antibióticos após algumas gerações mantidas em laboratório.

Embora que, não tenha sido observada a indução de partenogênese em *C. flavipes* devido à infecção por *Wolbachia*, investigações futuras devem avaliar

o efeito da infecção deste simbiote na incompatibilidade citoplasmática intraespecífica deste parasitoide, visto que, a provável mistura de populações infectadas e não infectadas que apresentam tal alteração reprodutiva ocasiona uma redução na taxa de crescimento populacional do parasitoide e com consequentes implicações em programas de controle biológico.

Com relação às alterações no desenvolvimento de *C. flavipes* ocasionadas pela infecção por *Wolbachia*, foi observado que tal associação manifestou alterações em características biológicas e morfológicas deste parasitoide. Os resultados apresentados neste estudo são apoiados por diversos estudos que demonstram alterações na aptidão de artrópodes infectados por *Wolbachia* (MCGRAW; O'NEILL, 2004; FRY et al., 2004; SERGA et al., 2014; STEVANOVIC et al., 2015).

Tais efeitos sobre a aptidão de artrópodes podem ser revertidos com o tratamento da população infectada por meio de antibióticos, assim como foi registrado em *C. flavipes*, contudo, Dedeine et al (2001; 2005) constataram a participação dessa bactéria na oogênese de *Asobara tabida* Nees (Hymenoptera: Braconidae), em que fêmeas aposimbiontes foram incapazes de produzir oócitos maduros e, portanto, não conseguiam se reproduzir, se tratando do primeiro registro da transição da simbiose facultativa para a obrigatória em associações artrópodes- *Wolbachia*. Em *C. flavipes* não foi constatado tal efeito, uma vez que as populações aposimbiontes não apresentaram alterações reprodutivas.

Os resultados inéditos fornecidos em nosso estudo fornecem informações que servirão de base para o entendimento sobre o papel de *Wolbachia* na manutenção da qualidade de *C. flavipes*, além de demonstrar a importância de estudos voltados para esses microrganismos, uma vez, que é evidente a sua influência no desenvolvimento dos hospedeiros associados.

REFERÊNCIAS

- BRANCA, A. et al. Relative influence of host, *Wolbachia*, geography and climate on the genetic structure of the Sub-Saharan parasitic wasp *Cotesia sesamiae*. **Frontiers in Ecology and Evolution**, 7: 309, 2019.
- BRANCA, A. et al. Intraspecific specialization of the generalist parasitoid *Cotesia sesamiae* revealed by polyDNAvirus polymorphism and associated with different *Wolbachia* infection. **Molecular Ecology**, 20: 959-971, 2011.
- 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**.
- DEDEINE, F. et al. *Wolbachia* requirement for oogenesis: occurrence within the genus *Asobara* (Hymenoptera, Braconidae) and evidence for intraspecific variation in *A. tabida*. **Heredity**, 95: 394-400, 2005.
- DEDEINE, F. et al. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98, 2001.
- DI RIENZO, J. A. et al. InfoStat versión 2011. **Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina**. 8: 195-199, 2011
- DICKE, M. et al. Microbial symbionts of parasitoids. **Annual review of entomology**, 65: 171-190, 2020
- DOUGLAS, A. E. Mycetocyte symbiosis in insects. **Biological Reviews**, 64: 409-434, 1989.
- DURON, O. et al. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. **BMC biology**, 6: 1-12, 2008.
- DUTTON, A.; BIGLER, F. Flight activity assessment of the egg parasitoid *Trichogramma brassicae* (Hym.: Trichogrammatidae) in laboratory and field conditions. **Entomophaga**, 40: 223-233, 1995
- FERREIRA, C. A. D. S. et al. Yield and technological quality of sugarcane cultivars under infestation of *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). **Arquivos do Instituto Biológico**, 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.

FRY, A. J. et al. Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster*. **Heredity**, 93: 379-389, 2004.

GARCIA, J. F. et al. Criação do parasitoide *Cotesia flavipes* em laboratório. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: Editora UFLA, 199-220, 2009.

GOTTLIEB Y. et al. Identification and localization of a *Rickettsia* sp. in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Applied and Environmental Microbiology**, 72: 3646-3652, 2006

HARRIS, H. L. et al. Bacterial symbionts in insects: balancing life and death. **Symbiosis**, 51: 37-53, 2010

HEDDI, A. et al. Four intracellular genomes direct weevil biology: nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 96: 6814-6819, 1999

HENSLEY, S. D.; HAMMOND, A. M. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. **Journal of Economic Entomology**, 61: 1742-1743, 1968.

HERNIOU, E. A. et al. When parasitic wasps hijacked viruses: genomic and functional evolution of polydnaviruses. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 368: 20130051, 2013.

HOFFMANN, A. A. et al. Naturally-occurring *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility. **Heredity**, 76: 1-8, 1996.

LI, Y. Y. et al. Review of treatment methods to remove *Wolbachia* bacteria from arthropods. **Symbiosis**, 62: 1-15, 2014.

MC GRAW, E. A.; O'NEILL, S. L. *Wolbachia pipientis*: intracellular infection and pathogenesis in *Drosophila*. **Current opinion in microbiology**, 7: 67-70, 2004.

MOCHIAH, M. B. et al. *Wolbachia* infection in *Cotesia sesamiae* (Hymenoptera: Braconidae) causes cytoplasmic incompatibility: implications for biological control. **Biological Control**, 25: 74-80, 2002.

MONTENEGRO, H. et al. Male-killing *Spiroplasma* naturally infecting *Drosophila melanogaster*. **Insect Molecular Biology** 14 (3): 281-287, 2005.

MURTHY, K. S. et al. Reproductive Alterations by *Wolbachia* in the Braconid *Cotesia vestalis* (Haliday). In: **New Horizons in Insect Science: Towards Sustainable Pest Management**, Springer, New Delhi, 347-351, 2015.

NOVÁKOVÁ, E. et al. *Arsenophonus*, an emerging clade of intracellular symbionts with a broad host distribution. **BMC microbiology**, 9: 1-14, 2009.

O'NEILL, S. L. et al. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. **Proceedings of the national academy of sciences**, 89: 2699-2702, 1992.

O'NEILL, S. L. et al. **Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction**. Oxford University Press, 1997.

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

PREZOTTI, L. et al. Teste de voo como critério de avaliação da qualidade de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae): Adaptação de metodologia. **Neotropical Entomology**, 31: 411-417, 2002.

RATTAN, R. S. et al. Molecular evidence for the presence of the endosymbiotic bacteria *Wolbachia* in *Cotesia* populations (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, 14: 183-185, 2011.

RIBEIRO, M. F. **Parasitismo de populações de *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) em *Gonipteris platensis* (Coleoptera: Curculionidae) e endossimbiontes associados**. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas), Universidade Estadual Paulista, 2019.

ROSSATO, J. et al. Characterization and impact of the sugarcane borer on sugarcane yield and quality. **Agronomy Journal**, 105: 643– 648, 2013.

SERGA, S. et al. Fecundity as one of possible factors contributing to the dominance of the w Mel genotype of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila melanogaster*. **Symbiosis**, 63: 11-17, 2014.

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**, 63: 164-171, 2012.

SRINIVASA, M. K. et al. Detection and characterization of *Wolbachia* in *Cotesia plutellae* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the diamond back moth *Plutella xylostella* (Linn.). **Journal of Biological Control**, 25: 213-216, 2011.

STEVANOVIC, A. L. et al. *Wolbachia*-mediated antiviral protection in *Drosophila* larvae and adults following oral infection. **Applied and Environmental Microbiology**, 81: 8215-8223, 2015.

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

STOUTHAMER, R. et al. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. **Annual Reviews in Microbiology**, 53: 71-102, 1999.

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

THAO, M. L.; BAUMANN, P. Evolutionary relationships of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, 70: 3401-3406, 2004.

THAO, M. L. et al. Cospeciation of psyllids and their primary prokaryotic endosymbionts. **Applied and environmental microbiology**, 66: 2898-2905, 2000.

VOSSBRINCK, C. R. et al. Ribosomal DNA sequences of *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon cuniculi*: species identification and phylogenetic construction. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 40: 354-362, 1993.

WERREN, J. H. et al. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, 261: 55-63, 1995.

ZCHORI-FEIN, E.; BROWN, J. K. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). **Annals of the Entomological Society of America** 95: 711– 718, 2002.

ZCHORI-FEIN, E.; PERLMAN, S. J. Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. **Molecular ecology**, 13: 2009-2016, 2004.

CAPITULO 2

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

RESUMO

Cotesia flavipes (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) é o principal agente de controle utilizado na regulação populacional da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae). Entretanto, a qualidade dos parasitoides multiplicados em grande escala vem sendo comprometida devido a contaminações pelo patógeno *Nosema* sp. (Microspora: Nosematidae), a qual afeta parâmetros biológicos e a capacidade de busca desse parasitoide. Aliado a isso, estudos apontam redução na capacidade de voo de *C. flavipes* ao longo dos anos. Assim, objetivou-se associar a diminuição na capacidade de voo deste parasitoide a infecções por *Nosema* sp. Para tanto, neste estudo foram avaliados a capacidade de voo e morfometria de *C. flavipes*, bem como, foram caracterizadas e analisadas as deformações decorrentes da infecção do patógeno no parasitoide provenientes de lagartas de *D. saccharalis* não infectadas e infectadas com 1×10^1 ; 1×10^2 ; 1×10^3 esporos de *Nosema* sp./lagarta. Houve redução significativa na capacidade de voo e em medidas morfológicas de *C. flavipes*, principalmente quando estas foram mantidas em lagartas infectadas com dose ≥ 100 esporos de *Nosema* sp. Também foram constatados deformações em asas e aumento do abdome dos parasitoides infectados pelo microsporídio. Assim, destaca-se a importância das medidas que visam avaliar a qualidade dos parasitoides multiplicados, considerando a importância de *C. flavipes* em programas de controle biológico.

Palavras-chave: controle biológico; broca-da-cana; vespa parasítica; microsporídio; controle de qualidade.

ABSTRACT

Cotesia flavipes (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) is the main control agent used in the population regulation of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae). However, the quality of parasitoids multiplied on a large scale has been compromised due to contamination by the pathogen *Nosema* sp. (Microspora: Nosematidae), which affects biological parameters and the search ability of this parasitoid. In addition, studies indicate a reduction in the flight capacity of *C. flavipes* over the years. Thus, the objective was to associate the decrease in flight capacity of this parasitoid to *Nosema* sp. infections. For this reason, this study evaluated the flight capacity and morphometry of *C. flavipes*, as well as the deformations resulting from infection of the pathogen in the parasitoid from caterpillars of *D. saccharalis* not infected and infected with 1×10^1 ; 1×10^2 ; 1×10^3 spores *Nosema* sp./caterpillar. There was a significant reduction in flight capacity and morphological measurements of *C. flavipes*, especially when they were kept in caterpillars infected with a dose ≥ 100 spores of *Nosema* sp. Deformations in the wings and increased abdomen of parasitoids infected by microsporide were also observed. Thus, the importance of measures aimed at evaluating the quality of multiplied parasitoids is highlighted, considering the importance of *C. flavipes* in biological control programs.

Key words: biological control; sugarcane borer; parasitic wasp; microsporidium; quality control.

2.1 INTRODUÇÃO

Diatraea saccharalis (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) é uma importante praga da cana-de-açúcar em todo o continente americano. Infestações desta praga em canaviais acarretam em perdas econômicas, devido aos danos diretos e indiretos ocasionados respectivamente pela alimentação das lagartas e pela presença de fungos oportunistas, os quais diminuem o rendimento e a qualidade do açúcar e do etanol (FERREIRA et al., 2018).

As larvas desse 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. O parasitoide larval, *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) é o agente de controle mais eficaz e 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 (PARRA; COELHO, 2019; FONTES et al., 2020).

Apesar da eficiência e ampla utilização de *C. flavipes* como agente de controle de *D. saccharalis*, questionamentos sobre a qualidade dos parasitoides liberados em campo são frequentes. Isso se deve principalmente a estudos que comprovam uma diminuição significativa na capacidade de voo e dispersão deste parasitoide em campo nos últimos anos, bem como, pelas infecções do patógeno intracelular *Nosema* sp. (Microspora: Nosematidae) em produção massal de *D. saccharalis* e *C. flavipes* no Brasil (BOTELHO et al., 1980; SIMÕES et al., 2012; VOLPE et al., 2014; DINARDO-MIRANDA et al., 2014; PAES, 2018).

Infecções de *Nosema* sp. em populações de *C. flavipes* compromete a utilização deste parasitoide em programas de controle biológico integrado, visto que, ocasionam alterações em parâmetros biológicos e no comportamento de busca deste agente de controle (SIMÕES et al., 2012). Aliado a isto, a indícios que populações de *C. flavipes* infectadas por este patógeno apresentam capacidade de voo reduzida, com uma porcentagem maior de indivíduos caminheiros (PAES, 2018).

Diante do exposto, o presente estudo objetivou avaliar a capacidade de voo de *C. flavipes* provenientes de lagartas de *D. saccharalis* não contaminadas

e contaminadas com 1×10^1 , 1×10^2 e 1×10^3 esporos de *Nosema* sp./ lagarta, analisar medidas morfológicas de *C. flavipes* provenientes das mesmas condições descritas anteriormente e caracterizar as deformações morfológicas do parasitoide contaminado por *Nosema* sp. a fim de associar a redução da capacidade de voo e dispersão de *C. flavipes* a infecções por *Nosema* sp.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos e as criações dos insetos foram conduzidos sob condições controladas a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, umidade relativa (UR) de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h, nos laboratórios do Grupo de Pesquisa em Manejo Integrado de Pragas na Agricultura (AGRIMIP), do Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo.

2.1 Obtenção e multiplicação dos insetos

Foram multiplicadas em laboratório duas populações de *D. saccharalis*, que se diferenciaram pela presença e ausência de infecção por *Nosema* sp., e uma população de *C. flavipes* não infectada, obtidas em biofábrica do Estado de São Paulo, Brasil.

Para a multiplicação das populações de *D. saccharalis* foi utilizada a dieta artificial proposta por Hensley e Hammond (1968) adaptada (ágar substituído pela carragenina) e as metodologias de criação para este inseto hospedeiro e para o parasitoide larval *C. flavipes* seguiram recomendações descritas por Garcia et al. (2009). Os parasitoides foram multiplicados em lagartas de *D. saccharalis* não infectadas por *Nosema* sp.

2.2 Identificação da infecção de *Nosema* sp. em *Diatraea saccharalis* e *Cotesia flavipes*

Antes da realização dos experimentos foi realizado análises moleculares por meio da extração do DNA genômico e padronização da reação de

polimerase em cadeia (PCR) para a confirmação da infecção de *Nosema* sp. em populações de *C. flavipes* e *D. saccharalis* mantidas em laboratório.

Para a avaliação da presença e identidade dos esporos, foram selecionadas aleatoriamente 50 indivíduos de *C. flavipes* e uma lagarta de *D. saccharalis* para extração do DNA genômico e padronização da reação de polimerase em cadeia (PCR).

A lagarta de *D. saccharalis* foi submetida a um processo de lavagem com solução salina (0,85% NaCl) seguida de álcool 70%, sendo posteriormente macerada em Becker de vidro estéril (10 mL), sendo removido partes do corpo do inseto. O conteúdo corporal resultante foi dissolvido em solução de 80 µl de resina Chelex100 (Bio-Rad Laboratories) a 10%, diluído em água estéril e 8µl de proteinase K (20 microgramas/mL) em microtubos de 200µl.

Para a extração do DNA dos parasitoides foi realizado um procedimento semelhante, diferindo apenas no processo de maceração, onde os exemplares dos parasitoides (50 indivíduos) foram macerados diretamente no microtubo de 200µl utilizando os mesmos reagentes descritos acima.

Posteriormente, os tubos foram agitados por cinco segundos em Vortex Biomixer MOD QL901 e Mini centrífuga de bancada Ministar a 6200 rpm e depois transferidos para termociclador Infinigen (modelo TC-96CG) a 95°C durante 20 minutos.

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

A reação de cadeia de polimerase (PCR) para detecção de *Nosema* sp. foi realizada com um mix contendo 12,5µl de Taq DNA Polimerase (NeoBio); 5µl água miliQ; 1,25µl de cada primer e 5,0µl de DNA da amostra, totalizando um volume de 25µl. As reações de PCR foram realizadas em termociclador INFINIGEN (modelo TC-96CG), executadas seguindo as seguintes condições: temperatura de desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos, seguida por 45 ciclos com desnaturação a 95 °C por 1 minuto, seguida pela fase de anelamento a 48 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto e com uma fase final de polimento por 4 minutos a 72 °C.

Para leitura dos produtos resultantes da PCR foi empregado marcador molecular 100pb (Norgen) e gel de agarose 1%, contendo 80 ml de solução tampão TBE; 0,8g de agarose (Neo3Bio) e 0,4µl de intercalante de DNA GelRed (NeoBio), sendo visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Major Science).

Com base nos resultados obtidos nas análises moleculares e pela confirmação da infecção por *Nosema* sp. em lagartas de *D. saccharalis*, estas foram utilizadas para a preparação do inóculo e posterior contaminação de lagartas não contaminadas, as quais também foram analisadas quanto à infecção pelo microsporídio.

2.3 Infecções de *Diatraea saccharalis* e *Cotesia flavipes* com esporos de *Nosema* sp.

2.3.1 Preparação do inóculo de *Nosema* sp.

Para a obtenção dos esporos de *Nosema* sp. foram utilizadas lagartas de *D. saccharalis* sintomáticas, as quais foram maceradas em solução salina (NaCl 0,85%). A suspensão resultante foi submetida a um processo de filtragem sucessiva através de algodão hidrófilo (2 mm) com o auxílio de uma seringa, sendo posteriormente submetida a três séries de centrifugação: 2 000 rpm a 10 minutos, seguida de 2 séries a 12 000 rpm a 1 minuto. Após cada centrifugação o sobrenadante era descartado e ao final os esporos acumulados no final do tubo formando um “pellet” foram suspensos em solução salina estéril (NaCl 0,85%) (LACEY, 2012). Os esporos obtidos foram quantificados em câmara de Neubauer e armazenados a 4°C até a instalação dos experimentos.

2.3.2 Infecção das lagartas de *Diatraea saccharalis*

Foram utilizadas lagartas de *D. saccharalis* de 4º ínstar não infectadas pelo microsporídio, provenientes da criação estoque do laboratório do AGRIMIP.

As lagartas foram acondicionadas individualmente em placas de plástico (3 cm de diâmetro e 7 cm de altura), juntamente com um disco de dieta artificial (0,2 cm³) preparada sem metilparabeno (Nipagin®) e sem formaldeído,

contaminadas em sua superfície com 5 µL de suspensões de 1×10^1 ; 1×10^2 ; 1×10^3 esporos de *Nosema* sp./lagarta, sendo que para cada suspensão de esporos foram utilizadas 100 lagartas de *D. saccharalis*. Tais doses foram determinadas com base em estudos realizados anteriormente, onde foram avaliados parâmetros biológicos e comportamentais do parasitoide sob diferentes níveis de infecção (SIMÕES et al., 2012).

No tratamento controle foram utilizadas lagartas não infectadas, as quais receberam dieta artificial sem adição de esporos. As lagartas foram mantidas em condições controladas por 48 horas, período em que as lagartas *D. saccharalis* realizaram o consumo do disco de dieta artificial contaminada. Posteriormente, foram escolhidas aleatoriamente 10 lagartas de cada tratamento (controle e contaminadas com as dosagens de esporos) para a avaliação da infecção por *Nosema* sp. em microscópio (1000x).

2.3.3 Parasitismo de *Cotesia flavipes* em lagartas de *Diatraea saccharalis* infectadas por *Nosema* sp.

Para o parasitismo, foram selecionadas lagartas de *D. saccharalis* não infectadas (controle) e infectadas com 1×10^1 ; 1×10^2 ; 1×10^3 esporos de *Nosema* sp./lagarta, as quais foram ofertadas manualmente e individualmente para a fêmea adulta de *C. flavipes*. Após o processo de parasitismo, as lagartas de *D. saccharalis* recém-parasitadas foram transferidas para cápsulas de material plástico (3 cm de diâmetro e 7 cm de altura) contendo em seu interior dieta artificial de realimentação (HENSLEY; HAMMOND, 1968), sendo colocadas 5 lagartas/cápsula, mantidas em condições controladas. Após a formação das massas de pupa dos parasitoides, as mesmas foram retiradas das cápsulas e individualizadas em tubos de ensaio (2,5 cm de diâmetro x 8 cm de altura) para a realização dos ensaios.

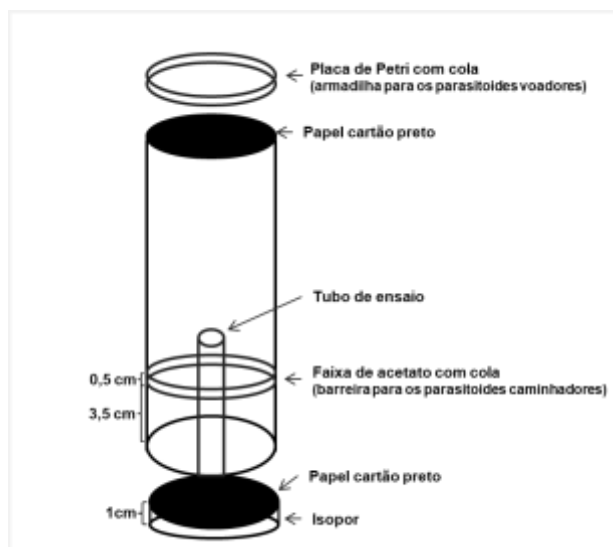
Para a confirmação da infecção de *C. flavipes* por *Nosema* sp. foram escolhidos aleatoriamente 10 indivíduos adultos do parasitoide de cada tratamento, sendo posteriormente avaliados em microscópio (1000x).

2.3. Efeito de *Nosema* sp. na capacidade de voo de *Cotesia flavipes*

Para a avaliação da capacidade de voo de *C. flavipes* não infectada e infectada através da lagarta de *D. saccharalis* contaminada com 1×10^1 ; 1×10^2 e 1×10^3 esporos de *Nosema* sp./lagarta foi utilizada a metodologia proposta por Prezotti et al. (2002).

Para tanto, foram utilizadas unidades-teste, as quais consistem em um cilindro de PVC (18 cm de altura e 11 cm de diâmetro), com o seu interior recoberto com papel cartão preto e, com o fundo vedado com papel preto ajustado sobre um disco de isopor de 1 cm de espessura e de mesmo diâmetro do cilindro. Na parte interna da unidade-teste foi pincelado um anel de cola entomológica sobre uma faixa de acetato (1cm de espessura) a 3,5 cm da extremidade inferior do cilindro, utilizado como barreira para os parasitoides caminhadores. A parte superior da unidade-teste foi vedada com uma placa de Petri transparente (2,5 cm de diâmetro e 1 cm de altura) coberta internamente com cola entomológica, servindo como armadilha para os parasitoides em voo (Figura 1).

Figura 1 – Unidade para teste de voo de *Cotesia flavipes*. Fonte: Adaptado de Prezotti et al. (2002)



O tubo de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8 cm de altura) contendo uma massa de pupa com aproximadamente 100 indivíduos de *C. flavipes* prestes à

emergência foi fixado no centro da região inferior da unidade-teste, sobre o disco de isopor. No interior do tubo foi fornecido gotículas de mel puro para servirem de alimento para os parasitoides. Para cada tratamento (populações de *C. flavipes* não infectadas e infectadas em diferentes graus de infecção por *Nosema* sp.) foram utilizados 15 unidades-testes, as quais foram mantidas em câmara de fluxo laminar vertical sob luz fluorescente, onde permaneceram por três dias. Posteriormente avaliou-se o número de espécimes de *C. flavipes* presentes no anel de cola (caminhadores), na placa de Petri (voadores) e no fundo do cilindro ESALQ (não voadores).

2.4 Alterações em medidas morfológicas de *C. flavipes* em decorrência da infecção por *Nosema* sp.

Foram realizadas as medições morfológicas de quinze fêmeas e quinze machos adultos de *C. flavipes* provenientes de lagartas de *D. saccharalis* contaminadas com 0; 1×10^1 ; 1×10^2 e 1×10^3 esporos de *Nosema* sp./lagarta. Os parasitoides foram colocados em lâminas contendo álcool em gel, posicionados em vista lateral direita. As lâminas com os parasitoides foram fotografadas em microscópio óptico Leica EZ4 D acoplado a câmera. Posteriormente, as fotografias foram medidas usando o software Image J – Version 2.00.

Os caracteres morfológicos mensurados foram: 1 - comprimento total (tórax + abdômen); 2 - comprimento do tórax, 3 - largura do tórax; 4 - comprimento do abdômen; 5 - largura do abdômen; 6 - comprimento da tíbia posterior, medindo da junção da tíbia com o tarso; 7 - comprimento da asa anterior direita e 8 - largura da asa anterior direita.

2.5 Deformações em *Cotesia flavipes* em decorrência da infecção por *Nosema* sp.

Foram avaliadas as deformações em asas de *C. flavipes* não infectadas e infectadas através do desenvolvimento em lagartas de *D. saccharalis* contaminadas com 1×10^1 ; 1×10^2 e 1×10^3 esporos de *Nosema* sp./lagarta. Para tanto, foram selecionadas aleatoriamente 15 massas de pupas provenientes de cada tratamento, as quais foram individualizadas em tubos de vidro (2,5 cm de

diâmetro x 8 cm de altura) até a emergência dos adultos, sendo posteriormente realizada as avaliações de deformações em asas em microscópio óptico Leica EZ4 D, bem como, foram analisadas a presença anomalias resultantes da infecção por *Nosema* sp.

2.4 Análise estatística

Os dados resultantes dos ensaios foram analisados por análises exploratórias para avaliar as premissas de normalidade e homogeneidade de variâncias pelos testes de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$) e Bartlett ($p < 0,05$), respectivamente. Os dados que atenderam as premissas foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo aplicado o teste t ($p < 0,05$) quando havia dois tratamentos e o teste de Tuckey ($p < 0,05$) para comparações que apresentavam mais de dois tratamentos. Os dados que não apresentaram normalidade e homogeneidade de variância foram submetidos à análise não paramétrica, onde as médias foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas no software Infostat.

2.3 RESULTADOS

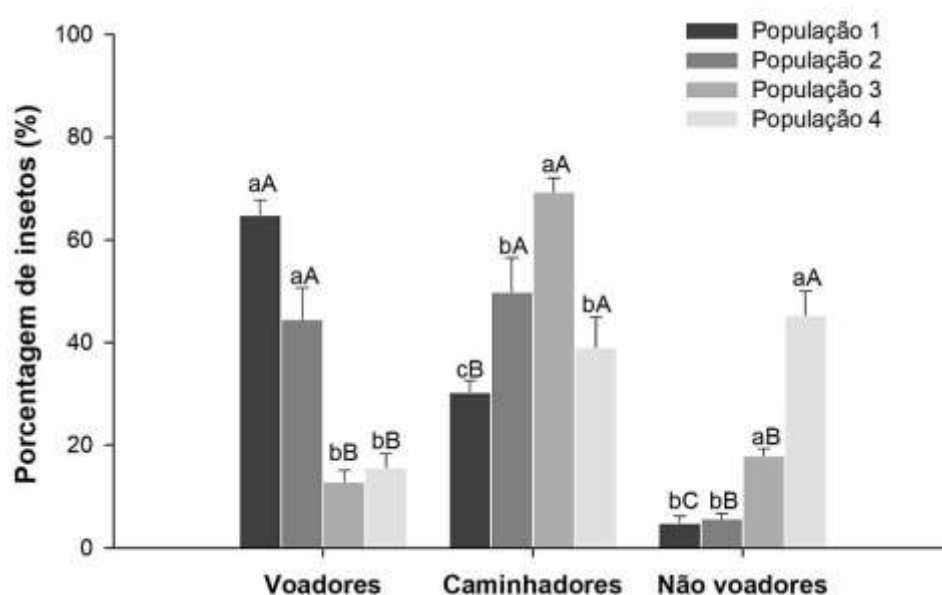
2.3.1 Efeito de *Nosema* sp. na capacidade de voo de *Cotesia flavipes*

O teste de voo demonstrou que a infecção de *Nosema* sp. em *C. flavipes* resulta em alterações na capacidade de voo deste parasitoide (Figura 2). Quando comparadas entre si, as populações de *C. flavipes* diferiram estatisticamente quanto à porcentagem de insetos dentro de cada categoria, insetos voadores ($p < 0,0001$), caminheiros ($p < 0,0001$) e não voadores ($p < 0,0001$).

As populações do parasitoide que se desenvolveram em lagartas de *D. saccharalis* inoculadas com ≥ 100 esporos de *Nosema* sp. apresentaram menor porcentagem de insetos voadores e maior percentual de indivíduos não voadores (Figura 2). Resultado contrastante foi observado em populações *C. flavipes* não infectadas e infectadas com 10 esporos do microsporídio, as quais apresentaram índices maiores de indivíduos voadores e menor porcentagem de

insetos não voadores, indicando a influência dos níveis de infecção de *Nosema* sp. na atividade de voo deste parasitoide (Figura 2).

Figura 2 - Adultos voadores (%), caminheiros (%) e não voadores (%) de *Cotesia flavipes* provenientes de lagartas de *Diatraea saccharalis* não infectadas (população 1) e infectadas com 1×10^1 (população 2), 1×10^2 (população 3) e 1×10^3 (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 $p < 0,05$)



A população de *C. flavipes* não infectada apresentou 30,73% de indivíduos caminheiros, sendo o menor percentual observado dentre as quatro populações nesta categoria. Em contrapartida, a população 3, a qual se desenvolveu em lagartas de *D. saccharalis* inoculadas com 100 esporos de *Nosema* sp. foi a que apresentou maior porcentagem de indivíduos caminheiros, seguida das populações 2 e 4 (Figura 2).

As alterações em decorrência da infecção por *Nosema* sp. também foram observadas quando as populações de *C. flavipes* foram comparados estatisticamente entre si, entre as categorias (insetos voadores, caminheiros e não voadores), onde indivíduos das populações 3 e 4 apresentaram percentual maior de indivíduos caminheiros e/ou não voadores (População: 3 $p < 0,0001$; População 4: $p = 0,0003$) (Figura 2). Dentro da população não infectada foi

observada uma porcentagem maior de indivíduos voadores ($p < 0,0001$). Resultado semelhante foi obtido na população 2, a qual apresentou percentual maior de parasitoides voadores e caminhadores ($p = 0,0004$) (Figura 2).

2.3.2 Alterações em medidas morfológicas de *C. flavipes* em decorrência da infecção por *Nosema* sp.

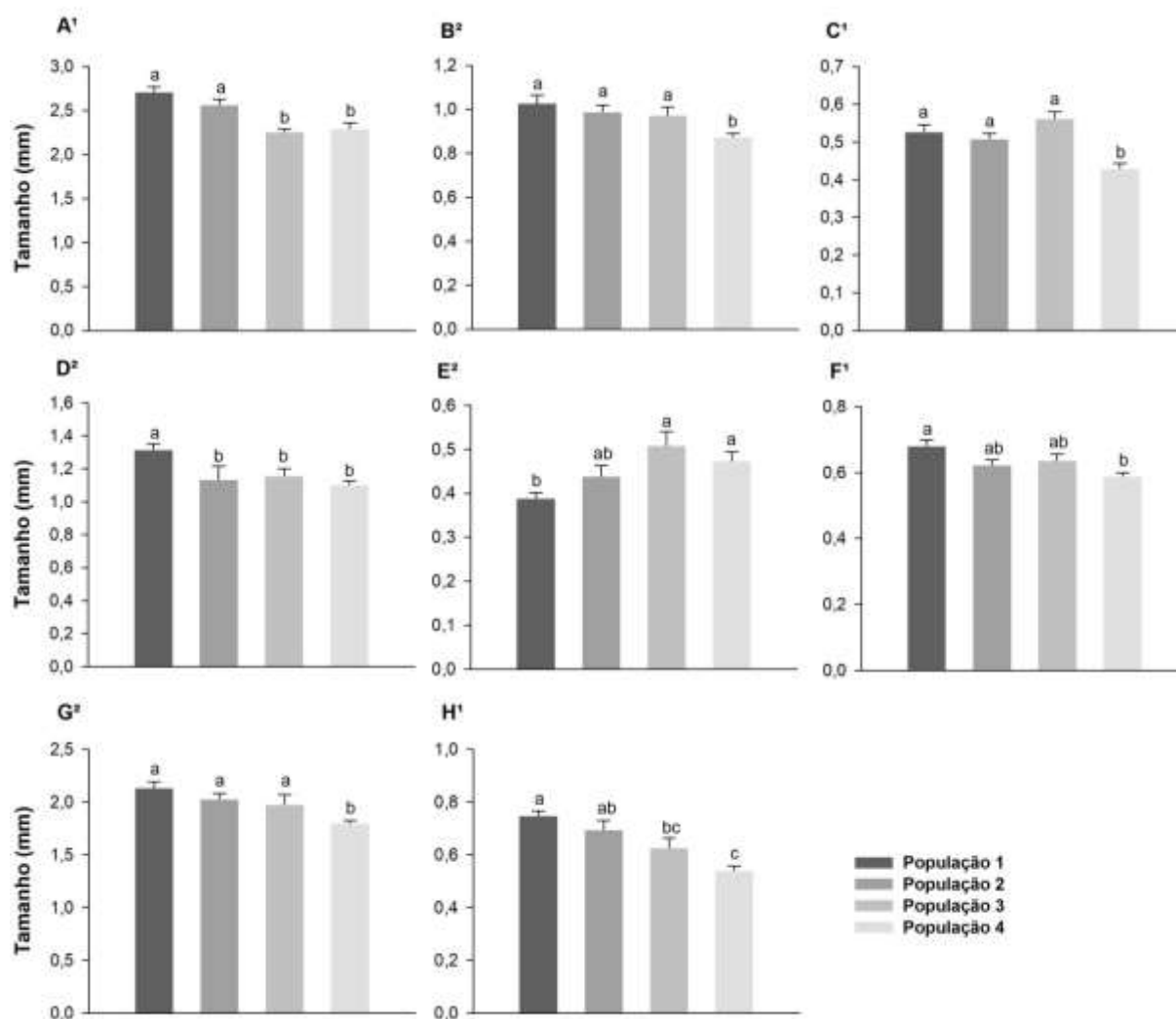
Assim como observado na capacidade de voo, fêmeas e machos de *C. flavipes* são afetados negativamente pela infecção por *Nosema* sp. (Figuras 3 e 4).

As fêmeas do parasitoide que se desenvolveram em lagartas de *D. saccharalis* infectadas com dose ≥ 100 esporos de *Nosema* sp. diminuíram consideravelmente o seu comprimento (mm) total do corpo ($p < 0,0001$) (Figura 3; A). Efeitos negativos também foram observados na população 4 quanto ao seu comprimento (mm) ($p = 0,0023$) e largura (mm) de tórax ($p < 0,0001$) e no comprimento (mm) da asa anterior direita ($p = 0,0001$), os quais foram estatisticamente diferentes das demais populações de *C. flavipes* (Figura 3; B, C e G).

O comprimento (mm) do abdome das fêmeas não infectadas foi maior que as que estavam infectadas com o microsporídio ($p = 0,0004$) (Figura 3; D). Ao contrário do que foi obtido na largura (mm) desta estrutura morfológica, onde foi observada uma diminuição de tamanho da população não infectada em comparação as populações 3 e 4 ($p = 0,0019$), enquanto que, a população 2 não foi estatisticamente diferente das demais populações (Figura 3; E).

O comprimento (mm) da tíbia da população de *C. flavipes* infectada com a maior dose de esporos de *Nosema* sp. foi reduzida em comparação à população não infectada pelo microsporídio ($p = 0,0015$) (Figura 3; F). Assim como observado na largura (mm) da asa anterior direita ($p < 0,0001$) (Figura 3; H).

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 1×10^1 (população 2), 1×10^2 (população 3) e 1×10^3 (população 4) esporos de *Nosema* sp./lagarta. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes entre si (¹Teste de Tuckey ou ²Teste de Kruskal-Wallis $p < 0,05$)



Quando comparados entre si, os machos de *C. flavipes* não infectados e os provenientes de lagartas de *D. saccharalis* infectadas com cerca de 1.000

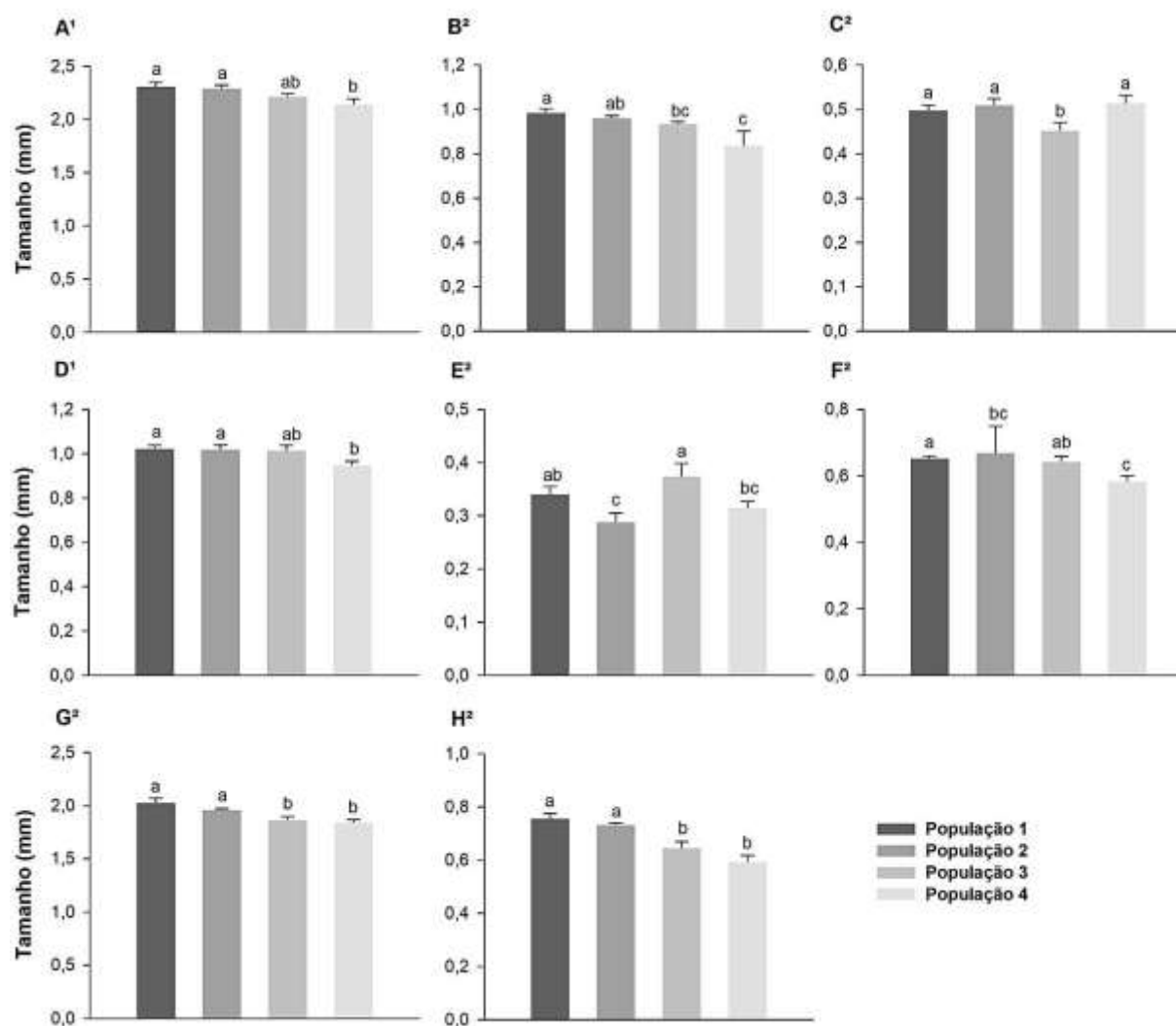
esporos de *Nosema* sp. foram estatisticamente diferentes entre si no comprimento (mm) do corpo ($p = 0,0019$), tórax ($p = 0,0049$), abdome ($p = 0,0130$), tíbia ($p = 0,0029$) e asa anterior direita ($p = 0,0002$), assim como, na largura (mm) do abdome ($p = 0,0005$) e da asa anterior direita ($p < 0,0001$), sendo que, foi observada uma redução em todos estes caracteres morfológicos na população infectada pelo microsporídio (Figura 4; A, B, D, E, F, G e H).

A população 3 apresentou redução no comprimento (mm) do tórax e asa anterior direita e na largura (mm) do tórax ($p = 0,0267$) e da asa anterior direita em comparação à população não infectada (Figura 4; B, C, G e H), entretanto, ao compara-la com as demais populações de *C. flavipes* infectadas pelo microsporídio nota-se que tais indivíduos em sua maioria não se distingue estatisticamente entre si (Figura 4).

Resultado contrastante ao observado na população 4 foi obtido nas medidas morfológicas dos machos da população infectada com cerca de 10 esporos de *Nosema* sp., o qual foi semelhante à população não infectada na maioria dos caracteres morfológicos. Diferenças estatísticas entre essas duas populações somente foram constatadas no comprimento (mm) da tíbia e na largura (mm) do abdome (Figura 4; E e F).

Um fato interessante é que, diferente ao que foi observado na largura (mm) do abdome das fêmeas, os indivíduos machos de *C. flavipes* não infectados não apresentaram redução de tamanho nesta estrutura morfológica em comparação às populações mais infectadas, somente foi superior estatisticamente à população 2, a qual foi semelhante à média apresentada pela população 4 (Figuras 3 e 4; E).

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 1×10^1 (população 2), 1×10^2 (população 3) e 1×10^3 (população 4) esporos de *Nosema* sp./lagarta. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes entre si (¹Teste de Tuckey ou ²Teste de Kruskal-Wallis $p < 0,05$)



2.3.3 Deformações em *Cotesia flavipes* em decorrência da infecção por *Nosema* sp.

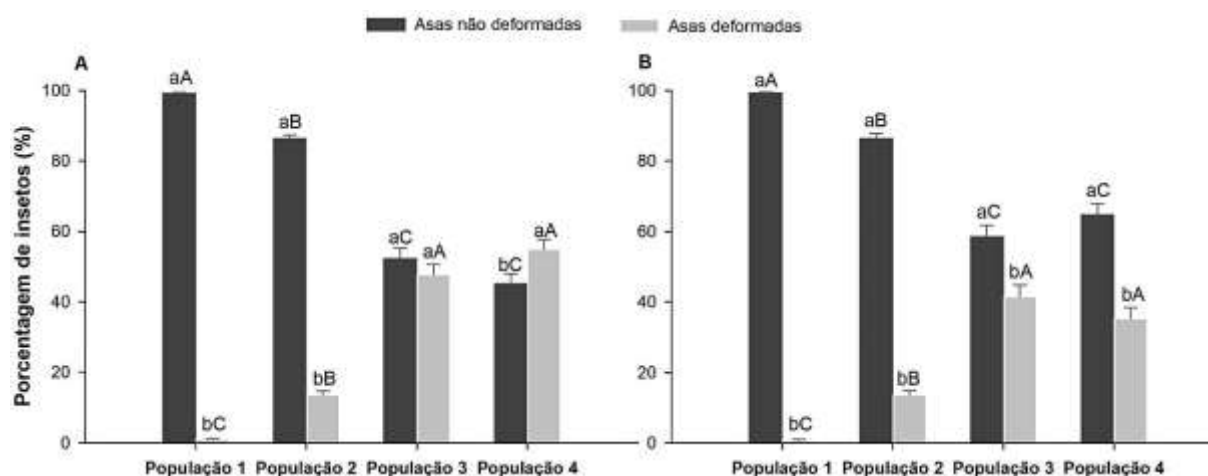
Deformações em populações de *C. flavipes* infectadas por *Nosema* sp. foram observadas nas asas deste parasitoide. Além disso, assim como observado na morfometria, alguns indivíduos infectados pelo microsporídio apresentavam o abdome mais volumoso em relação aos indivíduos não infectados (Figura 5).

Figura 5 - Deformações em *Cotesia flavipes* em decorrência da infecção por *Nosema* sp.



As deformações em asas de *C. flavipes* foram analisadas e comparadas entre as populações não infectadas e infectadas por *Nosema* sp., bem como, dentre cada população. Ao comparar as populações de *C. flavipes* entre si, observou-se que a porcentagem de fêmeas com as asas não deformadas foi superior às que apresentavam asas deformadas nas populações 1 e 2. Na população 3, o número de fêmeas com e sem deformações nas asas foram semelhantes e, na população 4 foi constatado um percentual maior de indivíduos com as asas deformadas (Figura 6 A).

Figura 6 - Porcentagem de fêmeas (A) e machos (B) de *Cotesia flavipes* com deformações em asas em decorrência da infecção da infecção por *Nosema* sp. em lagartas de *Diatraea saccharalis* não infectadas (população 1) e infectadas com 1×10^1 (população 2), 1×10^2 (população 3) e 1×10^3 (população 4) esporos de *Nosema* 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



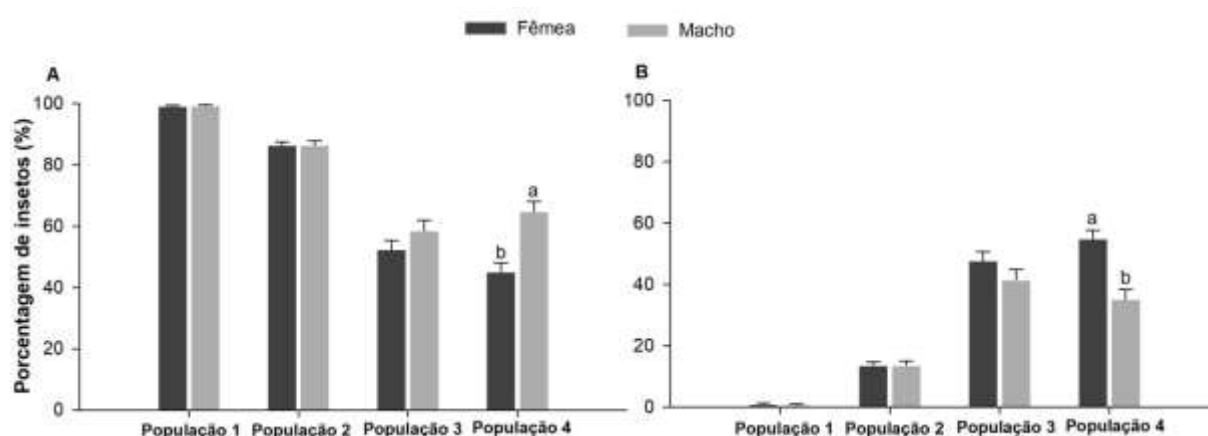
Comparações entre fêmeas dentro de cada parâmetro (condições das asas) demonstrou que, parasitoides não infectados por *Nosema* sp. apresentam percentual maior de asas não deformadas ($p < 0,0001$) e menor índice de deformações em asas ($p < 0,0001$), sendo estatisticamente diferente das populações infectadas pelo microsporídio (Figura 6 A). De modo geral, observou-se um aumento em deformações nas asas de fêmeas de *C. flavipes* à medida que aumentava o nível de infecção por *Nosema* sp., enquanto que, as fêmeas do parasitoide que se desenvolveram em lagartas de *D. saccharalis* infectadas com dose ≥ 100 esporos de *Nosema* sp. foram as mais afetadas (Figura 6 A).

Para os indivíduos machos de *C. flavipes*, foi observado um resultado diferente ao das fêmeas quando esses espécimes eram comparados entre si dentro de cada população, pois o percentual de machos com asas não

deformadas foi superior aos que apresentavam deformações nas asas em todas as populações, independente da infecção por *Nosema* sp. (Figura 6 B). Entretanto, ao comparar as populações dentro de cada parâmetro notou-se também um aumento em deformações nas asas à medida que aumentava o nível de infecção por *Nosema* sp., bem como, um percentual maior de parasitoides não deformados em populações não infectadas (Figura 6 B).

Comparações entre fêmeas e machos de *C. flavipes* quanto ao número de indivíduos com e sem deformações nas asas indicou diferenças significativas somente na população com nível de infecção mais alto por *Nosema* sp., onde machos apresentavam maior percentual de indivíduos com asas não deformadas e por consequente as fêmeas do parasitoide apresentou maior índice de deformações em asas (Figura 7; A e B)

Figura 7 - Porcentagem de fêmeas e machos de *Cotesia flavipes* com asas não deformadas (A) e deformadas (B) em decorrência da infecção da infecção por *Nosema* sp. em lagartas de *Diatraea saccharalis* não infectadas (população 1) e infectadas com 1×10^1 (população 2), 1×10^2 (população 3) e 1×10^3 (população 4) esporos de *Nosema* sp./lagarta. Colunas com letras diferentes são significativamente diferentes entre si pelos testes teste- t ($p < 0,05$)



2.4 DISCUSSÃO

As infecções pelo patógeno intracelular *Nosema* sp. em criações de *D. saccharalis* tem impacto negativo no desempenho de *C. flavipes*, visto que parâmetros biológicos e o comportamento de busca deste parasitoide são afetados pela presença do microsporídio (SIMÕES et al., 2012). No entanto, com base nas descobertas deste estudo, é possível inferir que parâmetros morfológicos e a atividade de voo de *C. flavipes* também são afetados pela infecção por *Nosema* sp.

Os resultados apresentados neste estudo são apoiados por diversos registros que apresentam efeitos adversos da interação entre microsporídios e parasitoides, tais como foi escrito para os parasitoides larvais, *Cotesia vestalis* (Haliday), *Glyptapanteles liparidis* (Bouche), *Meteorus gyrator* e *Macrocentrus grandii* Goidanich (Hymenoptera: Braconidae), em que tais registros apontam

alterações em parâmetros biológicos, morfológicos e comportamentais do parasitoide hospedeiro (ANDREADIS, 1982; HOCH et al., 2000; DOWN et al., 2005; KERMANI et al., 2014).

Tais efeitos negativos decorrentes da infecção por *Nosema* sp. em parasitoides são justificados principalmente pela diminuição induzida por este microsporídio nos carboidratos e ácidos graxos da hemolinfa nas larvas do hospedeiro, o que afeta negativamente o crescimento e o desenvolvimento do parasitoide, tal qual foi relatado para *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) e o parasitoide *G. liparidis* (HOCH et al., 2002). Tal ocorrência pode explicar as alterações morfológicas observadas em *C. flavipes*, uma vez, que este parasitoide se desenvolveu em um hospedeiro infectado por *Nosema* sp., o qual não fornece a mesma quantidade de nutrientes fornecidos por hospedeiros saudáveis. Além disso, os parasitoides podem obter esporos enquanto estão consumindo os tecidos infectados do hospedeiro e, com isso, transmitir os esporos da mãe para a progênie por sucessivas gerações, comprometendo com isso o desempenho da população (SIMÕES et al., 2012).

Assim como foi apresentado em estudos sobre a influência de *Nosema* sp. em parâmetros biológicos de *C. flavipes*, os resultados demonstraram efeitos deletérios em parâmetros morfológicos deste parasitoide principalmente quando as populações foram provenientes de lagartas infectadas com dose ≥ 100 esporos de *Nosema* sp. Tal ocorrência pode ser justificada pelo fato que, quando provenientes de *D. saccharalis* inoculadas com dosagens de 10^2 e 10^3 esporos de *Nosema* sp./lagarta, cerca de 79% e 100%, respectivamente, dos parasitoides da geração F_1 são infectados, enquanto que, em infecções de 10^1 ocorre somente 7,1% de infecção em *C. flavipes* (SIMÕES et al., 2012).

As reduções em medidas morfológicas e aumento de parasitoides com deformações apresentados neste estudo são suficientes para justificar as alterações observadas na capacidade de voo de *C. flavipes*, visto que, tais parâmetros estão intimamente relacionados com o desempenho de parasitoides em campo (PREZOTTI et al., 2002; VAN LENTEREN, 2012). Reduções na capacidade de voo e dispersão de *C. flavipes* vêm sendo reportada com frequência na literatura, entretanto, este é o primeiro registro que comprova que infecções pelo patógeno *Nosema* sp. alteram negativamente a capacidade de voo deste parasitoide.

A partir dos resultados obtidos neste estudo e com base em dados presentes na literatura é inquestionável os efeitos deletérios em parâmetros biológicos, morfológicos e comportamentais que infecções por *Nosema* sp. causam nos hospedeiros. Considerando também que, infecções por este microsporídio são relatadas em produção de *C. flavipes* em biofábricas no Brasil, se torna evidente a necessidade de aprimoramento na produção massal deste agente de controle biológico, buscando maneiras de mitigar a presença e os efeitos deletérios deste patógeno na qualidade do parasitoide.

REFERÊNCIAS

- BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N.; MENDES, A.C.; SILVEIRA NETO, S. 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.
- 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.
- 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.
- DOWN, R. E. et al. Interactions between the solitary endoparasitoid, *Meteorus gyrator* (Hymenoptera: Braconidae) and its host, *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae), infected with the entomopathogenic microsporidium, *Vairimorpha necatrix* (Microspora: Microsporidia). **Bulletin of entomological research**, v. 95, n. 2, p. 133-144, 2005.
- 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.
- FREITAS, F. C. et al. Characterization and comparison of genetic variation in *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) mass reared for biological pest control using microsatellite markers. **Neotropical entomology**, v. 47, n. 4, p. 433-439, 2018.
- GARCIA, J. F. et al. Criação do parasitoide *Cotesia flavipes* em laboratório. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: Editora UFLA, 199-220, 2009.
- HENSLEY, S.D.; HAMMOND, A.H. Laboratory techniques for rearing the sugar cane borer on an artificial diet. *J. Econ. Entomol.* 61: 1742-1743, 1968.
- HIVIZI C.L et al. Controle de qualidade do parasitoide *Cotesia flavipes*. In: Bueno VHP (Ed.) **Controle Biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. UFLA: Lavras, p. 371–379, 2009.

HOCH, G. et al. Interactions between an entomopathogenic microsporidium and the endoparasitoid *Glyptapanteles liparidis* within their host, the gypsy moth larva. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 75, n. 1, p. 59-68, 2000.

LACEY, L. A. **Manual of techniques in invertebrate pathology**. Academic Press, 2012.

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.

PREZOTTI, L. et al. Teste de vôo 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. 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.

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**, v. 11, n. 8, p. e0160898, 2016.

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.

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.

VOSSBRINCK C. R. et al. Debrunner-Vossbrinck BA and Shaddock JA. Ribosomal DNA sequences of *Encephalitozoon Hellem* and *Encephalitozoon Cuniculi*: Species identification and phylogenetic construction. **J Eukaryot Microbiol** 40:354-362, 1993.

CAPÍTULO 3

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

RESUMO

Infecções de *Nosema* sp. (Microspora: Nosematidae) em *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) ocasionam efeitos deletérios à qualidade e sobrevivência deste lepidóptero e do parasitoide larval *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). A utilização de óleos essenciais e antibióticos são promissores na redução da infecção por este microsporídio, entretanto, estudos sobre os efeitos desses compostos em infecções de *Nosema* sp. em *D. saccharalis* são incipientes. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos *in vivo* dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Schinus terebinthifolius*, *Baccharis dracunculifolia*, *Origanum vulgare* e *Syzygium aromaticum* e dos antibióticos albendazol, metronidazol e tinidazol 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*. 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 de *Nosema* sp. em *D. saccharalis*, os quais apresentaram pouco ou nenhum efeito deletério em parâmetros biológicos deste lepidóptero e do parasitoide. Os resultados apresentados neste estudo servirão de base para o aprimoramento de medidas de controle do microsporídio em produções massais de *D. saccharalis* e *C. flavipes*.

Palavras-chave: controle biológico; microsporídia; broca-da-cana; parasitoide larval; óleo essencial; antibióticos; controle de qualidade.

ABSTRACT

Nosema sp. (Microspora: Nosematidae) infections in *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) cause deleterious effects on the quality and survival of this lepidopteran and the larval parasitoid *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). The use of essential oils and antibiotics are promising in reducing infection by this microsporidia, however, studies on the effects of these compounds on *Nosema* sp. infections in *D. saccharalis* are incipient. Thus, the aim of this study was to evaluate the in vivo effects of *Cymbopogon citratus* essential oils, *Schinus terebinthifolius*, *Baccharis dracunculifolia*, *Origanum vulgare* and *Syzygium aromaticum* and the antibiotics albendazole, metronidazole and tinidazole in the development of *Nosema* sp. infection in *D. saccharalis*, as well as to evaluate the effects of such products on biological parameters of this lepidopteran and *C. flavipes*. Antibiotics 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 *Nosema* sp. infection in *D. saccharalis*, which presented little or no deleterious effect on biological parameters of this lepidopteran and parasitoid. The results presented in this study will serve as a basis for the improvement of microsporide control measures in mass productions of *D. saccharalis* and *C. flavipes*.

Key words: biological control; microsporidia; sugarcane borer; larval parasitoid; essential oils; antibiotics; quality control.

3.1 INTRODUÇÃO

A broca-da-cana *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) é uma praga polífaga, distribuída em todo o continente americano, aonde vem ocasionando danos econômicos em regiões produtoras de cana-de-açúcar, principal planta hospedeira deste lepidóptero (VARGAS et al., 2015). Os danos diretos e indiretos ocasionados pela alimentação das lagartas de *D. saccharalis* nesta planta hospedeira acarretam em uma acentuada diminuição na produção de açúcar e etanol (FERREIRA et al., 2018).

O manejo bem sucedido desta praga em cultivos agrícolas é baseado principalmente no uso do controle biológico, por meio da utilização de parasitoides. Dentre estes, *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) 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 programas de controle biológico mais eficiente e reconhecido mundialmente (PARRA; COELHO, 2019; FONTES et al., 2020).

Considerando a importância da utilização de *C. flavipes* em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) para o controle de *D. saccharalis*, é inquestionável 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 desencadeiam efeitos deletérios na qualidade de *C. flavipes* é a infecção pelo patógeno *Nosema* sp. (Microspora: Nosematidae) em criações de *D. saccharalis*, o que compromete a produção deste parasitoide, visto que, este lepidóptero é o hospedeiro utilizado em produções massais deste agente de controle.

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, tais como reduções na viabilidade e longevidade (SIMÕES et al., 2015; PAES, 2018). Infecções microsporídias em *D. saccharalis* prejudica o desenvolvimento de *C. flavipes*, uma vez que, os parasitoides oriundos de lagartas infectadas apresentam alterações em parâmetros biológicos e no comportamento de busca do hospedeiro (SIMÕES et al., 2012).

Apesar dos efeitos deletérios ocasionados por infecções por *Nosema* sp. em *D. saccharalis* e *C. flavipes*, medidas que visem a eliminação ou redução da infecção por este patógeno são incipientes. As utilizações de óleos essenciais e antibióticos vêm apresentando resultados promissores na redução da infecção por este microsporídio em artrópodes, tal como é relatado em diversos estudos com abelhas (COSTA et al., 2010; BORGES et al., 2020; BUCZEK et al., 2020; GLAVINIC et al., 2021). Assim, o objetivo deste estudo foi 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*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos e as criações dos insetos foram conduzidos sob condições controladas a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, umidade relativa (UR) de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h, nos laboratórios do Grupo de Pesquisa em Manejo Integrado de Pragas na Agricultura (AGRIMIP), do Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo.

3.2.1 Obtenção e multiplicação dos insetos

Foram multiplicadas em laboratório duas populações de *D. saccharalis*, que se diferenciaram pela presença e ausência de infecção por *Nosema* sp., e

uma população de *C. flavipes* não infectada, obtidas em biofábrica do Estado de São Paulo, Brasil.

Para a multiplicação das populações de *D. saccharalis* foi utilizada a dieta artificial proposta por Hensley e Hammond (1968) adaptada (ágar substituído pela carragenina) e as metodologias de criação para este inseto hospedeiro e para o parasitoide larval *C. flavipes* seguiram recomendações descritas por Garcia et al. (2009). Os parasitoides foram multiplicados em lagartas de *D. saccharalis* não infectadas por *Nosema* sp.

3.2.2 Obtenção e extração dos óleos essenciais

As plantas experimentais *C. citratus*, *S. terebinthifolius* e *B. dracunculifolia* foram adquiridas no banco de germoplasma do Departamento de Horticultura da Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil (22°50'34,27" S; 48°25'58,05" O). As folhas de *O. vulgare* foram adquiridas em um mercado de produtos naturais em Botucatu, São Paulo, Brasil. Os pedúnculos de *S. aromaticum* foram adquiridos secos, em Ituberá, Bahia, Brasil (13°43'57,63" S; 39°8'56,24" O).

Antes da realização da extração, as folhas de *C. citratus*, *S. terebinthifolius* e *B. dracunculifolia* passaram por um processo de secagem em estufa com ventilação forçada à 40°C, por 48 horas. Para a obtenção do óleo essencial foi utilizado destilador da marca Marconi modelo MA-480 (aço inox AISI 304), onde 1000 g do material vegetal foram depositados no cesto do destilador, disposto na dorna de destilação. Na base da dorna foram adicionados 5L de água deionizada, a qual foi aquecida por meio de uma resistência elétrica (2000 W), iniciando com isso o processo de destilação por arraste a vapor. Após o início da fervura, o equipamento permaneceu ligado por 150 minutos para a realização da extração dos óleos essenciais. Ao final do tempo de destilação, o óleo foi coletado, pesado e transferido para um vidro âmbar com batoque e tampa de rosca, sendo armazenado em um freezer a -20°C para posterior utilização em experimentos.

3.2.3 Efeito dos óleos essenciais em dieta artificial sobre *Diatraea saccharalis*

Este bioensaio preliminar foi realizado para determinar as doses (%) dos óleos essenciais de *O. vulgare*, *S. aromaticum*, *C. citratus*, *S. terebinthifolius* e de *B. dracunculifolia* que apresentam baixa ou nenhuma toxicidade à *D. saccharalis*, as quais serão utilizadas posteriormente na avaliação antimicrobiana sobre *Nosema* sp.

Para tanto, foi avaliado a mortalidade (%) de lagartas de primeiro ínstar de *D.*

saccharalis submetidas à alimentação com dieta artificial (Tabela 1) contendo soluções de 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,075; 0,1; 0,150; 0,175 e 0,2 % de óleo essencial de *O. vulgare*, 0,01; 0,02; 0,03; 0,045; 0,05; 0,075; 0,1 e 0,2 % de óleo de *S. aromaticum*, 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,075; 0,1 e 0,2 % de óleo de *C. citratus*, 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,1 e 0,2 % dos óleos de *S. terebinthifolius* e *B. dracunculifolia*. As soluções que apresentavam doses abaixo de 0,05% foram dissolvidas em Tween®.

Cada dose (%) dos óleos essenciais foram adicionados e homogeneizados em 300 g de dieta artificial após atingir temperatura inferior à 40°C, a fim de evitar a degradação desses óleos. A dieta foi vertida em recipientes plásticos (10 cm de diâmetro x 15 de altura) e posteriormente cortadas em cubos (2,5 cm³) e transferidas para tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8 cm de altura) juntamente com as lagartas de primeiro ínstar.

O efeito dos óleos essenciais das plantas experimentais sobre *D. saccharalis* foram avaliados em bioensaios distintos, tendo como controles negativos dietas artificiais sem adição de produtos e com Tween®. Assim, cada tratamento [doses (%) dos óleos essenciais] foi composto por 50 lagartas, mantidas individualizadas nos tubos de vidro e o conjunto de 10 lagartas foi considerada uma repetição, com um total de cinco repetições por tratamento.

Os tubos foram cobertos com algodão hidrófobo e acondicionados em suportes de ferro. As avaliações de mortalidade foram realizadas a cada 24 horas durante cinco dias após o repique das lagartas em dieta artificial contendo os óleos essenciais, sendo consideradas mortas aquelas que não apresentavam movimentos após um toque com uma escova de cerdas finas.

3.2.4 Avaliação de óleos essenciais e produtos antimicrobianos no desenvolvimento da infecção de *Nosema* sp. em *Diatraea saccharalis*

3.2.4.1 Confirmação da infecção de *Nosema* sp. em *Diatraea saccharalis*

Os indivíduos de *D. saccharalis* com indícios de infecção por *Nosema* sp. foram mantidos em criações separadas dos indivíduos sadios, entretanto, para a confirmação da infecção por *Nosema* sp. foi realizado esfregaços para visualização de esporos e análises moleculares por meio da extração do DNA genômico e padronização da reação de polimerase em cadeia (PCR). Foi realizado também o esfregaço de lagartas de *D. saccharalis* aparentemente sadias para a confirmação da ausência de esporos de *Nosema* sp.

Para a preparação dos esfregaços, lagartas *D. saccharalis* previamente mortas por congelamento foram maceradas com o auxílio de uma pinça e o conteúdo extravasado foi colocado em lâmina microscópica juntamente com uma gota de solução salina (0,85% NaCl), sendo fixado posteriormente em metanol absoluto por 10 minutos e, em seguida secos ao ar. A coloração dos esporos foi realizada com solução de Giemsa diluída a 50% durante 30 minutos. As lâminas foram lavadas para retirar o excesso do corante e deixadas ao ar livre até completamente secas. As lâminas contendo os esfregaços foram visualizadas em microscópio (1000x).

Para análises moleculares, uma lagarta de *D. saccharalis* foi submetida a um processo de lavagem com solução salina (0,85% NaCl) seguida de álcool 70%, sendo posteriormente macerada em Becker de vidro estéril (10 mL), sendo removido partes do corpo do inseto. O conteúdo corporal resultante foi dissolvido em solução de 80 µl de resina Chelex100 (Bio-Rad Laboratories) a 10%, diluído em água estéril e 8µl de proteinase K (20 microgramas/mL) em microtubos de 200µl.

Posteriormente, os tubos foram agitados por cinco segundos em Vortex Biomixer MOD QL901 e Mini centrífuga de bancada Ministar a 6200 rpm e depois transferidos para termociclador Infinigen (modelo TC-96CG) a 95°C durante 20 minutos. A região small subunit (SSU) do RNA ribossômico foi amplificada utilizando-se iniciadores (primers) universais para *Nosema* sp., (F)

CACCAGGTTGATTCTGCC e (R) TTATGATCCTGCTAATGGTTC, tamanho esperado de 222pb (VOSSBRINCK et al.,1993).

A reação de cadeia de polimerase (PCR) para detecção de *Nosema* sp. foi realizada com um mix contendo 12,5µl de Taq DNA Polimerase (NeoBio); 5µl água miliQ; 1,25µl de cada primer e 5,0µl de DNA da amostra, totalizando um volume de 25µl. As reações de PCR foram realizadas em termociclador INFINIGEN (modelo TC-96CG), executadas seguindo as seguintes condições: temperatura de desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos, seguida por 45 ciclos com desnaturação a 95 °C por 1 minuto, seguida pela fase de anelamento a 48 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto e com uma fase final de polimento por 4 minutos a 72 °C.

Para leitura dos produtos resultantes da PCR foi empregado marcador molecular 100pb (Norgen) e gel de agarose 1%, contendo 80 ml de solução tampão TBE; 0,8g de agarose (Neo3Bio) e 0,4µl de intercalante de DNA GelRed (NeoBio), sendo visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Major Science).

Com base nos resultados obtidos nos esfregaços e análises moleculares, a população de *D. saccharalis* infectada por *Nosema* sp. foi utilizada para a preparação do inóculo e posterior contaminação de lagartas não contaminadas, as quais também foram analisadas previamente quanto à infecção pelo microsporídio.

3.2.4.2 Preparação do inóculo de *Nosema* sp.

Para a obtenção dos esporos de *Nosema* sp. foram utilizadas lagartas de *D. saccharalis* sintomáticas, as quais foram maceradas em solução salina (NaCl 0,85%). A suspensão resultante foi submetida a um processo de filtragem sucessiva através de algodão hidrófilo (2 mm) com o auxílio de uma seringa, sendo posteriormente submetida a três séries de centrifugação: 2 000 rpm a 10 minutos, seguida de 2 séries a 12 000 rpm a 1 minuto. Após cada centrifugação o sobrenadante era descartado e ao final os esporos acumulados no final do tubo formando um “pellet” foram suspensos em solução salina estéril (NaCl 0,85%) (LACEY, 2012). Os esporos obtidos foram quantificados em câmara de Neubauer (400x) e armazenados a 4°C até a instalação dos experimentos.

3.2.4.3 Infecção das lagartas de *Diatraea saccharalis*

Foram utilizadas lagartas de *D. saccharalis* de 2º ínstar não infectadas pelo microsporídio, provenientes da criação estoque do laboratório do AGRIMIP, as quais foram acondicionadas individualmente em tubos tipo *ependorf* (2mL) juntamente com um disco de dieta artificial (0,1 cm³) preparada sem metilparabeno (Nipagin[®]) e sem formaldeído, contaminadas em na superfície com 2 µL da suspensão de 1x10¹ esporos de *Nosema* sp./lagarta.

As lagartas foram mantidas em condições controladas por até 48 horas, período estimado para o total consumo do disco de dieta artificial contaminado, sendo descartas as lagartas que não consumiram completamente a dieta com o inóculo. Para a confirmação da infecção, foram selecionadas aleatoriamente 10 lagartas para a avaliação da infecção por *Nosema* sp. em microscópio (1000x).

As doses utilizadas neste estudo foram determinadas de acordo com avaliações anteriores sobre os efeitos da infecção por *Nosema* sp. sobre *D. saccharalis* (SIMÕES et al., 2015).

3.2.4.4 Tratamento das lagartas de *Diatraea saccharalis* com óleos essenciais e produtos antimicrobianos

As lagartas de *D. saccharalis* infectadas foram submetidas a tratamentos com os seguintes óleos essenciais e antibióticos: (1) óleo essencial de *O. vulgare* (0,01 %); (2) óleo essencial de *S. aromaticum* (0,01 %); (3) óleo essencial de *C. citratus* (0,02 %); (4) óleo essencial de *C. citratus* (0,03 %); (5) óleo essencial de *S. terebinthifolius* (0,02 %); (6) óleo essencial de *S. terebinthifolius* (0,05 %); (7) óleo essencial de *B. dracunculifolia* (0,02 %); (8) óleo essencial de *B. dracunculifolia* (0,05 %); (9) Albendy[®] (Albendazol) (0,5 mg/mL); (10) Albendy[®] (Albendazol) (1 mg/mL); (11) Albendy[®] (Albendazol) (2 mg/mL); (12) Flagimax[®] (Metronidazol) (0,5 mg/mL); (13) Flagimax[®] (Metronidazol) (1 mg/mL); (14) Flagimax[®] (Metronidazol) (2 mg/mL); (15) Pletil[®] (Tinidazol) (0,5 mg/mL); (16) Pletil[®] (Tinidazol) (1 mg/mL) e (17) Pletil[®] (Tinidazol) (2 mg/mL). No tratamento controle, as lagartas infectadas foram repicadas em dieta artificial sem adição de nenhum tratamento.

O preparo das dietas artificiais contendo os tratamentos antimicrobianos seguiram dois protocolos distintos. No primeiro, os óleos essenciais foram adicionados e homogeneizados em dieta artificial (HENSLEY; HAMMOND, 1968) após atingir temperatura inferior à 40°C. No segundo protocolo, o preparo da dieta artificial contendo os antibióticos (albendazol, metronidazol e tinidazol) foi realizado seguindo as metodologias propostas por Garcia et al. (2009), sendo que tais produtos foram adicionados juntamente com os ingredientes anticontaminantes já estabelecidos na dieta artificial de *D. saccharalis* (HENSLEY; HAMMOND, 1968). As dietas artificiais contendo os produtos foram vertidas em tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8 cm de altura) e após o seu resfriamento, foi realizado o repique das lagartas infectadas.

O experimento foi composto por 18 tratamentos com 20 repetições, sendo realizada a avaliação 10 dias após o repique das lagartas de *D. saccharalis* em dieta artificial com ou sem tratamento com anticontaminantes. Para quantificar a quantidade de esporos, 10 lagartas de cada tratamento foram maceradas e homogeneizadas em água destilada estéril, e o número de esporos de *Nosema* sp. foram quantificados em câmara de Neubauer (400x).

3.2.5 Aspectos biológicos de *Diatraea saccharalis* criadas em dieta artificial contendo óleos essenciais e produtos antimicrobianos

A partir dos resultados obtidos no item 3.2.4.4 foi realizada a avaliação das características biológicas de *D. saccharalis*. Foram utilizadas lagartas de até 24 horas de idade, as quais foram transferidas para tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8 cm de altura) contendo dieta artificial (HENSLEY; HAMMOND, 1968) com: (1) óleo essencial de *S. aromaticum* (0,1%); (2) óleo essencial de *O. vulgare* (0,1%); (3) óleo essencial de *S. terebinthifolius* (0,2%); (4) óleo essencial de *S. terebinthifolius* (0,5%); (5) Albendy® (Albendazol) (0,5 mg/mL) e (6) Flagimax® (Metronidazol) (1 mg/mL). Como tratamento controle foram inoculadas lagartas de *D. saccharalis* em dieta artificial sem a adição de produtos.

O preparo das dietas artificiais contendo os tratamentos anticontaminantes seguiram as mesmas descrições citadas no item 3.2.4.3. Após o preparo da dieta, esta foi vertida em tubos de vidro de fundo chato (2,5 cm de

diâmetro x 8 cm de altura) (± 5 mL) e posteriormente foi realizado o repique das lagartas de primeiro ínstar.

Cada tratamento foi composto por 100 lagartas, sendo que foram repicadas duas lagartas por tubo de vidro, correspondendo a uma repetição, com um total de 50 repetições por tratamento. Os tubos foram cobertos com algodão hidrófobo e acondicionados em suportes de ferro. As lagartas foram mantidas nas dietas artificiais até a formação das pupas, as quais foram retiradas, sexadas, pesadas e acondicionadas em recipientes plásticos (4 cm x 5 cm) até a emergência dos adultos. Os parâmetros biológicos avaliados durante as fases de desenvolvimento larval e pupal foram: período de desenvolvimento (dias), viabilidade (%), peso (g) de pupas e razão sexual.

Para a avaliação da sobrevivência dos adultos, fêmeas e machos foram individualizados em gaiolas, as quais consistiam em uma folha de papel sulfite com as extremidades forradas com cápsulas plásticas, contendo em seu interior um chumaço de algodão embebido com água para a alimentação destes adultos. Ao total foram avaliados vinte indivíduos de cada sexo correspondente a cada tratamento, sendo observados diariamente até a constatação da mortalidade.

Foram formados vinte casais de adultos de *D. saccharalis* da mesma idade correspondentes a cada tratamento, os quais foram mantidos em gaiolas de postura, semelhante à descrita anteriormente, contendo em seu interior um chumaço de algodão embebido com água para a alimentação dos adultos. As folhas de sulfite com as posturas foram retiradas a cada 24 horas, sendo coletadas 20 posturas de cada tratamento para a determinação da viabilidade (%) dos ovos.

3.2.6 Aspectos biológicos de *Cotesia flavipes* mantidas em *Diatraea saccharalis* criadas em dieta artificial contendo óleos essenciais e produtos antimicrobianos

As lagartas de *D. saccharalis* de até 24 horas de idade foram transferidas para tubos de vidro de fundo chato (2,5 cm de diâmetro x 8 cm de altura) contendo dieta artificial (HENSLEY; HAMMOND, 1968) com os óleos essenciais e produtos antimicrobianos descritos no item 3.2.5, sendo que, o preparo das

dietas artificiais dos respectivos tratamentos seguiram os protocolos descritos no item 3.2.4.3.

Foram utilizadas 20 lagartas para cada tratamento, as quais foram mantidas por cerca de 20 dias na dieta artificial, sendo posteriormente ofertadas individualmente para fêmeas adultas de *C. flavipes* para o processo de parasitismo. Em seguida, tais lagartas foram mantidas em cápsulas de plástico (3 cm de diâmetro x 5 cm de altura), contendo no seu interior dieta de realimentação (HENSLEY; HAMMOND, 1968).

Para avaliação das características biológicas de *C. flavipes*, após a saída das larvas do parasitoide do corpo da lagarta e a pupação, as massas de pupas foram retiradas e acondicionadas em tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8 cm de altura), sendo observadas diariamente para a determinação do período de desenvolvimento (dias) ovo-adulto; a viabilidade pupal (%); a razão sexual e a sobrevivência dos adultos.

Para a avaliação da sobrevivência dos adultos, machos e fêmeas foram individualizados em tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8 cm de altura) e observados diariamente para até a constatação da mortalidade, sendo que para cada sexo foram analisados 20 indivíduos. Na parte interior desses tubos foram aplicadas finas fileiras de mel puro com o auxílio de alfinete entomológico para a alimentação dos adultos.

3.2.7 Determinação do perfil químico dos óleos essenciais

A composição química do óleo de *S. aromaticum* foi adquirida em BOMFIM (2020; Informação pessoal), o qual foi proveniente do mesmo material vegetal utilizado nos bioensaio deste estudo.

A determinação do perfil químico do óleo essencial de *O. vulgare* foi realizada no Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil. As análises foram realizadas em um sistema de Cromatografia a gás acoplado a Espectrômetro de Massas Sequencial (CG-EM/EM), equipado com auto-injetor (Combi PAL AOC-5000 Shimadzu), coluna Restek Rtx-5ms (30m x 0.250 mm x 0.25 µm) fundida com sílica e Espectrômetro de Massas Sequencial (MSTQ8030 Shimadzu). As amostras foram analisadas em modo *full scan* e

injetadas a uma concentração de $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em uma rampa de aquecimento de 50°C a 120°C por 15,0 min, e de 120°C a 210°C com variação de temperatura de $2^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ em fluxo de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$. O gás Hélio foi utilizado como gás de arraste, a razão de fracionamento foi de 50,0; a temperatura do forno da coluna foi de 50°C , temperatura de injeção de 250°C , volume de injeção de $1,0 \mu\text{L}$, pressão de 62.7 kPa, velocidade linear de 36.3 cm.sec^{-1} e fluxo de purga de 5 mL.min^{-1} . Para a análise dos dados de separação e seus tratamentos, utilizou-se o Software GCMS Real Time Analysis® e a identificação das substâncias presentes nas amostras foi realizada através do reconhecimento dos espectros obtidos comparados à biblioteca de espectros de massa - NIST e literatura específica (ADAMS, 2017).

3.2.8 Análise estatística

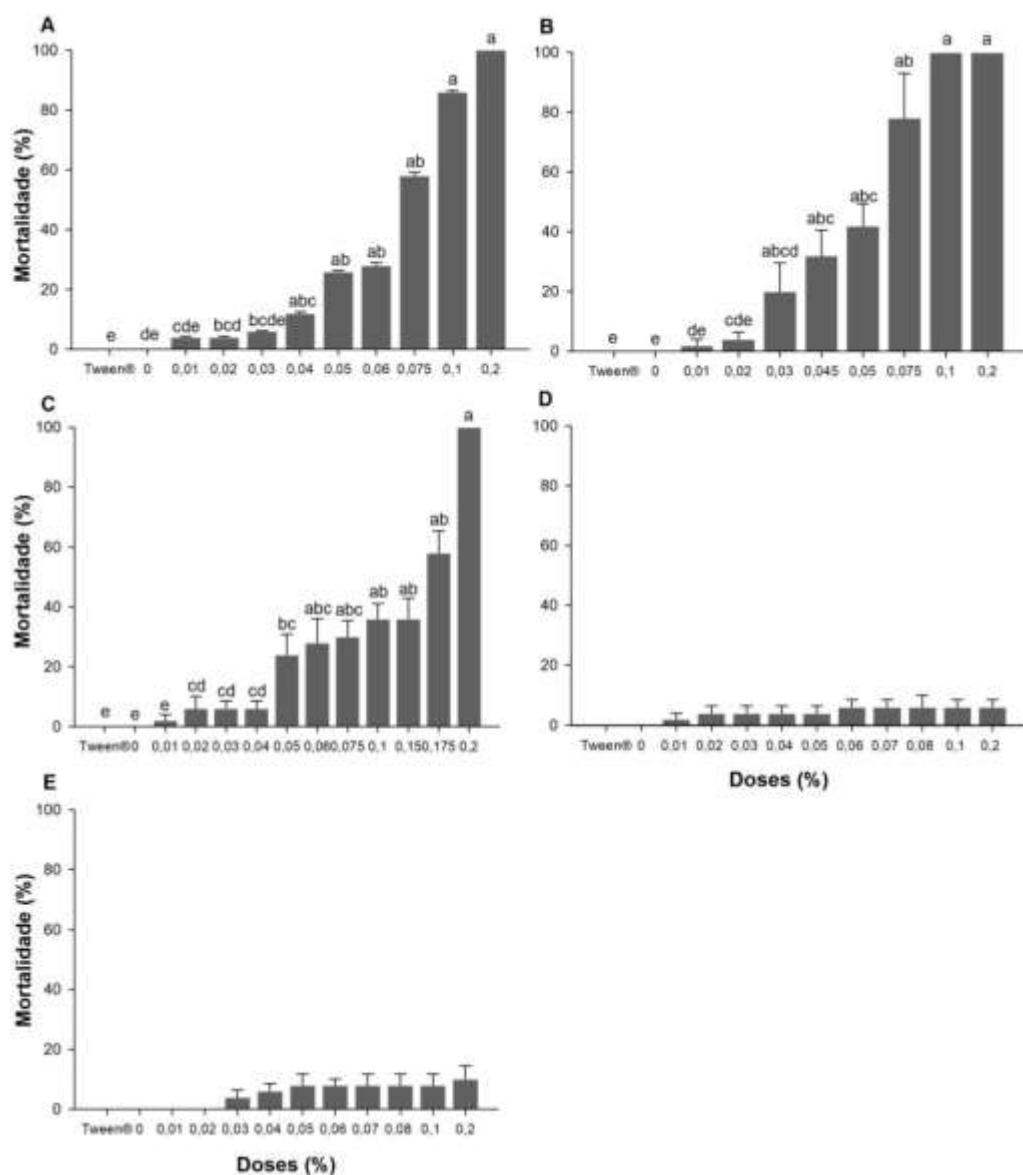
Os dados resultantes dos bioensaios foram analisados por análises exploratórias para avaliar as premissas de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). Os dados foram submetidos à análise não paramétrica, sendo utilizado o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier foram construídas com dados de sobrevida em idades específicas e comparadas pelo teste de LogRank ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas no software InfoStat (DI RIENZO et al., 2011).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Efeito dos óleos essenciais em dieta artificial sobre *Diatraea saccharalis*

Diferenças estatísticas no percentual de mortalidade de lagartas de *D. saccharalis* somente foram observadas entre as doses (%) dos óleos essenciais de *C. citratus* ($p < 0,0001$), *S. aromaticum* ($p < 0,0001$) e *O. vulgare* ($p < 0,0001$), onde doses (%) altas destes óleos foram altamente tóxicas para lagartas de 1º instar deste lepidóptero (Figura 1). Os óleos de *S. terebinthifolius* e *B. dracunculifolia* ($p = 0,0398$) apresentaram baixa toxicidade às lagartas de *D. saccharalis* mesmo que submetidas a alimentação com doses (%) altas destes produtos (Figura 1).

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



O tratamento com a adição de Tween® não diferiu estatisticamente do tratamento controle em todos os ensaios com os óleos essenciais, portanto, foi descartado qualquer efeito deste composto na mortalidade de lagartas de *D. saccharalis* em doses (%) que foram utilizados este produto como diluente ($\leq 0,05\%$) (Figura 1).

Como critério para a utilização destes óleos essenciais em avaliações antimicrobianas sobre lagartas de *D. saccharalis* infectadas por *Nosema* sp. foram selecionadas doses (%) que apresentaram mortalidade $\leq$ a 5%, as quais não se diferenciaram estatisticamente do tratamento controle (sem adição de óleos essenciais) nos bioensaios. Com isso, foram escolhidas as doses (%) $\leq$ 0,03 do óleo de *C. citratus*, 0,02 de *S. aromaticum*, 0,01 de *O. vulgare* e 0,02 e 0,05 para os óleos de *S. terebinthifolius* e *B. dracunculifolia*.

3.3.2 Avaliação de óleos essenciais e produtos antimicrobianos no desenvolvimento da infecção de *Nosema* sp. em *Diatraea saccharalis*

Foram observadas diferenças significativas no número de esporos de *Nosema* sp. em lagartas submetidas ou não à alimentação com antibióticos e óleos essenciais ($p < 0,0001$) (Tabela 1).

Lagartas de *D. saccharalis* alimentadas com dieta artificial contendo 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* (0,05%) apresentaram resultados satisfatórios, pois houve uma redução significativa $> 60\%$ da infecção pelo microsporídio quando comparadas ao nível de infecção das lagartas infectadas que não foram submetidas a tratamento com produtos antimicrobianos (Tabela 1). Resultado contrastante foi observado na avaliação antimicrobiana dos óleos de *C. citratus* e *B. dracunculifolia* (0,02 e 0,05%) e nos antibióticos tianidazol e albendazol (1 e 2 mg/mL) sobre o desenvolvimento de *Nosema* sp., os quais não apresentaram resultados satisfatórios, uma vez que, o número de esporos deste microsporídio encontrados em lagartas submetidas ao tratamento por estes produtos foi superior ao observado no tratamento controle, o qual não foi acrescido nenhum tipo de tratamento na alimentação deste lepidóptero (Tabela 1).

Uma observação interessante quanto a utilização de antibióticos foi que, quando submetidas ao tratamento com metronidazol, foi observada uma redução significativa no número de esporos de *Nosema* sp. à medida que aumentava a dosagem (mg/mL) deste produto. O contrário foi observado quando as lagartas foram submetidas ao tratamento com os antibióticos albendazol e tinidazol, no

qual foi constatado um aumento progressivo no número de esporos à medida que aumentava a dose (mg/mL) destes produtos (Tabela 1).

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 antimicrobianos

Produto	Dose	Média do número de esporos de <i>Nosema</i> /lagarta ($\times 10^3$) ¹
Controle ²	-	6,5 $\pm$ 0,25 cdef
Albendazol	0,5 mg/mL	2,25 $\pm$ 0,61 a
	1 mg/mL	7,75 $\pm$ 2,45 bcdef
	2 mg/mL	8,50 $\pm$ 2,92 abcde
Metronidazol	0,5 mg/mL	4,25 $\pm$ 1,09 abcde
	1 mg/mL	2,50 $\pm$ 0,79 a
	2 mg/mL	3,00 $\pm$ 0,31 abc
Tinidazol	0,5 mg/mL	3,75 $\pm$ 0,79 abcd
	1 mg/mL	8,50 $\pm$ 1,21 ef
	2 mg/mL	10,00 $\pm$ 2,50 ef
Óleo de <i>Syzygium aromaticum</i>	0,01%	1,70 $\pm$ 0,12 a
Óleo de <i>Origanum vulgare</i>	0,01%	2,00 $\pm$ 0,27 a
Óleo de <i>Cymbopogon citratus</i> ³	0,02%	6,75 $\pm$ 0,64 cdef
	0,03%	6,90 $\pm$ 0,60 def
Óleo de <i>Schinus terebinthifolius</i> ³	0,02%	2,75 $\pm$ 0,25 ab
	0,05%	2,40 $\pm$ 0,19 a
Óleo de <i>Baccharis dracunculifolia</i> ³	0,02%	7,75 $\pm$ 1,15 def
	0,05%	8,75 $\pm$ 0,40 f

¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$);

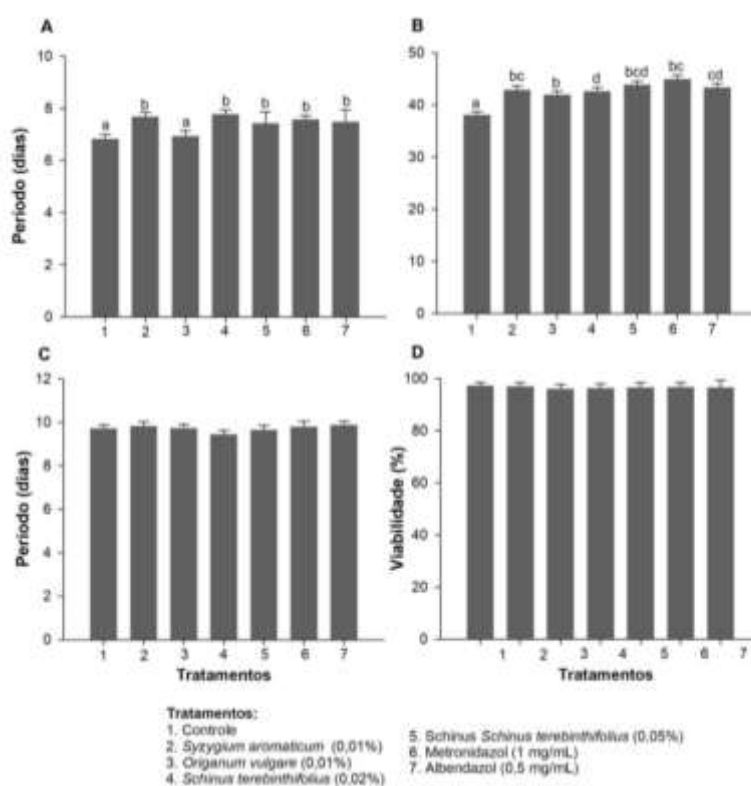
²Tratamento sem adição de produto;

Os tratamentos que demonstraram a maior redução na contagem de esporos, albendazol (0,5 mg/mL), metronidazol (1 mg/mL), óleos essenciais de *S. aromaticum* (0,01%), *O. vulgare* (0,01%) e de *S. terebinthifolius* (0,02 e 0,05%) (Tabela 1), foram examinados quanto aos efeitos em parâmetros biológicos de *D. saccharalis* e *C. flavipes*.

3.3.3 Aspectos biológicos de *Diatraea saccharalis* criadas em dieta artificial contendo óleos essenciais e produtos antimicrobianos

A adição dos antibióticos albendazol (0,5 mg/mL) e metronidazol (1 mg/mL) e dos óleos essenciais de *S.aromaticum* (0,01%), *O. vulgare* (0,01%) e de *S. terebinthifolius* (0,02 e 0,05%) na alimentação de *D. saccharalis* somente resultou em alterações no período de desenvolvimento (dias) das fases de ovo ($p = 0,0001$) e larva ($p < 0,0001$) (Figura 2).

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 *Diatraea saccharalis* 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 $p < 0,05$).



O período (dias) para o desenvolvimento da fase de ovo de *D. saccharalis* no tratamento controle (dietas sem a adição de produtos antimicrobianos) e em

dieta contendo *O. vulgare* (0,01%) foi inferior ao observado nos demais tratamentos, os quais não se diferenciaram estatisticamente entre si (Figura 2; A). Resultado semelhante foi observado no período (dias) da fase de larva, na qual lagartas mantidas em dieta sem produtos antimicrobianos apresentaram um período médio de desenvolvimento de 38,19 dias, diferindo dos demais tratamentos, os quais tiveram um aumento significativo no desenvolvimento das lagartas deste lepidóptero (Figura 2; B).

Diferente do que foi observado na fase de ovo e larva, o período (dias) de desenvolvimento das pupas ($p = 0,5737$) e a viabilidade (%) dos ovos ($p = 0,9812$) não foram afetados pelo acréscimo de produtos antimicrobianos na dieta artificial de *D. saccharalis* ($p = 0,5737$) (Figura 2; C e D).

A razão sexual ($p = 0,5320$) e o peso (g) médio das pupas ($p = 0,1427$), bem como, a sobrevivência de fêmeas ($p = 0,639$) e machos ($p = 0,122$) de *D. saccharalis* foram semelhantes entre os tratamentos, indicando que a adição dos produtos antimicrobianos na dieta artificial não afeta tais parâmetros biológicos deste lepidóptero (Figura 2 e 3; Tabela 2).

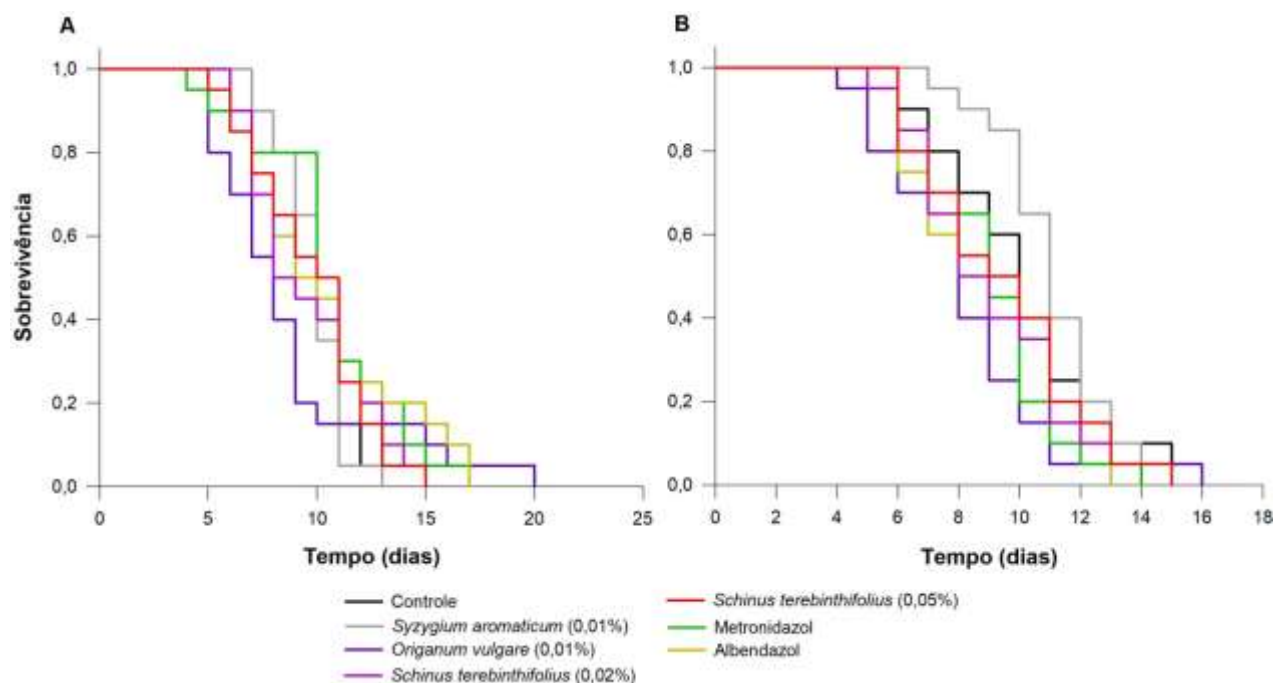
Tabela 2 – Razão sexual e peso (g) de pupas ($\pm$ EP) de *Diatraea saccharalis* mantidas em dietas artificiais sem e com óleos essenciais e produtos antimicrobianos.

Tratamentos	Razão sexual*	Peso de pupa (g)*
Controle ¹	0,52 $\pm$ 0,07	0,16 $\pm$ 0,01
<i>Syzygium aromaticum</i> (0,01%)	0,58 $\pm$ 0,05	0,14 $\pm$ 0,00
<i>Origanum vulgare</i> (0,01%)	0,48 $\pm$ 0,100	0,14 $\pm$ 0,00
<i>Schinus terebinthifolius</i> (0,02%)	0,54 $\pm$ 0,07	0,15 $\pm$ 0,00
<i>Schinus terebinthifolius</i> (0,05%)	0,58 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,00
Metronidazol (1mg/mL)	0,42 $\pm$ 0,04	0,15 $\pm$ 0,00
Albdendazol (0,5 mg/mL)	0,46 $\pm$ 0,06	0,15 $\pm$ 0,00

¹Tratamento sem adição de produto;

*Não significativo pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Figura 3 – Sobrevivência de fêmeas (A) e machos (B) adultos de *Diatraea saccharalis* mantidas em dietas artificiais com e sem óleos essenciais e produtos antimicrobianos



3.3.4 Aspectos biológicos de *Cotesia flavipes* mantidas em *Diatraea saccharalis* criadas em dieta artificial contendo óleos essenciais e produtos antimicrobianos

Quando submetidas ao parasitismo em lagartas de *D. saccharalis* alimentadas com dieta artificial acrescida dos antibióticos albendazol (0,5 mg/mL) e metronidazol (1 mg/mL) e dos óleos essenciais de *S. aromaticum* (0,01%), *O. vulgare* (0,01%) e de *S. terebinthifolius* (0,02 e 0,05%), *C. flavipes* não é afetada quanto aos parâmetros biológicos: período de desenvolvimento (dias) de ovo-adulto ($p = 0,4232$), viabilidade (%) de pupas ($p = 0,1175$), razão sexual (%) ($p = 0,7627$) e sobrevivência de fêmeas ($p = 0,117$) e machos ($p = 0,060$) adultos (Figuras 4 e 5).

Figura 4 – Período de desenvolvimento (dias) de ovo-adulto (A), viabilidade (%) de pupas (B) e razão sexual (C) de adultos de *Cotesia flavipes* mantidas em *Diatraea saccharalis* criadas em dieta artificial contendo óleos essenciais e produtos antimicrobianos. Colunas sem letra não diferem entre si (Teste de Kruskal-Wallis $p < 0,05$)

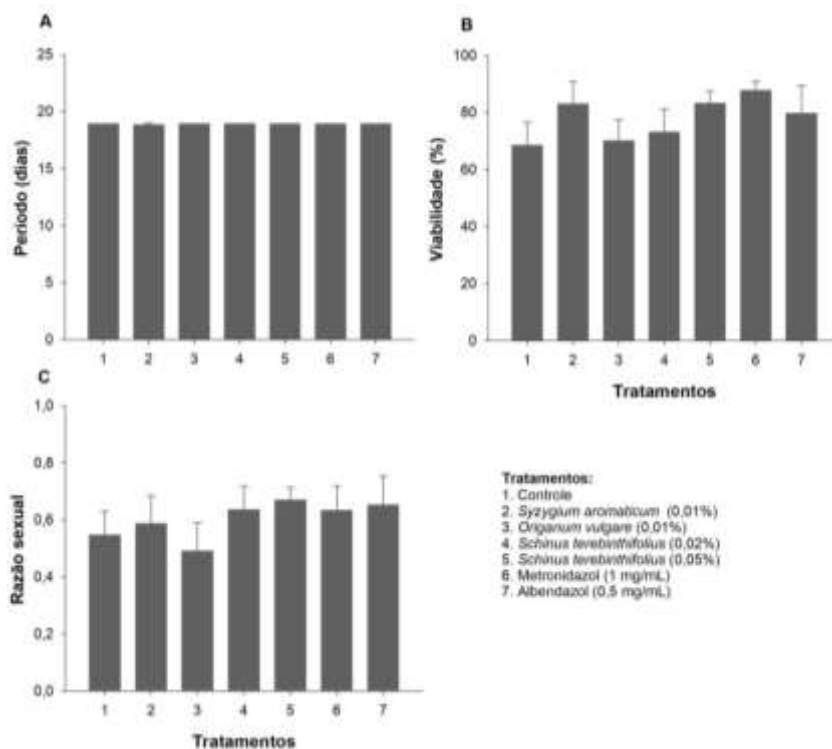
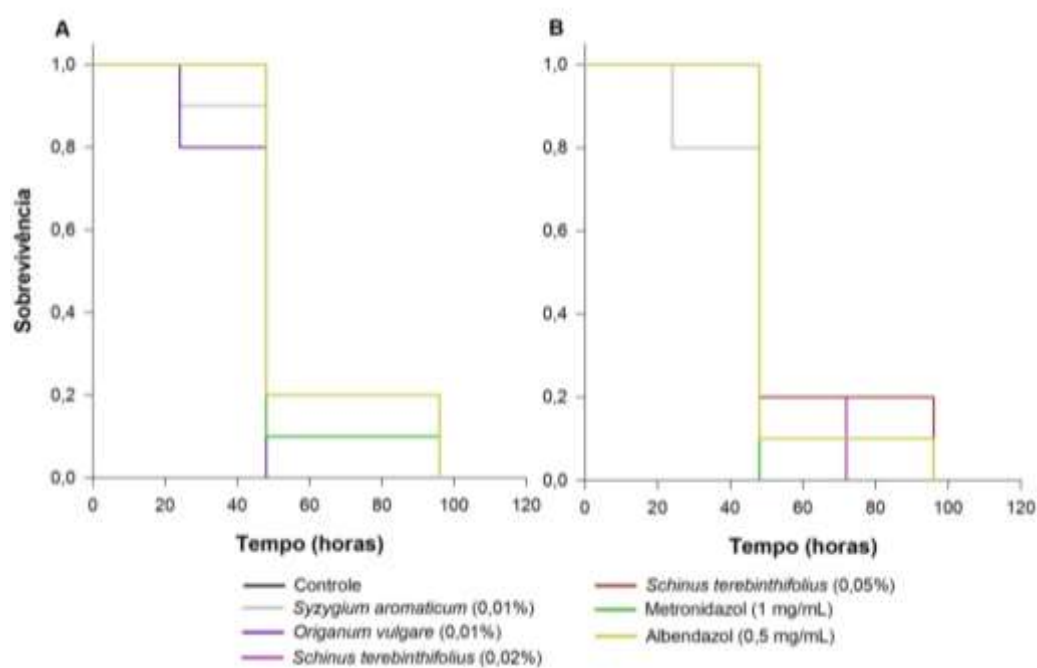


Figura 5 – Sobrevivência de fêmeas (A) e machos (B) adultos de *Cotesia flavipes* mantidas em *Diatraea saccharalis* criadas em dieta artificial contendo óleos essenciais e produtos antimicrobianos

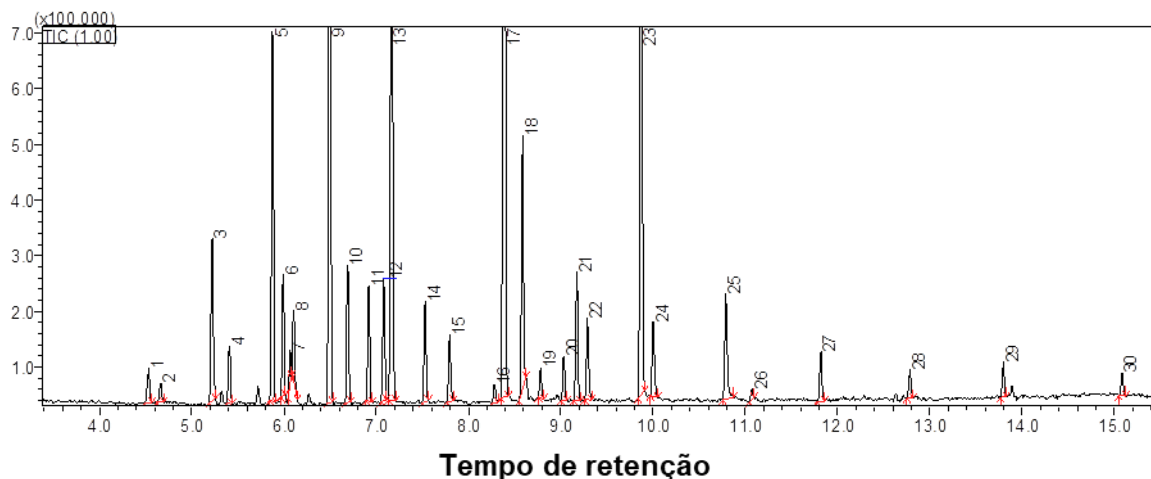


3.3.5 Determinação do perfil químico dos óleos essenciais

No óleo essencial de *S. aromaticum* foram identificados os compostos, eugenol, caryophyllene bicyclo e humuleno, dos quais o eugenol foi o composto majoritário, representando 80,68% do total da composição deste óleo essencial.

No óleo essencial de *O. vulgare* foram identificados 30 compostos (Figura 6), no qual os compostos majoritários foram o Terpinen-4-ol, o qual representa 26% do composto total, seguidos de 4 – Thujanol (12,78%), Thymol (12,52%) e gamma-Terpinene (10,36%).

Figura 6 - Cromatograma do óleo essencial de *Origanum vulgare* obtido por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas



1: Thujene- C₁₀H₁₆; 2: α-pinene; 3: Bicyclo [3.1.0] hexane C₁₀H₁₆; 4: β.-Myrcene; 5: α-Terpinene C₁₀H₁₆; 6: p-Cymene C₁₀H₁₄; 7: d-limonene; 8: not identified; 9: γ-terpinene C₁₀H₁₆; 10: Sabinene hydrate cis or 4 – Thujanol C₁₀H₁₈O; 11: p-Mentha-2,4(8)-diene C₁₀H₁₆; 12: Linalool C₁₀H₁₈O; 13: Sabinene hydrate trans or 4 - Thujanol - C₁₀H₁₈O; 14: 2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, trans-C₁₀H₁₈O; 15: not identified; 16: endo-Borneol C₁₀H₁₈O; 17: Terpinen-4-ol C₁₀H₁₈O; 18: α.-Terpineol C₁₀H₁₈O; 19: trans-p-Menth-1-en-3-ol; 20: Thymol methyl ether C₁₅H₁₆O; 21: Benzene, 2-methoxy-1-methyl-4-(1-methylethyl)- or Carvacrol C₁₁H₁₆O; 22: Linalool acetate C₁₂H₂₀O₂; 23: Thymol C₁₀H₁₄O; 24: p-Cymen-2-ol C₁₀H₁₄O; 25: Eugenol C₁₀H₁₂O₂; 26: not identified; 27: Caryophyllene E C₁₅H₂₄; 28: bicyclo(8.1.0)undeca-2,6-diene, 3,7,11,11-tetramethyl-, or Bicyclogermacrene; 29: not identified; 30: not identified.

3.4 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o potencial de antibióticos e óleos essenciais na capacidade de reduzir a multiplicação de esporos de *Nosema* sp. em *D. saccharalis* e com isso, minimizar os efeitos deletérios ocasionados por este microsporídio neste lepidóptero e no parasitoide *C. flavipes*. Dos compostos e doses testadas, os óleos essenciais de *S. aromaticum* (0,01%), *O. vulgare* (0,01%) e de *S. terebinthifolius* (0,02 e 0,05%) e os antibióticos albendazol (0,5 mg/mL) e metronidazol (1 mg/mL) demonstraram maior redução na infecção de *Nosema* sp. em *D. saccharalis*.

As descobertas deste estudo são apoiadas por diversos registros da ação antimicrobiana de antibióticos e óleos essenciais na redução da infecção por *Nosema* em artrópodes (MAISTRELLO et al., 2008; BRAVO et al., 2017; BORGES et al., 2020; PAŞCA et al., 2021). Entretanto, este é o primeiro registro

que comprova o potencial de tais compostos na redução da infecção pelo microsporídio em *D. saccharalis*.

Os antibióticos albendazol e metronidazol são fármacos bastante utilizados contra patógenos, apresentando resultados eficazes na inibição de infecções por *Nosema* em insetos (BOOHENE et al., 2003; GISDER; GENERSCH, 2015; BOILEAU et al., 2016). A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de plantas é uma alternativa promissora, que vem apresentando resultados satisfatórios contra uma variedade de microrganismo patogênicos (CHOUHAN et al., 2017; GARCÍA-SALINAS et al., 2018; DUTRA et al., 2019; DANNENBERG et al., 2019). Tal atuação se deve a composição destes produtos, os quais apresentam diferentes classes de compostos, tais como os álcoois, aldeídos e fenóis, que atuam individualmente ou em sinergismo inibindo o desenvolvimento de patógenos (BASSOLÉ et al., 2012).

Na composição química dos óleos de *S. aromaticum* e *O. vulgare* foi identificada a presença do eugenol e/ou terpineol, timol e carvacrol, os quais são responsáveis pela redução de inúmeras infecções bacterianas e fúngicas (BENNIS et al., 2004; BONA et al., 2016; LEE et al., 2017; MARCHESE et al., 2017; NEPOMUCENO et al., 2018; CAI et al., 2019). A composição do óleo essencial de *S. terebinthifolius* não foi identificada neste estudo, contudo, estudos apontam a presença de α -pineno, mirceno, limoneno como componentes majoritários deste óleo, os quais são reconhecidos pelo seu potencial antimicrobiano (GOIS et al., 2016; ULIANA et al., 2016; DANNENBERG et al., 2019).

A atuação isolada de alguns dos compostos presentes nestes óleos, tais como o eugenol, timol e carvacrol purificados vêm apresentando eficiência na redução da infecção de *Nosema* em abelhas, se tornando uma alternativa mais desejável, visto que, a quantidade de ingredientes ativos presentes nos extratos de plantas é variável, podendo apresentar resultados diferentes quanto à inibição do desenvolvimento do microsporídio (BORGES et al., 2020; COSTA et al., 2010). Entretanto, mesmo que a utilização destes compostos sobre infecções de *Nosema* sp. em *D. saccharalis* seja uma alternativa promissora, é necessário investigar os efeitos tóxicos sobre este lepidóptero, uma vez, que o eugenol é reconhecido também pelo seu efeito inseticida a inúmeros artrópodes, atuando

de forma moderada como inibidor da enzima acetilcolinesterase (VARGAS-MÉNDEZ et al., 2019).

A atividade antimicrobiana dos óleos de *C. citratus* e *B. dracunculifolia* e dos antibióticos tinidazol e albendazol (1 e 2 mg/mL) são eficientes contra inúmeros patógenos, no entanto, neste estudo, a adição destes produtos na alimentação de *D. saccharalis* teve efeito adverso, uma vez que, foi constatado um aumento do número de esporos de *Nosema* sp. em relação ao tratamento controle (GISDER; GENERSCH, 2015; RODRIGUES et al., 2020). Tais resultados indicam que estes compostos/doses podem ter alterado a microbiota intestinal de *D. saccharalis* e com isso tornado este inseto mais susceptível a infecção pelo microsporídeo, uma vez, que tais produtos afetam também microrganismos benéficos que desempenham papel crucial na regulação das funções imunológicas dos insetos. Um exemplo com abelhas demonstra que as alterações na microbiota intestinal ocasionados pela utilização de antibióticos torna estes insetos vulneráveis à infecção por *Nosema*, fato este, que exemplifica o que pode ter ocorrido neste estudo com *D. saccharalis* (LI et al., 2017). Entretanto, para elucidar tal informação é necessário entender o papel da microbiota intestinal de *D. saccharalis* nas respostas imunológicas à infecção por *Nosema*.

Os resultados obtidos sobre os efeitos da adição dos óleos essenciais de *S. aromaticum*, *O. vulgare* e de *S. terebinthifolius* e dos antibióticos albendazol (0,5 mg/mL) e metronidazol (1 mg/mL) na alimentação de *D. saccharalis* e *C. flavipes* indicaram pouco ou nenhum efeito deletério em parâmetros biológicos destes insetos, sugerindo que os efeitos nocivos destes compostos podem está relacionados com os ingredientes ativos presentes em tais produtos, bem como, pela dose utilizada. No entanto, mesmo que os resultados sejam promissores, não foi avaliado o efeito da utilização dos antibióticos e dos óleos essenciais por sucessivas gerações de *D. saccharalis* e *C. flavipes*, portanto, tais compostos devem ser fornecidos com precaução, evitando com isso possíveis efeitos colaterais da utilização excessiva de tais compostos.

De modo geral, as descobertas deste estudo servirão de suporte para a implementação e aprimoramento de medidas de controle de infecções por *Nosema* sp. em produções de *D. saccharalis*, visando a manutenção da

qualidade deste lepidóptero e do parasitoide *C. flavipes* para o uso em programas de controle biológico.

REFERÊNCIAS

- BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R.. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3989-4006, 2012.
- BENNIS, S. et al. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 454-458, 2004.
- BJORNSON, S.; OI, D. **Microsporidia biological control agents and pathogens of beneficial insects**. 2014.
- BOILEAU, M. et al. Successful treatment of disseminated *Anncaliia algerae* microsporidial infection with combination fumagillin and albendazole. In: **Open forum infectious diseases**. Oxford University Press, 2016. p. ofw158.
- BONA, E. et al. Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents?. **Journal of applied microbiology**, v. 121, n. 6, p. 1530-1545, 2016.
- BOOHENE, C. K. et al. Evaluation of remediation methods for *Nosema disease* in *Muscidifurax raptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). **Environmental entomology**, v. 32, n. 5, p. 1146-1153, 2003.
- BORGES, D. et al. Control of the microsporidian parasite *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) using nutraceutical and immuno-stimulatory compounds. **Plos one**, v. 15, n. 1, p. e0227484, 2020.
- BRAVO, J. et al. Antifungal activity of the essential oil obtained from *Cryptocarya alba* against infection in honey bees by *Nosema ceranae*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 149, p. 141-147, 2017.
- BUCZEK, K. et al. Bioactivity studies of porphyrinoids against microsporidia isolated from honeybees. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2020.
- CAI, R. et al. Antibacterial activity and mechanism of thymol against *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells and spores. **LWT**, v. 105, p. 377-384, 2019.).
- CHOUHAN, S. et al. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 58, 2017.
- COSTA, C. et al. Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and on the longevity of honeybees (*Apis mellifera* L.) in laboratory conditions. **Apidologie**, v. 41, n. 2, p. 141-150, 2010.

- DANNENBERG, G. S. et al. Essential oil from pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. **Food control**, v. 95, p. 115-120, 2019.
- DI RIENZO, J. A. et al. InfoStat versión 2011. **Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina**. URL <http://www.infostat.com.ar>, v. 8, p. 195-199, 2011.
- DUTRA, T. V. et al. Bioactivity of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil against *Alicyclobacillus* spp. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 345-349, 2019.
- 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.
- GARCÍA-SALINAS, S. et al. Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of different components of natural origin present in essential oils. **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1399, 2018.
- 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**, v. 10, n. 2, p. e0117200, 2015.
- GLAVINIC, U. et al. Potential of fumagillin and *Agaricus blazei* mushroom extract to reduce *Nosema ceranae* in honey bees. **Insects**, v. 12, n. 4, p. 282, 2021.
- GOIS, F. D. et al. Effect of Brazilian red pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) essential oil on performance, diarrhea and gut health of weanling pigs. **Livestock Science**, v. 183, p. 24-27, 2016.
- HAN, B.; WEISS, L. M. Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 2, p. 5.2. 03, 2017.
- HENSLEY, S.D.; HAMMOND, A.H. Laboratory techniques for rearing the sugar cane borer on an artificial diet. **J. Econ. Entomol.** 61: 1742-1743, 1968.
- LACEY, L. A. **Manual of techniques in invertebrate pathology**. Academic Press, 2012.
- LEE, J.-H.; KIM, Y.-G.; LEE, J. Carvacrol-rich oregano oil and thymol-rich thyme red oil inhibit biofilm formation and the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 6, p. 1420-1428, 2017.

LI, J. H. et al. New evidence showing that the destruction of gut bacteria by antibiotic treatment could increase the honey bee's vulnerability to *Nosema* infection. **PloS one**, v. 12, n. 11, p. e0187505, 2017.

MAISTRELLO, L. et al. Screening of natural compounds for the control of *Nosema* disease in honeybees (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v. 39, n. 4, p. 436-445, 2008.

MARCHESE, A. et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical reviews in microbiology**, v. 43, n. 6, p. 668-689, 2017.

NEPOMUCENO, N. C. et al. Antimicrobial activity of PLA/PEG nanofibers containing terpinen-4-ol against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 6, p. 45782, 2018.

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.

PAŞCA, C. et al. Extratos biologicamente ativos de diferentes plantas medicinais testados como aditivos potenciais contra patógenos de abelhas. **Antibióticos**, v. 10, n. 8, pág. 960, 2021.

RODRIGUES, G. S. et al. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.(CAPIM-SANTO) SOBRE *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente**, v. 10, n. 1, p. 8-8, 2020.

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.

ULIANA, M. P. et al. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 235-240, 2016.

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.

VARGAS-MÉNDEZ, L. Y. et al. Bioactivity of semisynthetic eugenol derivatives against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae infesting maize in Colombia. **Saudi journal of biological sciences**, v. 26, n. 7, p. 1613-1620, 2019.

VOSSBRINCK C. R. et al. Ribosomal DNA sequences of *Encephalitozoon Hellem* and *Encephalitozoon Cuniculi*: Species identification and phylogenetic construction. **J Eukaryot Microbiol** 40:354-362, 1993.

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 simbiossantes 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.
- BJORNSEN, 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 polydnaviruses. **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 polydnavirus 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.