

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL)**

**MÉTODOS MOLECULARES E CARACTERÍSTICAS
BIOLÓGICAS DE *Trichospilus diatraeae* E *Palmistichus
elaeisis* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE)**

VANESSA RODRIGUES FERREIRA CALADO

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2015**

**MÉTODOS MOLECULARES E CARACTERÍSTICAS
BIOLÓGICAS DE *Trichospilus diatraeae* E *Palmistichus
elaeisis* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE)**

VANESSA RODRIGUES FERREIRA CALADO

Bióloga

Orientador: PROF. DR. FABRICIO FAGUNDES PEREIRA

Co-orientadora: PROF^a. DR^a. ALEXEIA BARUFATTI GRISOLIA

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Dourados

Mato Grosso do Sul

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C141m	<p>Calado, Vanessa Rodrigues Ferreira. Métodos moleculares e características biológicas de <i>Trichospilus diatraeae</i> E <i>Palmistichus elaeisis</i> (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE). / Vanessa Rodrigues Ferreira Calado. – Dourados, MS : UFGD, 2015. 74f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Fabricio Fagundes Pereira. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Parasitoides. 2. Criação massal. 3. Extração de DNA. 4. Transferabilidade. 5. Microsatélites. I. Título.</p> <p>CDD – 632.96</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

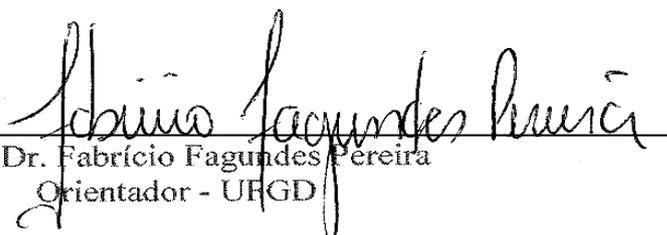
©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

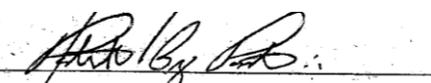
“MÉTODOS MOLECULARES E CARACTERÍSTICAS
BIOLÓGICAS DE *Trichospilus diatraeae* E *Palmistichus elaeisis*
(HYMENOPTERA: EULOPHIDAE)”

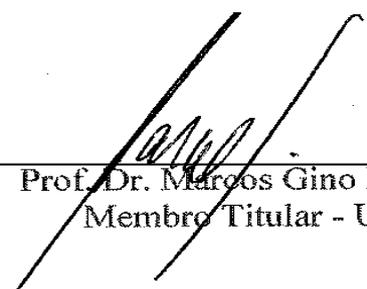
Por

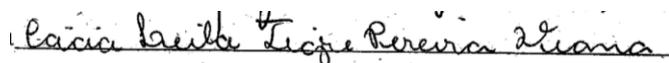
VANESSA RODRIGUES FERREIRA CALADO

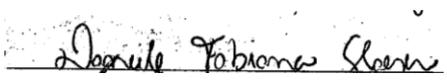
Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD,
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
DOUTORA EM AGRONOMIA
Área de concentração: Produção Vegetal


Prof. Dr. Fabrício Fagundes Pereira
Orientador - UFGD


Prof. Dr. Patrik Luiz Pastori
Membro Titular-UFC


Prof. Dr. Marcos Gino Fernandes
Membro Titular - UFGD


Profª Drª Cácia Leila Tigre
Membro Titular- Escola Estadual
Agrotécnica Castro Alves-Pólo


Drª. Daniele Fabiana Glaeser
Membro Titular - UFGD/EMBRAPA

Aprovada em : 27 de fevereiro de 2015

*“Quando fizeres algo nobre e belo e
ninguém notar, não fique triste. Pois o sol
toda manhã faz um lindo espetáculo e, no
entanto, a maioria da plateia ainda
dorme...”*

John Lennon

Ao meu pai Edmilson Ferreira Calado
À minha mãe Eva Alves Rodrigues Calado
À minha irmã Carolyne Alves Calado

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar protegendo e iluminando meu caminho.

À Universidade Federal da Grande Dourados, pelas instalações e toda infraestrutura cedida para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo. Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento de Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), pelo auxílio financeiro para a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fabricio Fagundes Pereira, por me apresentar os parasitoides, pela orientação e ensinamentos.

À Professora Dr^a Alexéia Barufati, pela dedicação na orientação dos experimentos, pelos valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Patrik Luiz Pastori pelo auxílio na elaboração inicial do projeto da tese e amizade.

Ao aluno de Doutorado Bruno Amaral Crispim, pela grande colaboração na condução dos experimentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia pelos ensinamentos transmitidos.

Aos professores, Dra. Alessandra Mayumi Tokura, Dr. Munir Mauad e a Dr. Daniele Fabiana Glaeser pela participação na banca de minha qualificação.

A Elizangela Leite Vargas, pela grande amizade, carinho e ajuda na condução das criações e experimento e pela animadora, divertida companhia.

À Daniele Fabiana Glaeser, pelo carinho, apoio e amizade.

À Cácia Leila Tigre Viana, pela colaboração, momentos de reflexão, pelo carinho, incentivo e amizade.

Ao Nicholas Vinícius Silva, pela colaboração durante os experimentos, auxílio na criação dos insetos, pelo carinho, apoio, amizade e animadora companhia.

Às queridas amigas Bruna Aparecida Cáceres Rodrigues e Fabiana Garcia de Oliveira, pela colaboração na criação dos insetos, pelo carinho, pela estimulante e inestimável companhia.

À estagiária Vitória Rojas, pelo auxílio nas criações, companhia e amizade.

Aos estagiários da Agronomia, Lucas Martinho Lopes Francisco, Ivan Vaz Sanches, Matheus Dalla Cort Pereira e Afonso Vitali Granado, pelo auxílio na organização dos materiais e criação dos insetos.

Ao mestrando Elisson Floriano, pelo auxílio na manutenção dos insetos.

Ao Bruno Pontim pela valiosa colaboração, apoio e amizade.

Às amigas Ana Carla Coelho Morais, Irys Couto, Rosália Azambuja pela companhia, pela confiança e amizade.

Aos colegas da Pós-Graduação em Agronomia, pela convivência.

À secretária da Pós-Graduação em Agronomia, Lúcia Maria Teles por sua eficiência e dedicação nos serviços prestados.

A todos meus familiares pelo apoio e compreensão, pelo incentivo, por estarem sempre do meu lado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, minha infinita gratidão.

BIOGRAFIA

Vanessa Rodrigues Ferreira Calado, filha de Eva Alves Rodrigues Calado e Edmilson Ferreira Calado, nasceu na cidade de Dourados, Mato Grosso do Sul, no dia 8 de novembro de 1987.

Estudou todo o ensino Fundamental e Médio na rede pública.

Em fevereiro de 2005, ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados-MS, concluindo-o em janeiro de 2009.

Em março de 2009, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS, defendendo a dissertação em fevereiro de 2011.

Em março de 2011, iniciou o Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Produção Vegetal, defendendo a tese em fevereiro de 2015.

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO.....	13
OBJETIVOS.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
CAPÍTULO I - Avaliação das características biológicas das populações de <i>Trichospilus diatraeae</i> e de <i>Palmistichus elaeisis</i> (Hymenoptera: Eulophidae) criados em <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Crambidae) por sucessivas gerações.....	
Resumo.....	25
Abstract.....	26
1.Introdução.....	26
2. Material e Métodos.....	27
3. Resultados.....	28
4. Discussão.....	31
5. Conclusão.....	32
6. Agradecimentos.....	34
7. Referência Bibliográfica.....	34
CAPÍTULO II – Avaliação de métodos de extração de DNA total de <i>Trichospilus diatraeae</i> e <i>Palmistichus elaeisis</i> (Hymenoptera: Eulophidae.....	
Resumo.....	41
Abstract.....	42
1.Introdução.....	42
2. Material e Métodos.....	43
3. Resultados.....	44
4. Discussão.....	46
5.Conclusão.....	47
6. Agradecimentos.....	48
7. Referência Bilbiográfica.....	48

CAPÍTULO III - Transferibilidade de marcadores nucleares microssatélites para <i>Trichospilus diatreaea</i> e <i>Palmistichus elaeisis</i> (Hymenoptera: Eulophidae).....	60
Resumo.....	61
Abstract.....	61
1. Introdução.....	62
2. Material e Métodos.....	63
3. Resultados e Discussão.....	64
4. Conclusão.....	65
5. Agradecimentos.....	65
6. Referência Bibliográfica.....	66
CONCLUSÕES GERAIS.....	73
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74

RESUMO

CALADO, V.R.F. Universidade Federal da Grande Dourados, fevereiro 2015. **Metódos moleculares e características biológicas de *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae)**. Orientador: Fabricio Fagundes Pereira.

Trichospilus diatraeae Cherian & Margabandhu e *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) são endoparasitoides pupais, preferencialmente de lepidópteros e, tem potencial para serem utilizados exclusivamente ou associados à outros parasitoides, visando o controle de insetos-praga em diferentes culturas agrícolas e florestais. A técnica de produção desses parasitoides é conhecida, porém nada se sabe sobre a qualidade dos insetos produzidos após várias gerações em laboratório. O objetivo foi comparar características biológicas de três populações de *T. diatraeae* e de *P. elaeisis* criados em pupas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) por vinte gerações. Nas gerações F1, F5, F10, F15 e F20, de cada parasitoides, a duração do ciclo de vida (ovo-adulto), as porcentagens de parasitismo e de emergência, o número de parasitoides emergidos por pupa, a longevidade dos descendentes, a razão sexual foram avaliados. Além disso, foi avaliado dois protocolos de extração de DNA e a transferibilidade de marcadores moleculares para otimização das análises genéticas. A criação de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* em pupas de *D. saccharalis* por 20 gerações sucessivas não afetou o parasitismo e a razão sexual de seus descendentes. Houve variações na progênie, porém o ciclo de vida, a longevidade e o tamanho da cápsula cefálica dos parasitoides se mantiveram em níveis bons, ou seja, ausência de reduções drásticas das variáveis biológicas. O protocolo A (Chelex[®]) é possível e viável de ser utilizada, a otimização desta técnica permitiu utilizar as amostras de DNA de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* na reação de PCR com resultados satisfatórios. Em *T. diatraeae* e *P. elaeisi* criados em laboratório foram encontrados polimorfismo em dois marcadores microssatélites, o que indica que podem ser consideradas como marcadores para ser aplicados na identificação de indivíduos pertencentes a mesma família.

Palavras Chave: Parasitoides, criação massal, extração de DNA, transferibilidade microssatélites.

ABSTRACT

CALADO, V.R.F. Universidade Federal da Grande Dourados, February 2015.

Molecular methods and biological characteristics of *Trichospilus diatraeae* and *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). Advisor: Fabricio Fagundes Pereira.

Trichospilus diatraeae Cherian & Margabandhu e *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) are endoparasitoids pupal, preferably lepidopteran and has the potential to be used exclusively or associated with other parasitoids, for the control of insect pests in different agricultural and forest crops. The mass rearing of these parasitoids is known, but nothing is known about the quality of the insects produced after several generations in the laboratory. The objective of this study is to compare biological characteristics of three populations of *Trichospilus diatraeae* and *Palmistichus elaeisis* created in pupae of *D. saccharalis* for twenty generations and to evaluate possible changes in the genetic variability of these parasitoids using molecular markers. In F1, F5, F10, F15 and F20, each parasitoid, the duration of the life cycle, the parasitism, emergence percentage, the number of parasitoids emerged per pupa, longevity of the children, the sex ratio were evaluated, was also evaluated test of two DNA extraction protocols and the transferability of molecular markers for optimization of genetic testing. The creation of *T. diatraeae* and *P. elaeisis* in pupae of *D. saccharalis* for 20 successive generations did not affect parasitism and the sex ratio of their offspring. There were variations in the progeny, but the life cycle, longevity and the size of the head capsule of parasitoids remained at good levels, ie absence of drastic reductions in biological variables. The protocol A (Chelex®) is possible and feasible to be used, the optimization of this technique allowed the use of DNA samples *T. diatraeae* and *P. elaeisis* in the PCR reaction with satisfactory results. In *T. diatraeae* and *P. elaeisi* reared in the laboratory on two polymorphisms were found microsatellite markers, this indicates that may be considered to be implemented as markers for identifying individuals belonging to the same family.

Key Words: Parasitoids, mass production, DNA extraction, transferability microsatellites.

INTRODUÇÃO GERAL

O Controle Biológico utiliza insetos para controlar outros insetos. É uma antiga estratégia de controle de pragas e uma das mais importantes táticas do MIP, pois os inimigos naturais são responsáveis para o equilíbrio no agroecossistema. Para implementar um programa de Controle Biológico é necessário conhecer técnicas para criação de insetos (PARRA et al. 2014).

O aumento da demanda para a produção sustentável de alimentos conjugado com uma maior restrição à aplicação de produtos químicos na agricultura, vem impulsionando o crescimento da indústria do biocontrole. Existem biofábricas que vem comercializando inimigos naturais no mundo (PARRA, 2002, RADCLIFFE et al. 2008, BUENO, 2009).

O uso de parasitoides como ferramenta para o controle de pragas exige que os mesmos sejam multiplicados em grandes quantidades. As criações massais referem-se à produção de milhões de insetos, sendo criados de forma contínua durante todo o ano, que envolvem operações semelhantes às de uma fábrica e demandam de conhecimento básico das espécies a serem multiplicadas (PARRA & CÔNSOLI, 2009).

Para que se obtenha sucesso no uso do biocontrole com inimigos naturais e se estabeleça uma tradição em sua utilização, a confiança desses agentes deve ser condição primordial, a baixa qualidade de inimigos naturais pode resultar em propaganda negativa desse método de controle e comprometer todo um programa desenvolvido ao longo de anos de pesquisa (BUENO, 2009, PARRA et al. 2014).

A produção de inimigos naturais com qualidade comparável àqueles encontrados na natureza é um dos principais objetivos de qualquer laboratório de criação de insetos que vise atender a programas de controle biológico (PREZOTTI & PARRA, 2002, PRATISSOLI et al. 2005). O controle de qualidade, é um dos fatores determinantes do sucesso desses programas, sendo a qualidade total de um organismo definida como a sua capacidade de controlar a praga após a liberação em campo (CLARKE & MCKENZIE, 1992, van LENTEREN, 2003, SØRENSEN et al. 2012). Portanto, o objetivo do controle de qualidade é determinar se um inimigo natural, após multiplicado por gerações sucessivas em laboratório, continua eficiente no controle de pragas (van LENTEREN, 1992a, 2003, BUENO, 2009).

Grande número de testes de laboratório tem sido conduzidos objetivando monitorar a qualidade de inimigos naturais, com base principalmente em parâmetros biológicos. Os testes envolvem a avaliação dos seguintes componentes de qualidade:

número de adultos emergidos, razão sexual, fecundidade, longevidade, tamanho do adulto, atividade de vôo e desempenho em campo (van LENTREN, 1992b, 2003, VREYSEN & ROBINSON, 2010). Essas características biológicas podem ser influenciadas pela idade, densidade, espécie de parasitoides e hospedeiros, além dos fatores abióticos como temperatura, umidade relativa do ar e fotoperíodo (COSTA LIMA et al. 2009, SILVA-TORRES et al. 2009, SILVA-TORRES et al. 2010, PEREIRA et al. 2011, CHICHERA et al. 2012, PASTORI et al. 2012, SØRENSEN et al. 2012, RODRIGUES et al. 2013, FAVERO et al. 2013, CALADO et al. 2014).

Entre os insetos há diferentes tipos de reprodução e que têm consequências importantes pelas quais as características biológicas são herdadas. O conhecimento genético dos reprodutores é necessário para interpretar a base genética da variação em suas características biológicas na sua história de vida. Um dos atributos importantes e que pode sofrer modificações no processo de colonização são os aspectos genéticos e o conhecimento da base genética das características biológicas, morfológicas, fisiológicas e comportamentais que são indispensáveis para o biocontrole. Muitas características biológicas podem deteriorar-se rapidamente através de endogamia, quando os insetos são levados á campo o que poderá resultar em baixo desempenho, resultando em falhas no controle de pragas (BAKER et al. 2003, PREZOTTI et al. 2004, BEUKEBOOM & ZWAAN, 2005, HERATY et al. 2011).

Um dos maiores obstáculos do controle de qualidade é a detecção da perda da variabilidade genética em insetos criados massalmente (MACKAUER, 1972, van LENTEREN, 2003, BEUKEBOOM & ZWAAN, 2005, SØRENSEN et al. 2012). A detecção da variabilidade genética em insetos é normalmente obtida a partir da genética molecular, utilizando técnicas para isolar e caracterizar tais genes por meio de marcadores moleculares.

Portanto, ao otimizar técnicas de criação em laboratório e experimentos de seleção dos inimigos naturais, pode-se melhorar sua eficiência para controle da praga. Características como: morfologia (por exemplo: tamanho da asa), fisiologia (por exemplo: a capacidade de escapar mecanismo de defesa do hospedeiro), bioquímica (por exemplo: resistência a inseticidas) e comportamento (por exemplo: padrões de atividade e preferências de acasalamento), um único gene (ou um pequeno número de genes principais) pode ser o responsável por expressar tal característica (BEUKEBOOM & ZWAAN, 2005).

Neste sentido, otimizar técnicas para isolar e caracterizar o DNA por meio de marcadores moleculares podem ser uma ferramenta para futuros estudos como por exemplo, a construção de um banco genômico e a manipulação genética como critério de avaliação de qualidade na produção de inimigos naturais como os parasitoides. Pois é importante para compreensão da variabilidade populacional do inimigo natural, além de possibilitar o estudo de sua biologia auxiliando no manejo e aumentando sua eficácia no controle biológico.

1. Os parasitoides *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis*

Os parasitoides representam o grupo de Hymenoptera mais rico em espécies e um dos táxons mais biodiversos da Classe Insecta; são comuns e abundantes em todos os ecossistemas terrestres; desenvolvem-se como parasitoides de muitas espécies de insetos, desempenhando um papel importante na regulação de populações dos seus hospedeiros, podendo depositar seus ovos sobre, ou diretamente dentro (ovo, larva, pré-pupa, pupa ou imago) que é morto em virtude do desenvolvimento da larva que dele se alimenta (LASALLE & GAULD, 1992, HERATY et al. 2011).

Himenópteros parasitoides podem ser ectoparasitoides ou endoparasitoides são importantes inimigos naturais de insetos-praga. Um grande número de espécies são utilizadas no controle biológico aplicado, principalmente devido a especificidade e facilidade de criação em laboratório (CHERIAN & SUBRAMANIAM, 1940, GIBSON, 1993, GAUTHIER et al. 2000, PARRA, 2002, HANSSON, 2004, HESAMI et al. 2010, GENÇER, 2012, van LENTEREN, 2012).

Dentre os himenópteros, destacam-se aqueles pertencentes à família Eulophidae que apresenta cerca de 4.472 espécies, constituída por insetos pequenos entre 0,4 a 0,6mm de comprimento. E está subdividida em quatro subfamílias: Entedoninae, Eulophinae, Entiinae e Tetrastichinae (UBAIDILLA, 2006, NOYES, 2008, BURKS et al. 2011).

O endoparasitoide de pupas de lepidópteros *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae) tem sido relatado e estudado como agente potencial no controle biológico de pragas agrícolas e florestais (PARON & BERTI FILHO, 2000, OLIVEIRA et al. 2001, PEREIRA et al. 2008a, ZACHÉ et al. 2010a, 2010b, ANDRADE et al. 2010, PASTORI et al. 2012, ZACHÉ et al. 2012, ZACHÉ et al. 2011 a, 2011b, MELO et al. 2011, PASTORI et al. 2012, ZACHÉ et al. 2012, VARGAS et al. 2013, PASTORI et al. 2013, BELLON et al. 2014).

A capacidade reprodutiva de *T. diatraeae* foi avaliada em pupas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebididae), *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797), *Heliothis virescens* Fabricius, 1781 (Lepidoptera: Noctuidae), *Thyrintina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae), *Hylesia paulex* Hübner, 1820 (Lepidoptera: Sartuniidae) e *Spodoptera cosmioides* Walker, 1858 (Lepidoptera: Noctuidae) e em *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (PARON & BERTI FILHO, 2000, ANDRADE et al. 2010, PASTORI et al. 2012, ZACHÉ et al. 2012, FAVERO et al. 2013, GLAESER et al. 2014, FAVERO et al. 2014, CALADO et al. 2014).

O endoparasitoide gregário, polífago e idiobionte *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle, 1993 (Hymenoptera: Eulophidae) também tem sido relatado e estudado como agente potencial no controle biológico de pragas agrícolas e florestais e foi registrado em pupas de *Eupseudosoma involuta* (Sepp, 1852), *Euselasia eucerus* Hewitson, 1872 (Lepidoptera: Riodinidae) (DELVARE e LASALLE, 1993), *Sabulodes* sp. (Lepidoptera: Geometridae) (BITTENCOURT e BERTI FILHO, 2004), *Thyrintina arnobia* (Stoll, 1782) e *Thyrintina leucoceraea* Rindge, 1961 (Lepidoptera: Geometridae) em plantios de eucalipto no Brasil (PEREIRA et al. 2008b).

2. Marcadores moleculares

O marcador genético é uma característica que é capaz de detectar diferenças entre dois ou mais indivíduos ou organismos. Entre suas propriedades um marcador genético: deve ser capaz de diferenciar os progenitores; deve ser reproduzido com precisão na progênie (YOUNG et al. 1993, FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Do ponto de vista molecular, um marcador genético (ou loco marcador) serve para identificar um local ou uma região de um cromossomo. Um marcador genético ideal deve apresentar uma série de atributos: alto nível de polimorfismo; estabilidade em diferentes ambientes; detectar grande número de locos não ligados; de herança simples (YOUNG et al. 1993; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Para a maioria das espécies, apenas uma pequena parte do genoma consiste de genes que codificam proteínas. O restante do genoma, durante muito tempo, foi considerado como “DNA lixo”, ou seja, sem função, e nessa parte incluíam-se os microssatélites. (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998)

Estudos vêm demonstrando que diversas funções estão relacionadas àquelas sequências repetitivas, inclusive dentro de regiões codantes. Os genomas de eucariotos são densamente povoados por microssatélites ou sequências simples repetidas (SSRs),

as quais consistem de 1 a 6 nucleotídeos repetidos *em tandem*. (GREENSTONE, 2006; TALBOT et al. 2011; SCHROEDER et al. 2012)

Microssatélites possuem um alto polimorfismo, no entanto, são flanqueados por sequências únicas e por isso podem ser amplificados através de PCR, o que faz deles ótimos marcadores moleculares (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998, LI et al. 2002, LI et al. 2004, GREENSTONE, 2006; TALBOT et al. 2011; SCHROEDER et al. 2012).

Entretanto, para o uso rotineiro dos microssatélites, há a necessidade de primeiro amplificar uma região, posteriormente sequenciar e em terceiro lugar, sintetizar os iniciadores (*primers*) específicos para cada loco. Uma vez feito isto, o loco marcador pode ser utilizado indefinidamente na espécie estudada. Desta forma, existe um custo elevado e trabalho no início, mas o custo subsequente é baixo e a simplicidade a posterior, é muito grande (LI et al. 2004, GREENSTONE, 2006, SCHROEDER et al. 2012).

O potencial de uso de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* como agente de controle biológico de pupas de lepidópteros em culturas agrícolas, tem sido estudado na Universidade Federal de Viçosa (UFV) e na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pela equipe de pesquisa do Laboratório de Entomologia/Controle Biológico (LECOBIOL). Na literatura consultada, não existem nenhum trabalho a nível genético dessas espécies, o que motivou a elaboração deste estudo. Essas informações serão importantes para a manipulação genética como critério de avaliação de qualidade na produção de *T. diatraeae* e *P. elaeisis*.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as características fenotípicas de *T. diatraeae* e de *P. elaeisis* criados em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) em laboratório e otimizar técnicas de análises moleculares para as duas espécies de parasitoides. Para isso, foram desenvolvidos os seguintes trabalhos:

1. Avaliação das características biológicas de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) e de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) criados em *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) por sucessivas gerações;
2. Avaliação de métodos de extração de DNA total de *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae);
3. Transferibilidade de marcadores nucleares microssatélites para *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, G.S., SERRÃO, J.E., ZANUNCIO, J.C., ZANUNCIO, T.V., LEITE, G.L.D., POLANCZYK, R.A. Immunity of an Alternative Host Can Be Overcome by Higher Densities of Its Parasitoids *Palmistichus elaeisis* and *Trichospilus diatraeae*. **PlosOne**. v.5, n.10, p. 13231, 2010.
- BAKER, D.A.; LOXDALE, H.D.; EDWARDS, O.R. Genetic variation and founder effects in the parasitoid wasp, *Diaeretiella rapae* (M'Intosh) (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiidae), affecting its potential as a biological control agent. **Molecular Ecology** . v. 12, p. 3303–3311, 2003.
- BELLON, P. P.; OLIVEIRA, H. N. ; PEREIRA, F. F. Teste de voo como critério de avaliação da qualidade de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae). **Bioscience Journal**, v. 30, p. 582-584, 2014.
- BITTENCOURT, M.A.L. & BERTI-FILHO, E. Desenvolvimento dos estágios imaturos de *Palmistichus elaeisis* Delvare & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de Lepidoptera. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.48, p.65-68, 2004.
- BUEKEBOOM, L.W.; ZWAAN, B.J. Genetics. In: Jervis, M. A.. (Eds.). **Insects as Natural Enemies: A Practical Perspective**, Springer, Netherlands, 2005.p 167-201.
- BUENO, V.H.P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: Editora UFLA, 2009. p. 169-197.
- BURKS, R. A., HERATY, J. M., GEBIOLA, M., HANSSON, C. Combined molecular and morphological phylogeny of Eulophidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), with focus on the subfamily Entedoninae. **Cladistics**, v.27, p. 581-605. 2011.
- CALADO, V.R.F.; PEREIRA, F.F.; VARGAS, E.L.; GLAESER, D.F.; OLIVEIRA, F.G. Características biológicas de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) nos hospedeiros *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) e *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), **Biotemas**, v. 27, p. 71-77, 2014.
- CHERIAN, M.C. & SUBRAMANIAM, C.K. *Tetrastichus ayyari* Rohw – a pupal parasite of some moth-borers in South India. **Agricultural Research Institute**, v. 2, p. 75-77, 1940.
- CHICHERA, R.A.; PEREIRA, F.F.; KASSAB, S.O.; BARBOSA, R.H.; PASTORI, P. L.; ROSSONI, C. Capacidade de busca de *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Interciencia**, v. 37, p. 852-856, 2012.
- CLARKE, G.M. & L.J. MCKENZIE. Fluctuating asymmetry as a quality control indicator for insect mass rearing processes. **Journal Economic Entomology**, v. 85, p. 2045-2050. 1992.
- COSTA LIMA, T.C.; GEREMIAS, L.D; PARRA, J.R.P. Efeito da temperatura e umidade relativa do ar no desenvolvimento de *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromysidae) em *Vigna unguilata*. **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 727-733, 2009.

DELVARE, G. & LASALLE, J. A new genus of Tetrastichinae (Hymenoptera: Eulophidae) from the Neotropical Region, with the description of a new species parasitic on key pests of oil palm. **Journal of Natural History**, v. 27, p.435-444, 1993.

FAVERO, K. ; PEREIRA, F. F. ; KASSAB, S.O. ; OLIVEIRA, H. N. ; COSTA, D. P. ; ZANUNCIO, J. C. Biological characteristics of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) are influenced by the number of females exposed per pupa of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Florida Entomologist**, v. 96, p. 583-589, 2013.

FAVERO, K. ; PEREIRA, F. F. ; KASSAB, S.O. ; COSTA, D. P. ; ZANUNCIO, J. C. Life and Fertility Tables of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) With *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) Pupae. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 107, p. 621-626, 2014.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília, EMBRAPA, 1998. 220p.

GAUTHIER, N.; LASSALE, J.; QUICKE, D.L.J.; GODFRAY, H.C.J. Phylogeny of Eulophidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), with a reclassification of Eulophinae and the recognition that Elasmidae are derived eulophids. **Systematic Entomology**, v.25, p.521-539, 2000.

GENÇER, L. Contributions to the Knowledge of the Eulophinae (Hymenoptera: Eulophidae) from Sivas, Turkey, with Some New Records. **Journal of the Entomological Research Society**. v.14, p. 83-89, 2012.

GIBSON, G. A. P., Superfamilies Mymarommatoidea and Chalcidoidea. In: Goulet, H., Huber, J. T. (Eds.). **Hymenoptera of the World; an identification guide to Families**. Canada Communication Group, Ottawa, Canada. 1993. p.570-655.

GLAESER, D. F.; PEREIRA, F. F.; VARGAS, E. L.; CALADO, V. R. F.; FAVERO, K. Desempenho reprodutivo de *Trichospilus diatraeae* no hospedeiro natural *Diatraea saccharalis* três gerações no hospedeiro alternativo *Tenebrio molitor*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, p. 213-218, 2014.

GREENSTONE, M.H. Molecular methods for assessing insect Parasitism. **Bulletin of Entomological Research**, v. 96, p.1-13, 2006.

HANSON, C. Eulophidae of Costa Rica. **Memories of the American Entomological Institute**, v.75, p.537, 2004.

HERATY, J.; RONQUIST, F.; CARPENTER, J.M.; HAWKS, D.; SCHULMEISTER, S.; DOWLING, A.P.; MURRAY, D.; MUNRO, J.; WHEELER, W.C.; SCHIFF, N.; SHARKEY, M. Evolution of the hymenopteran megaradiation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 60, p.73-88, 2011.

HESAMI, S.; EBRAHIM, E.; OSTOVAN, H.; SHOJAI, M.; KAMALI, K; YEFREMOVA, Z; YEGORENKOVA, E. Contribution to the study of Eulophidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) of fars province of Iran: I Subfamilies Entedoninae and Tetrastichinae. **Munis Entomology Zoology**, v. 5, p. 157, 2010.

- LA SALLE, J. & GAULD, I. D. Parasitic Hymenoptera and biodiversity crisis. **Redia, Firenze**, v. 74, p. 315-334, 1992.
- LENTEREN, J.C. van. Improving the reliability of biological control by applying quality control of natural enemies. **Bulletin OILB-SROP**, v.16, p. 85-88. 1992a.
- LENTEREN, J.C. van. Quality control for natural enemies used in greenhouses. **Bulletin OILB-SROP**, v.16, p. 89-92. 1992b.
- LENTEREN, J.C. van. **Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures**. CABI Publishing, 2003.315 págs.
- LENTEREN, J.C. van. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl**, v. 57, p. 1-20, 2012.
- LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p.2453-2465. 2002.
- LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; NEVO, E. Microsatellites within genes: Structure, function and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v.21, p.991-1007. 2004.
- MACKAUER, M. Genetic problems in the production of biological control agents. **Annues Revist Entomology**, v. 21, p. 369-385. 1976.
- MELO, R. L.; PRATISSOLI, D.; POLANCZYK, R. A.; TAVARES, M.; MILANEZ, A. M.; MELO, D. F. Ocorrência de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera.: Eulophidae) em broca-das-cucurbitáceas, no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 228- 230, 2011.
- NOYES, J.S. 2003. Universal Chalcidoidea Database. Disponível em <http://www.nhm.ac.uk/entomology/chalcidoids/index.html> [acessada em 10.mar.2013].
- OLIVEIRA, M.A.S.; JUNQUEIRA, N.T.V.; ICUMA, I.M.; ALVES, R.T.; OLIVEIRA, J.N.S.; ANDRADE, G.A. **Incidência de danos da broca do fruto da graviola no Distrito Federal**. Planaltina: Embrapa Cerrados, n.51, 2001. (Comunicado Técnico Embrapa).
- PARRA, J.R.P. Criação massal de inimigos naturais. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Eds.). **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 143- 164.
- PARRA, J.R.P. & CÔNSOLI, F.L. Criação massal e controle de qualidade de parasitoides de ovos. In: BUENO, V.H.P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: Editora UFLA, 2009. p. 169-197.
- PARRA, J.R.P. Biological Control in Brazil: An overview. **Scientia Agricola**.v.71, p.345-355, 2014.

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

PASTORI, P.L., PEREIRA, F.F., ANDRADE, G.S., SILVA, R.O., ZANUNCIO, J.C., PEREIRA, A.I.A. Reproduction of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) in pupae of two lepidopterans defoliators of eucalypt. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 38, p. 91-93, 2012.

PASTORI, P. L.; PEREIRA, F. F.; PRATISSOLI, D.; ZANUNCIO, J. C.; OLIVEIRA, F. A. L.; ZAIDAN, U. R.. Dispersão de *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu (Hymenoptera: Eulophidae) em plantio de cana-de-açúcar. **Agrária**, v. 8, p. 85-89, 2013.

PEREIRA, F.F.; ZANUNCIO, J.C.; TAVARES, M.T.; PASTORI, P.L.; JACQUES, G.C. & VILELA, E.F. New Record of *Trichospilus diatraeae* as a Parasitoid of the Eucalypt Defoliator *Thyrinteina arnobia* in Brazil. **Phytoparasitica**, v.36, p. 304-306, 2008.

PRATISSOLI, D.; ZANUNCIO, J.C.; VIANNA, U.R.; ANDRADE, J.S.; PINON, T.B.M.; ANDRADE, G.S. Thermal requirements *Trichogramma pretiosum* and *T. acacioi* (Hym.: Trichogrammatidae), Parasitoids of the avocado defoliator *Nipteria panacea* (Lep.: Geometridae), in eggs two alternative hosts. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 523-529, 2005.

PREZOTTI, L. & PARRA, J.R.P. Controle de qualidade em criações massais de parasitoides e predadores. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Eds.). **Controle Biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 295-311.

PREZOTTI, L.; PARRA, J.R.; VENCOVSKY, R.; COELHO, A.S.G.; CRUZ, I. Effect of the size of the founder population on the quality of sexual populations of *Trichogramma pretiosum*, in laboratory. **Biological Control**, v. 30, p. 174-180, 2004.

RADCLIFFE, E.B., HUTCHISON, W.D., CANCELADO, R.E. **Integrated Pest Management: Concepts, Tactics, Strategies and Case Studies**. Cambridge University Press. 2008. 385págs.

RODRIGUES, M.A.T.; PEREIRA, F.F.; KASSAB, O.; PASTORI, P.L.; GLAESER, D.F.; OLIVEIRA, H.N.; ZANUNCIO, J.C. Thermal requirements and generation estimates of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) in sugarcane producing regions of Brasil. **The Florida Entomologist**, v. 96, p. 154-159, 2013.

SILVA-TORRES, C.A; BARROS, R.; TORRES, J.B. Efeito da idade, fotoperíodo e disponibilidade de hospedeiro no comportamento de parasitismo de *Oomyzus sokolowskii* Kurdjumov (Hymenoptera: Eulophidae). **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 512-519, 2009.

SILVA-TORRES, C.S.A.; PONTES, I.V.A.F.; TORRES, J.B.; BARROS, R. New records of natural enemies of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) in Pernambuco, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 39, p. 835-838, 2010.

SØRENSEN, J.G.; ADDISON, M.F.; TERBLANCHE, J.S. Mass-rearing of insects for pest management: Challenges, synergies and advances from evolutionary physiology. **Crop Protection**, v. 38, p. 87-94, 2012.

SCHROEDER, H.; HOELTKEN, A.M.; FLADUNG, M. Differentiation of *Populus* species using chloroplast single nucleotide polymorphism (SNP) markers—essential for comprehensible and reliable poplar breeding. **Plant Biology**, v. 14, p.374–381, 2012.

TALBOT, P.; THOMPSON, S.L.; SCHROEDER, W.; ISABEL, N. An efficient single nucleotide polymorphism assay to diagnose the genomic identity of poplar species and hybrids on the Canadian prairies. **Canadian Journal For Research**, v. 41, p.1102–1111, 2011.

UBAIDILLA, H.R. Eulophine parasitoids of the genus *Trichospilus* in Indonesia, with the description of two new species (Hymenoptera: Eulophidae). **Entomology Science**; v. 9, p.217-222, 2006.

VARGAS, E. L.; PEREIRA, F. F.; GLAESER, D.F; CALADO, V. R. F.; OLIVEIRA, F. G.; PASTORI, P. L. Searching and parasitism of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) by *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae). **Acta Biologica Colombiana**, v. 18, p. 259-264, 2013.

VREYSEN, M.J.B. & ROBINSON, A.S. Ionising radiation and area-wide management of insect pests to promote sustainable agriculture. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 1, p. 1-18, 2010.

ZACHÉ, B.; WILCKEN, C.F., DACOSTA, R.R., SOLIMAN, E.P. *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae), a new parasitoid of *Melanolophia consimilaria* (Lepidoptera: Geometridae). **Phytoparasitica**. v.38, n.3, p.355-357, 2010a.

ZACHÉ, B., WILCKEN, C.F., ZACHÉ, R.R.C., SOLIMAN, E.P.; SAN ROMAN, M.L.L. *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae), un nuevo parasitoide de *Hypsipyla grandella* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae). **Idesia**, v. 28, p.111-114, 2010b.

ZACHÉ, B., ZACHÉ, R.R.C.; SOLIMAN, E.P. & WILCKEN, C.F. Evaluation of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) as parasitoid of the eucalyptus defoliator *Euselasia eucerus* (Lepidoptera: Riodinidae). **International Journal Tropical Insect Science**, v.31, p.118-121. 2011a.

ZACHÉ, B., ZACHÉ, R.R.C., SOUZA, N.M.; DIAS, T.K.R. & WILCKEN, C.F. 2011b. New record of *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Sarsina violascens* (Herrich-Schaeffer, 1856) (Lepidoptera: Lymantriidae) in Brazil. **Journal Plant Protection Resistance**, v. 51, p.420-422, 2011b.

ZACHÉ, B., WILCKEN, C.F., ZACHÉ, R.R.C. & SOUZA, N.M. Novo registro de *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae), como parasitoide de *Spodoptera cosmioides* Walker, 1858 (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Biota Neotropica**, v. 12, p. 319-322, 2012.

YOUNG, N.D. Applications of DNA markers to the study of plant growth and development. **Plant Growth Regulation**, v.12 p.229-236. 1993.

CAPÍTULO I

Avaliação das características biológicas de *Trichospilus diatraeae* e de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) criados em *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) por sucessivas gerações

Avaliação das características biológicas de *Trichospilus diatraeae* e de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) criados em *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) por sucessivas gerações

RESUMO: O sucesso do controle biológico com parasitoides está relacionado com a qualidade na produção massal desses inimigos naturais. As características biológicas de *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu e *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) multiplicados por 20 gerações sucessivas em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) foram avaliadas. Cada pupa de *D. saccharalis* foi individualizada em tubo de vidro (16 x 100 mm) e exposta ao parasitismo por sete fêmeas de *T. diatraeae* e de *P. elaeisis* por 24h a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h, para compor a geração F1 de *T. diatraeae* e *P. elaeisis*. Esse procedimento foi repetido sucessivamente até a geração F20 de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* em pupas de *D. saccharalis*. A criação de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* em pupas de *D. saccharalis* por 20 gerações sucessivas não afetou o parasitismo e a razão sexual de seus descendentes. Houve variações na progênie, porém o ciclo de vida, a longevidade e o tamanho da cápsula cefálica dos parasitoides se mantiveram em níveis bons, ou seja, ausência de reduções drásticas das variáveis biológicas.

Palavras-chave: controle de qualidade; criação de laboratório; controle biológico; desempenho reprodutivo.

ABSTRACT: The success of biological control with parasitoids associated with quality in mass production of these natural enemies. The biological characteristics of *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu e *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) were evaluated. Each pupa *D. saccharalis* was individualized in glass tube (16 x 100 mm) and exposed to parasitism by seven females of *T. diatraeae* and *P. elaeisis* for 24 hours at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, relative humidity of $60 \pm 10\%$ and photoperiod 14h, to compose the F1 generation of *T. diatraeae* and *P. elaeisis*. The creation of *T. diatraeae* and *P. elaeisis* in pupae of *D. saccharalis* for 20 successive generations did not affect parasitism and the sex ratio of their offspring. There were variations in the progeny, but the life cycle, longevity and the size of the head capsule of parasitoids remained at good levels, ie absence of drastic reductions in biological variables.

Keywords: quality control; creation of laboratory; biological control; reproductive performance.

1. INTRODUÇÃO

O uso de parasitoides como ferramenta para o controle de pragas exige que os mesmos sejam multiplicados em grandes quantidades (PARRA e CÔNSOLI, 2009). Entre os insetos há diferentes modos reprodutivos e que têm consequências importantes pelas quais as características biológicas são herdadas. Portanto a criação de inimigos naturais em laboratório pode favorecer a maior produção de indivíduos homozigóticos por meio da endogamia, em relação às populações de ambientes naturais e em muitos casos, esses indivíduos possuem caracteres indesejáveis (MACKAUER, 1972; SØRENSEN et al., 2012).

Populações de parasitoides mantidos em laboratório durante muitas gerações podem sofrer alterações genéticas por constituírem apenas uma pequena amostra da variabilidade genética presente na espécie e, portanto, os parasitoides podem não se adaptar à criação em laboratório (van LENTREN, 1992, van LENTREN, 2003; BEUKEBOOM & ZWAAN, 2005; DIAS et al., 2008).

A degeneração das criações de insetos em laboratório é percebida pela ocorrência de alterações no tamanho, no período de desenvolvimento, na fecundidade, na razão sexual, longevidade e no comportamento do parasitoide (VINSON e IWANTSCH, 1980).

O controle de qualidade de parasitoides é realizado através da avaliação de características biológicas expressas por esses inimigos naturais após sucessivas gerações. Dentre os caracteres avaliados, citam-se o número de descendentes, razão sexual, fecundidade, longevidade, tamanho do adulto, envergadura da asa, atividade de vôo e desempenho em campo (van LENTREN, 1992, van LENTREN 2003; DAHA, 2011; RULL et al., 2012).

O potencial do parasitoide está ligado à qualidade do seu hospedeiro, pois o consumo e utilização do alimento constituem condição básica para o seu desenvolvimento e reprodução uma vez que a quantidade e qualidade do alimento utilizado na fase larval afeta o desempenho reprodutivo dos adultos (GODFRAY, 1994; DAHA, 2011; SIMÕES et al., 2012; WANG et al., 2014).

A capacidade reprodutiva de *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae) foi avaliada em pupas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818, (Lepidoptera: Erebidae), *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797), *Heliothis virescens* Fabricius, 1781 (Lepidoptera: Noctuidae), *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782)

(Lepidoptera: Geometridae), *Hylesia paulex* Hübner, 1820 (Lepidoptera: Sartuniidae) e *Spodoptera cosmioides* Walker, 1858, *Bombyx mori* Linnaeus, 1775 (Lepidoptera: Noctuidae) (PARON & BERTI FILHO, 2000; PASTORI et al., 2012; ZACHÉ et al., 2012, CALADO et al., 2014).

Estudou-se a preferência de oviposição de *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle, 1993 (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Eribidae), *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) (BITTENCOURT & BERTI FILHO, 1999, CHICHERA et al., 2012) e também sua capacidade reprodutiva foi avaliada em pupas de *Bombyx mori* Linnaeus, 1758, (Lepidoptera: Bombycidae) e *T. arnobia* (PEREIRA et al. 2009, PEREIRA et al. 2010).

A criação massal é a etapa inicial para o uso de parasitoides no controle biológico. Esse processo depende do seu desenvolvimento adequado para obtenção de inimigos naturais com qualidade comparados ao encontrado na natureza (PRATISSOLI et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar as características biológicas de *T. diatraeae* e de *P. elaeisis* criados por 20 gerações sucessivas em pupas de *D. saccharalis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia Controle Biológico (LECOBIOL) da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) em Dourados, Mato Grosso do Sul.

Criação do hospedeiro *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae).

O hospedeiro *D. saccharalis* foi criado para multiplicação e manutenção das populações dos parasitoides *T. diatraeae* e *P. elaeisis* por vinte gerações. Pupas de *D. saccharalis* cedidas pela empresa BUG – Agentes Biológicos foram separadas por sexo e colocadas em gaiolas de PVC (100 x 220 mm) para a formação de adultos. Essas gaiolas contendo 20 machos e 30 fêmeas desse lepidóptero foram revestidas internamente com folhas de papel sulfite umedecido, onde as fêmeas, após o acasalamento, ovipositaram. As folhas de papel sulfite contendo os ovos foram imersas em água e sulfato de cobre (1,0%) durante dois minutos para desinfecção e colocadas para secar em varais. Depois de seco, o papel foi recortado de acordo com os espaços em que os ovos se encontravam e colocado em placas de Petri contendo um chumaço de algodão umedecido em sulfato de cobre, para evitar o ressecamento e contaminação dos

ovos. Próximo à eclosão das lagartas de *D. saccharalis* (ovos escurecidos), as posturas foram colocadas em frascos de vidro (500 mL) vedados contendo dieta artificial modificada de Hensley e Hammond (1968), a base de farelo de soja, germe de trigo, vitaminas e sais minerais. Após a inoculação dos ovos, os frascos foram acondicionados em estantes de aço e mantidos em sala climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12h. Ao atingir o terceiro ínstar, as lagartas foram transferidas para placas de Petri descartáveis (60 x 16 mm) contendo dieta de realimentação (semelhante a dieta de alimentação, exceto pela adição de ácido acético e remoção de sais de Wesson e germe de trigo), onde permaneceram até a formação de pupas (GARCIA et al., 2009).

Criação de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae).

A criação de *T. diatraeae* no LECOBIOLOG iniciou-se em agosto de 2007 em pupas de *T. molitor*, cuja população inicial foi proveniente de pupas de *T. arnobia* coletada em Viçosa, Minas Gerais (PEREIRA et al. 2008).

Os adultos de *T. diatraeae* foram mantidos em tubos de vidro (14,0 x 2,2 cm) fechados com algodão e alimentados com uma gota de mel. Pupas de *D. saccharalis* com 24 a 48 horas de idade foram expostas ao parasitismo por 24 horas para manutenção da criação. Após esse período, as pupas foram individualizadas em tubos de vidro e mantidas em câmara climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14 horas, até a emergência de adultos (PARON & BERTI FILHO, 2000; FAVERO et al., 2013).

Criação de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae).

A criação de *P. elaeisis* no LECOBIOLOG iniciou-se em agosto de 2007 em pupas de *T. molitor*, cuja população inicial foi proveniente de pupas de *T. arnobia* e que estava sendo criada anteriormente em pupas de *A. gemmatalis* e *B. mori* em Viçosa, Minas Gerais (PEREIRA et al. 2008).

Os adultos de *P. elaeisis* foram mantidos em tubos de vidro (14,0 x 2,2 cm) fechados com algodão e alimentados com uma gota de mel. Pupas de *D. saccharalis* com 24 a 48 horas de idade foram expostas ao parasitismo por 72 horas para manutenção da criação. Após esse período, as pupas foram individualizadas em tubos de vidro e mantidas em câmara climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14 horas, até a emergência de adultos (PERREIRA et al., 2008, CHICHEIRA et al., 2012).

Desenvolvimento Experimental.

Os parasitoides *T. diatraeae* e *P. elaeisis* foram criados por três gerações em pupas de *A. gemmatalis* (hospedeiro neutro para eliminar um possível condicionamento pré-imaginal ao hospedeiro de criação). Sete fêmeas de cada espécie descendentes emergidas da pupa de *A. gemmatalis* foram selecionadas ao acaso e individualizadas em tubos de vidro, cada uma com uma pupa de *D. saccharalis* nas condições $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa do ar e fotofase de 14 horas, para compor a geração F1 de *T. diatraeae* e de *P. elaeisis*. Esse procedimento foi repetido sucessivamente até a geração F20 de *T. diatraeae* e de *P. elaeisis* em pupas de *D. saccharalis*.

As características biológicas avaliadas para cada uma das gerações (F1, F5, F10, F15 e F20) foram: a porcentagem de pupas parasitadas [(número de pupas de *D. saccharalis* com emergência de parasitoides + pupas sem emergência de adultos de *D. saccharalis*)/(número total de pupas) $\times 100$]; porcentagem de pupas com emergência de parasitoides [(número de pupas de *D. saccharalis* com emergência de adultos dos parasitoides)/(número de pupas parasitadas) $\times 100$]; a progênie (número de parasitoides emergidos por pupa de *D. saccharalis*); a duração do ciclo vida (ovo-adulto) (dias); a longevidade média em dias (para avaliação dessa variável foram selecionados ao acaso 20 fêmeas e 10 machos de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* de cada tratamento, sendo esses parasitoides no dia de sua emergência, individualizados em tubos de ensaio contendo uma gota de mel, onde permaneceram até a sua morte); o tamanho da cápsula cefálica (para avaliação dessa característica foram escolhidos ao acaso em cada tratamento, 15 fêmeas e 15 machos de *T. diatraeae* e *P. elaeisis*, visando medir a largura da cápsula cefálica em ocular micrométrica) e a razão sexual (RS= número de fêmeas/ número de adultos) de *T. diatraeae* e *P. elaeisis*.

O sexo dos adultos de *T. diatraeae* e de *P. elaeisis* foi determinado de acordo com as características morfológicas da antena e do abdome (PARON, 1999; DELVARE & LASALLE, 1993). A mortalidade natural do hospedeiro foi corrigida pela fórmula de Abbott (1925) nas condições do experimento, com pupas de *D. saccharalis* individualizadas em tubos de vidro (16 x 100 mm) sem parasitoides.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos (gerações avaliadas do parasitoide) e 12 repetições, onde cada repetição foi constituído por um grupo de quatro pupas, totalizando quarenta pupas para cada espécie de parasitoide. Os dados das características biológicas avaliadas foram submetidos à análise de variância e quando significativo a 5% de probabilidade foi realizado o Teste

Scott-Knott. Esse teste foi escolhido, pois os dados não se ajustaram a modelos de regressão que explicassem os dados biológicos.

3. RESULTADOS

***Trichospilus diatraeae* criados em pupas de *Diatraea saccharalis* por vinte gerações em laboratório**

O período para obtenção de 20 gerações de *T. diatraeae* em pupas de *D. saccharalis* foi de 15 meses. A porcentagem de parasitismo não foi afetada pelo número de gerações avaliadas de *T. diatraeae* em pupas de *D. saccharalis*, apresentando média de $100,00 \pm 0,00$ ($p > 0,05$) (Tabela 1). A porcentagem de emergência de *T. diatraeae* após 20 gerações consecutivas foi influenciada com média acima de $87,50 \pm 0,21$ (F15) ($F= 0,00009$; $p= 0,0000$) (Tabela 1). A duração do ciclo (ovo-adulto) de *T. diatraeae* criado por vinte gerações sucessivas em pupas de *D. saccharalis* variou de $17,30 \pm 3,48$ (F1) a $18,03 \pm 0,08$ dias (F20) ($F= 0,0009$; $p= 0,0000$) (Tabela 1).

A progênie em todas as gerações apresentaram valores menores quando comparada com a primeira geração, sendo observada uma oscilação entre $143,05 \pm 43,36$ (F15) e $193,45 \pm 30,88$ (F20) indivíduos ($F= 43,096$, $p= 0,0001$) (Tabela 1).

A longevidade de machos e de fêmeas de *T. diatraeae* variaram durante as gerações com $9, 45 \pm 2,88$ (F20) a $19,55 \pm 6,79$ dias (F5) ($F= 10,243$; $p= 0,0000$) e $10,45 \pm 3,12$ (F20) a $27,20 \pm 5,36$ dias (F5) ($F= 15,345$; $p= 0,0000$), respectivamente. O tamanho da cápsula cefálica de *T. diatraeae* variou de $0,38 \pm 0,01$ a $0,43 \pm 0,01$ mm para fêmeas e de $0,29 \pm 0,01$ a $0,31 \pm 0,01$ mm para machos (Tabela 1).

A razão sexual de *T. diatraeae* em pupas de *D. saccharalis* durante as vinte gerações variou de $0,77 \pm 0,19$ (F15) a $0,89 \pm 0,01$ (F20) ($F= 0,0009$; $p= 0,0000$) (Tabela 1).

***Palmistichus elaeisis* criados em pupas de *Diatraea saccharalis* por vinte gerações em laboratório.**

O período para obtenção de 20 gerações de *P. elaeisis* em pupas de *D. saccharalis* foi de 17 meses.

O parasitismo variou pelo número de gerações avaliadas de *P. elaeisis* em pupas de *D. saccharalis*, apresentando médias de $97,50 \pm 0,08$ (F20) a $100,00 \pm 0,00$ (F10) ($p > 0,05$) (Tabela 2). Observaram-se diferenças significativas na emergência desse parasitoide em 20 gerações consecutivas com média de $97,50 \pm 0,08$ (F1) a $100 \pm 0,00$ (F15) ($F= 0,0009$; $p= 0,0000$) de *P. elaeisis* (Tabela 2). A duração do ciclo (ovo-adulto)

de *P. elaeisis* criado por gerações sucessivas em pupas de *D. saccharalis* variou de $21,05 \pm 3,48$ (F1) a $22,15 \pm 0,83$ dias (F15) ($F= 0,0009$; $p= 0,0000$) (Tabela 2).

A progênie em todas as gerações oscilou entre uma geração a outra apresentaram valores maiores quando comparada com a primeira e décima geração, com valores entre $120,13 \pm 20,07$ (F10) e $167,53 \pm 29,88$ (F15) ($F= 0,0018$; $p= 0,0000$) indivíduos (Tabela 2).

A longevidade de machos e de fêmeas de *P. elaeisis* variaram durante as gerações com médias entre $15,80 \pm 4,29$ (F5) a $38,80 \pm 5,35$ dias (F15) ($F=11,567$; $p= 0,0000$) e $10,50 \pm 2,33$ (F5) a $37,75 \pm 3,91$ dias (F15) ($F= 10,789$; $p= 0,0000$), respectivamente. O tamanho da cápsula cefálica de *P. elaeisis* variou de $0,49 \pm 0,01$ a $0,53 \pm 0,01$ mm para fêmeas e de $0,39 \pm 0,01$ a $0,42 \pm 0,01$ mm para machos (Tabela 2).

A razão sexual de *P. elaeisis* em pupas de *D. saccharalis* durante as vinte gerações variou de $0,83 \pm 0,09$ (F5) a $0,88 \pm 0,01$ (F15) (Tabela 2).

4. DISCUSSÃO

A taxa de parasitismo foi alta para *T. diatraeae* e *P. elaeisis* indicando a qualidade das criações das duas espécies em pupas de *D. saccharalis* por 20 gerações sucessivas. Esse valor alto pode estar relacionado a qualidade do hospedeiro que favoreceu sua multiplicação ao longo das gerações, como ocorreu em *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) (VARGAS, 2013).

O número de pupas com emergência de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* foram influenciados pelas sucessivas gerações, porém os valores passaram de 80% o que representa valores satisfatórios para ambas as espécies. Segundo DIAS et al. (2008) elevadas porcentagens de emergência em laboratório é uma característica favorável para produção e liberações massais de parasitoides.

O período de vida de um inseto pode ser dividido em duas fases: (a) o desenvolvimento: período de incubação e eclosão do ovo até emergência do adulto e (b) o período da vida adulta: longevidade de machos e fêmeas (BLACKBURN, 1991a, b).

O número geração no laboratório não interferiu no ciclo de vida de *T. diatraeae* com média de 19 dias. Também não foi observado interferência de sucessivas gerações no período de ovo-adulto de *P. elaeisis* que foi em média de 22 dias, o que demonstra que o hospedeiro e as gerações não interferiram no período de desenvolvimento em dias. Fato esse que não ocorreu em *T. howardi* em pupas de *D. saccharalis*, onde o hospedeiro interferiu no ciclo de vida do parasitoide devido a disponibilidade de

alimento do hospedeiro que pode prolongar ou reduzir o período ovo-adulto (VARGAS, 2013).

A longevidade, como fecundidade, é uma característica altamente variável entre as espécies, influenciada por uma série de fatores físicos e bióticos e pode ser entendida como um indicador de boa saúde ou condição em animais em laboratório (JERVIS et al., 2005, MASON, 2010). A longevidade de machos e fêmeas de *T. diatraeae* foi diferente durante as gerações, o mesmo ocorreu com tempo de vida dos adultos de *P. elaeisis*, isso pode estar relacionado ao fato de ser criado por um longo tempo no mesmo hospedeiro, pois ele não só afeta o desenvolvimento na fase imatura do parasitoide, mas também pode afetar o seu comportamento e fisiologia na fase adulta (MEHRNEJAD, 2003).

O índice de emergência da progênie variou entre as populações das duas espécies de parasitoides, onde a progênie de *T. diatraeae* apresentou uma diminuição após as primeiras gerações em laboratório. O tamanho e a quantidade de ovos de uma fêmea pode alterar durante sua vida. GIRON & CASAS (2003), demonstraram que *Eupelmus vuilletti* reduz o tamanho e quantidade ovo com o tempo, há uma diminuição marcada na reprodução no investimento ao tamanho do ovo e açúcar, proteínas, lipídios e conteúdo energético. Além disso, a produção de progênie depende do grau de competição entre irmãos em desenvolvimento dentro de um hospedeiro compartilhado (HARVEY et al., 1994, JERVIS et al., 2005). Já a progênie de *P. elaeisis* observou-se um pequeno aumento comparado à primeira geração, isso acontece porque o parasitoide necessita de um período para adaptar-se às novas condições e expressar suas características biológicas (PREZOTTI & PARRA, 2002).

A razão sexual de *T. diatraeae* e de *P. elaeisis* em pupas de *D. saccharalis* durante as vintes gerações apresentaram valores semelhantes e elevados, o que demonstra que mesmo com endogamia há uma alta produção de fêmeas férteis (Tabela 1 e 2). Fêmeas parasitoides são as principais responsáveis pelo parasitismo e pela produção de descendentes (MATOS NETO et al., 2004). E a obtenção de um elevado número de fêmeas na progênie é importante para sistemas de criação massal, experimentos de laboratórios e seleção de indivíduos para liberação no campo (AMALIN et al., 2005, JERVIS et al., 2005, VREYSEN & ROBINSON, 2010). Além disso, a razão sexual favorece a retenção dos parasitoides no campo e alta proporção de fêmeas nas liberações é um importante fator para um controle eficiente, pois as mesmas são

responsáveis pelo parasitismo (CAMPOS-FARINHA et al., 2000; VACARI et al., 2012).

A variação do tamanho da cápsula cefálica observado foi maior nas fêmeas do que nos machos das duas espécies de parasitoides. Isso pode ser devido às fêmeas parasitoides serem mais exigentes nutricionalmente do que os machos (GODFRAY, 1994; LI e SUN, 2011). Podendo considerar que fêmeas maiores são melhores para manutenção da criação de *T. diatraeae* e *P. elaeisis*.

Como uma das medidas para manter a qualidade da população, é de manter linhagens separadas no laboratório para um posterior cruzamento e multiplicar os parasitoides em diferentes espécies de hospedeiros (van LENTEREN, 2009; VARGAS, 2013, GLAESER et al. 2014).

A criação de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* em pupas de *D. saccharalis* por 20 gerações sucessivas não afetou o parasitismo e a razão sexual de seus descendentes. Houve variações na progênie. As demais características biológicas como o ciclo de vida, a longevidade e o tamanho da cápsula cefálica dos parasitoides não foram comprometidos com as sucessivas gerações, ou seja, ausência de reduções drásticas das variáveis biológicas.

5. CONCLUSÃO

A criação de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* em pupas de *D. saccharalis* por 20 gerações sucessivas sofreu variações na progênie, apesar disto, as demais características estudadas não sofreram reduções drásticas.

6. AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo. Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento de Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), pelo auxílio financeiro para a execução deste trabalho.

7. REFERÊNCIAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal Economy Entomology*, v. 18, p. 265-267, 1925.

AMALIN, D. M., PENA, J. E., DUNCAN, R. E. Effects of host age, female parasitoid age, and host plant on parasitism of *Ceratogramma etiennei* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Florida Entomologist**, v.88, n.1, p. 77-82, 2005.

- BITTENCOURT, M.A.L. & BERTI-FILHO, E. Desenvolvimento dos estágios imaturos de *Palmistichus elaeisis* Delvare e LaSalle (Hymenoptera, Eulophidae) em pupas de Lepidoptera. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.48, p.65-68, 2004.
- BLACKBURN, T.M. A comparative examination of lifespan and fecundity in parasitoid Hymenoptera. **Journal of Animal Ecology**, 60, 151–64. 1991a.
- BLACKBURN, T.M. Evidence for a fast-slow continuum of life-history traits among parasitoid Hymenoptera. **Functional Ecology**, 5, 65–74. 1991b.
- BUEKEBOOM, L.W.; ZWAAN, B.J. Genetics. In: Jervis, M. A.. (Eds.). **Insects as Natural Enemies: A Practical Perspective**, Springer, Netherlands, 2005. p.167-201.
- CAMPOS-FARINHA, A.E.C.; CHAUD-NETTO, J.; GOBBI, N. Biologia reprodutiva de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). IV. Discriminação entre lagartas parasitas e não parasitadas de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae) tempo de desenvolvimento e razão sexual dos parasitoides. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, p. 229-234, 2000.
- CHICHERA, R.A.; PEREIRA, F.F.; KASSAB, S.O.; BARBOSA, R.H.; PASTORI, P. L.; ROSSONI, C. Capacidade de busca de *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Interciencia**, v. 37, p. 852-856, 2012.
- DAHA, L. Parasitoid Quality of *Gronotoma micromorpha* Parasitizing *Liriomyza huidobrensis* on Chinese Cabbage and Soybean. **Journal of Biosciences**, v. 18, p. 113-117, 2011.
- DELVARE, G. & LASALLE, J. A new genus of Tetrastichinae (Hymenoptera: Eulophidae) from the Neotropical Region, with the description of a new species parasitic on key pests of oil palm. **Journal of Natural History**, v. 27, p.435-444, 1993.
- DIAS, N.S.; PARRA, J.R.P.; LIMA, T.C.C. Seleção de hospedeiro alternativo para três espécies de tricogramatídeos neotropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1467-1473, 2008.
- FAVERO, K; PEREIRA, F.F.; KASSAB, S.O; OLIVEIRA, H.N.; COSTA,D.P.; ZANUNCIO; J.C. Biological Characteristics of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) Progeny Are Influenced by the Number of Females Exposed per Pupa of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), **Florida Entomologist**, v. 96, p583-589, 2013.
- GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.; MACEDO, L.P.M. Criação do parasitoide *Cotesia flavipes* em laboratório. In: BUENO, V.H.P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: Editora UFLA, 2009. p. 199-219.
- GIRON, D. & CASAS, J. Mothers reduce egg provisioning with age. **Ecology Letters**, 6, 271–7., 2003.
- GLAESER, D. F.; PEREIRA, F. F.; VARGAS, E. L.; CALADO, V. R. F.; FAVERO, K. Desempenho reprodutivo de *Trichospilus diatraeae* no hospedeiro natural *Diatraea saccharalis* três gerações no hospedeiro alternativo *Tenebrio molitor*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, p. 213-218, 2014.

- GODFRAY, H.C.J. **Parasitoids, Behavioral and Evolutionary Ecology**. Princeton: University Press, 1994. 473p.
- HARVEY, J.A.; HARVEY, I.F.; THOMPSON, D.J. Flexible larval growth allows use of a range of host sizes by parasitoid wasp. **Ecology**, v. 75, p. 1420-1428, 1994.
- JERVIS, M.A.; COPLAND, M.J.W.; HARVEY, J.A. The Life-cycle. In: Jervis, M. A.. (Eds.). **Insects as Natural Enemies: A Practical Perspective**, Springer, Netherlands, p.73-165, 2005.
- LI, L. & SUN, J. Host suitability of a gregarious parasitoid on beetle hosts: flexibility between fitness of adult and offspring. **PLoS ONE**, v. 6, p. 1-6, 2011.
- LENTEREN, J.C. van. Quality control for natural enemies used in greenhouses. **Bulletin OILB-SROP**, v.16, p. 89-92. 1992.
- LENTEREN, J.C. van. **Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures**. CABI Publishing, 315 págs. 2003.
- LENTEREN, J.C. van. Controle de qualidade de agentes de controle biológico produzidos massalmente. In: BUENO, V.H.P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: Editora UFLA, 2005.p. 311-337.
- MACKAUER, M. Genetic problems in the production of biological control agents. **Annues Revist Entomology**. v.21, p. 369-385. 1972.
- MASON, G.J. Species differences in responses to captivity: stress, welfare and the comparative method. **Trends Ecology Evolutinary**. v.25, p. 713-721. 2010.
- MATOS NETO, F.C., CRUZ, I., ZANUNCIO, J.C., SILVA, C.H.O., PICANÇO, M.C. Parasitism by *Campoletis flavicincta* on *Spodoptera frugiperda* in corn. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 1077-1081, 2004.
- MEHRNEJAD, M.R. The influence of host species on some biological and behavioural aspects of *Dibrachys boarmiae* (Hymenoptera: Pteromalidae), a parasitoid of *Kermania pistaciella* (Lepidoptera: Tineidae). **Biocontrol Science and Technology**, v.13, p. 219–229, 2003.
- PARRA, J.R.P.; CÔNSOLI, F.L. Criação massal e controle de qualidade de parasitoides de ovos. In: BUENO, V.H.P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: Editora UFLA, 2009.p. 169-197.
- PARON, M. R. **Bioecologia de *Trichospilus diatraeae* Cherian & Maragabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae), endoparasitóide de Lepidoptera**. Tese (Doutorado em Entomologia) – 53p. 1999. Escola Superior “Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.
- PARON, M.R & BERTI-FILHO, E. Capacidade reprodutiva de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de diferentes hospedeiros (Lepidoptera). **Scientia Agrícola**, v. 57, p. 355-358, 2000.
- PASTORI, P.L., PEREIRA, F.F., ANDRADE, G.S., SILVA, R.O., ZANUNCIO, J.C., PEREIRA, A.I.A. Reproduction of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae)

in pupae of two lepidopterans defoliators of eucalypt. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 38, p. 91-93, 2012.

PEREIRA, F.F.; ZANUNCIO, J.C.; TAVARES, M.T.; PASTORI, P.L.; JACQUES, G.C. & VILELA, E.F. New Record of *Trichospilus diatraeae* as a Parasitoid of the Eucalypt Defoliator *Thyrintea arnobia* in Brazil. **Phytoparasitica**, v.36, p. 304-306, 2008

PEREIRA, F.F.; ZANUNCIO, J.C.; SERÃO, J.E.; PASTORI, P.L.; RAMALHO, F.S. Reproductive performance of *Palmistichus elaeisis* Delvare e La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) with previously refrigerated pupae of *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). **Brazilian Journal of Biology**, v.69, p.631-637, 2009.

PEREIRA, F.F.; ZANUNCIO, J.C.; OLIVEIRA, H.N.; GRANCE, E.L.V.; PASTORI, P.L.; GAVA-OLIVEIRA, M.D. Thermal requirements and estimate number of generations of *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) in different *Eucalyptus* plantations regions. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p. 431-436, 2010.

PRATISSOLI, D.; ZANUNCIO, J.C.; VIANNA, U.R.; ANDRADE, J.S.; PINON, T.B.M.; ANDRADE, G.S. Thermal requirements *Trichogramma pretiosum* and *T. acacioi* (Hym.: Trichogrammatidae), Parasitoids of the avocado defoliator *Nipteria panacea* (Lep.: Geometridae), in eggs two alternative hosts. **Brazilian Archive 37 Biology and Technology**, v. 48, p. 523-529, 2005.

PREZOTTI, L. & PARRA, J.R.P. Controle de qualidade em criações massais de parasitoides e predadores. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊAFERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Eds.). **Controle Biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002.p. 295-311.

RULL, J.; BIRKE, A.; ORTEGA, R.; MONTOYA, P.; LÓPEZ, L. Quantity and safety vs. quality and performance: conflicting interests during mass rearing and transport affect the efficiency of sterile insect technique programs. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 142, p. 78-86, 2012.

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

SØRENSEN, J.G.; ADDISON, M.F.; TERBLANCHE, J.S. Mass-rearing of insects for pest management: Challenges, synergies and advances from evolutionary physiology. **Crop Protection**, v. 38, p. 87-94, 2012.

VACARI, A.M.; DE BORTOLI, S.A.; BORBA, D.F.; MARTINS, M.I.E.G. Quality of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) reared at different host densities and the estimated cost of its commercial production. **Biological Control**, v. 63, p. 102-106, 2012.

VARGAS, E.L.; **Parasitismo e desenvolvimento de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em lagarta e pupa de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)**. 2013. 102f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS.

VREYSEN, M.J.B.& ROBINSON, A.S. Ionising radiation and area-wide management of insect pests to promote sustainable agriculture. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 1, p. 1-18, 2010.

VINSON, S.B. & IWANTSCH, G.F. Host suitability for insect parasitoids. **Annual Review of Entomology**, v. 25, p. 397-441, 1980.

ZACHÉ, B., WILCKEN, C.F., ZACHÉ, R.R.C. & SOUZA, N.M. Novo registro de *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae), como parasitoide de *Spodoptera cosmioides* Walker, 1858 (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Biota Neotropica**, v. 12, p. 319-322, 2012.

WANG, Z.Y.; HE, K.L; ZHANG, F.; LU, X.; BADENDREIER, D. Mass rearing and release of *Trichogramma* for biological control of insect pests of corn in China. **Biological Control**, v.68, p.136-144, 2014.

Tabela1. Média (\pm EP) das características biológicas de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Cramdicae) por 20 gerações em laboratório, a temperatura de $25\pm 2^\circ$, $70\pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14 horas.

Características biológicas	Gerações				
	1	5	10	15	20
Parasitismo (%)	$100 \pm 0,00ns^1$	$100 \pm 0,00ns$	$100 \pm 0,00ns$	$100 \pm 0,00ns$	$100 \pm 0,00ns$
Emergência (%)	$90,00 \pm 0,00a^2$	$92,50 \pm 0,16a$	$97,50 \pm 0,08a$	$87,50 \pm 0,21b$	$100 \pm 0,00a$
Duração do ciclo de vida (dias)	$17,30 \pm 3,48c$	$19,18 \pm 3,24a$	$19,75 \pm 1,51a$	$17,70 \pm 3,27c$	$18,03 \pm 0,08b$
Progênie por pupa	$407,53 \pm 78,06a$	$298,55 \pm 60,86b$	$214 \pm 24,45b$	$143,05 \pm 43,36c$	$193,45 \pm 30,88b$
Longevidade da fêmeas (dias)	$11,85 \pm 3,25c$	$27,20 \pm 5,36a$	$11,50 \pm 1,99c$	$19,85 \pm 7,91b$	$10,45 \pm 3,12d$
Longevidade de machos (dias)	$9,45 \pm 3,55c$	$19,55 \pm 6,79a$	$9,45 \pm 2,06c$	$17,25 \pm 8,64b$	$9,45 \pm 2,88c$
Razão sexual	$0,84 \pm 0,17a$	$0,85 \pm 0,16a$	$0,86 \pm 0,08a$	$0,77 \pm 0,19b$	$0,89 \pm 0,01a$
Cápsula cefálica de fêmeas (mm)	$0,43 \pm 0,01ns$	$0,41 \pm 0,01ns$	$0,38 \pm 0,01ns$	$0,42 \pm 0,01ns$	$0,42 \pm 0,01ns$
Cápsula cefálica de machos (mm)	$0,31 \pm 0,01ns$	$0,32 \pm 0,01ns$	$0,29 \pm 0,01ns$	$0,31 \pm 0,01ns$	$0,32 \pm 0,01ns$

¹ns= não significativo pelo teste F à 5%

²Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela-2: Média (\pm EP) das características biológicas de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Cramdicae) por 20 gerações em laboratório, a temperatura de $25\pm 2^\circ$, $70\pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14 horas.

Características biológicas	Gerações				
	1	5	10	15	20
Parasitismo	97,50 \pm 0,08ns ¹	97,50 \pm 0,08ns	100 \pm 0,00ns	100 \pm 0,00ns	97,50 \pm 0,08ns
Emergência	97,50 \pm 0,08ns	95,00 \pm 0,11ns	100 \pm 0,00ns	100 \pm 0,00ns	97,50 \pm 0,08ns
Duração do ciclo de vida (dias)	21,05 \pm 1,94ns	21,10 \pm 2,39ns	22,15 \pm 0,83ns	21,08 \pm 0,87ns	21,05 \pm 1,94ns
Progênie por pupa	139,15 \pm 18,11b ²	148,73 \pm 29,38a	120,13 \pm 20,07b	167,53 \pm 29,88a	139,15 \pm 18,11b
Longevidade de fêmeas (dias)	33,40 \pm 13,26b	15,80 \pm 4,29c	30,35 \pm 8,37b	38,80 \pm 5,35a	33,40 \pm 13,26b
Longevidade de machos (dias)	36,90 \pm 9,13a	10,50 \pm 2,33c	22,45 \pm 7,69b	37,75 \pm 3,91a	36,90 \pm 9,13a
Razão sexual	0,87 \pm 0,07ns	0,83 \pm 0,09ns	0,87 \pm 0,01ns	0,88 \pm 0,01ns	0,87 \pm 0,07ns
Cápsula cefálica de fêmeas (mm)	0,53 \pm 0,01ns	0,52 \pm 0,01ns	0,49 \pm 0,01ns	0,53 \pm 0,01ns	0,53 \pm 0,01ns
Cápsula cefálica de machos (mm)	0,42 \pm 0,01 ns	0,41 \pm 0,01ns	0,39 \pm 0,01ns	0,41 \pm 0,01ns	0,42 \pm 0,01ns

¹ns= não significativo pelo teste F à 5%

²Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

CAPÍTULO II

Avaliação de métodos de extração de DNA total de *Trichospilus diatreaea* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae)

Avaliação de métodos de extração de DNA total de *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae)

RESUMO: A extração de DNA é o primeiro passo em muitos estudos moleculares de insetos, uma variedade de métodos têm sido utilizados para isolar moléculas de DNA. Diferentes quantidades, 25, 50, 100 e 150 insetos de *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu e de *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) foram utilizadas para a extração do material genético por meio de dois métodos. A quantidade e qualidade do DNA para cada espécie de parasitoide foram avaliadas e as amostras foram submetidas à PCR. As concentrações (quantidade de DNA contida em 1µL da solução) e as razões entre as amostras testadas 260/280nm. As técnicas utilizadas e otimizadas mostraram que o protocolo A (Chelex[®]), resultou em material com quantidade e pureza satisfatórias para amplificação do DNA pela técnica da PCR para os parasitoides *T. diatraeae* e *P. elaeisis*. A qualidade do DNA extraído pelo protocolo A para aplicação molecular, proporcionou material genético suficiente para a PCR tal como demonstrado por as amplificações com os marcadores moleculares microssatélites neste estudo para *T. diatraeae* e *P. elaeisis*, fato esse que não ocorreu para as amostras de DNA de *P. elaeisis* extraídas pelo protocolo B, onde apesar de apresentar valores de concentração e razões altas não foi o suficiente para a técnica da PCR com os marcadores moleculares

Palavras-chave: criação de laboratório; parasitoides; análise molecular.

ABSTRACT: The extraction of DNA is the first step in many molecular studies of insects, one vareidade methods have been used to isolate DNA molecules. Different amounts, 25, 50, 100 and 150 of insects *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu and *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) were used for extraction of two protocols. We evaluated the quantity and quality of DNA for each species of parasitoid were and after the samples were subjected to PCR. The concentration (amount of DNA contained in the solution 1µL) and the ratios of the samples tested 260 / 280nm are shown in. The techniques used and optimized showed that the protocol resulted in material quantity and purity satisfactory for DNA amplification by PCR for parasitoids *T. diatraeae* and *P. elaeisis*. The quality of the DNA extracted by the protocol A to the molecular application, provided enough genetic material for PCR as shown by the microsatellite amplifications in this study to *T. diatraeae* and *P. elaeisis*, a fact that was not observed for the DNA samples *P. elaeisis* extracted by protocol B, where despite a high concentration values and reasons was not to the PCR technique with molecular markers

Keywords: laboratory creation; parasitoids; molecular analysis.

1. INTRODUÇÃO

Entre os insetos há diferentes modos reprodutivos e que têm consequências importantes pelas quais as características biológicas são herdadas. O conhecimento genético é necessário para interpretar a variação dessas características ao longo de sua vida. Um dos atributos biológicos importantes e que pode sofrer modificações no processo de criação dos insetos são os aspectos genéticos (MACKAUER, 1972; BEUKEBOOM & ZWAAN, 2005). A detecção da variabilidade genética em insetos é normalmente obtida a partir da genética molecular, utilizando técnicas para extrair o DNA e caracterizar tais genes por meio de marcadores moleculares.

O uso de parasitoides como ferramenta para o controle de pragas exige que os mesmos sejam multiplicados em grandes quantidades (PARRA & CÔNSOLI, 2009). Muitas características biológicas podem deteriorar-se rapidamente em criações massais, através de endogamia e quando os insetos são levados á campo o que poderá resultar em baixo desempenho, resultando em falhas no controle de pragas (BEUKEBOOM & ZWAAN, 2005, PREZOTTI e al. 2004, HERATY et al. 2011).

Trichospilus diatraeae Cherian & Margabandhu, 1942 e *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle, 1993 (Hymenoptera: Eulophidae) são endoparasitoides gregários de pupas têm sido relatado e estudado como agentes potenciais no controle biológico de pragas agrícolas e florestais (PEREIRA et al., 2008a; PEREIRA et al. 2008b; ZACHÉ et al., 2010a; 2010b, ZACHÉ et al., 2011 a; 2011b, MELO et al., 2011; PASTORI et al., 2012; ZACHÉ et al., 2012; VARGAS et al. 2013, PASTORI et al. 2013, FAVERO et al. 2013a, 2013b, BELLON et al. 2014, GLAESER et al. 2014, FAVERO et al. 2014).

As técnicas de otimização da extração de DNA para a utilização na reação da polimerização em cadeia (PCR) têm permitido a investigação de diferentes amostras biológicas mesmo quando o DNA está presente em pequenas quantidades (BUENO, 2004).

Extração de DNA é um passo da rotina em muitos estudos biológicos incluindo a identificação molecular, inferência filogenética, genética, e genômica (CHEN et al., 2010).Vários métodos de extração de DNA têm sido descritos para os diferentes grupos de organismos vivos e a preocupação mais importante sobre estes métodos têm sido a quantidade e integridade de DNA (GRACHEV et al., 2006; LEE & PRYS-JONES, 2008; OLIVEIRA et al., 2009)

A qualidade das amostras depende do material biológico, bem como em métodos a serem empregados. Um protocolo ideal de extração de DNA deve otimizar o rendimento, minimizar a degradação do DNA, e ser eficiente em termos de custo, tempo, trabalho e suprimentos (MARENGONI et al., 2006; CHEN et al., 2008; CHEN et al., 2010).

Otimizar técnicas para isolar e caracterizar o material genético por meio de marcadores moleculares podem ser uma ótima ferramenta para estudos a nível de gene em populações de parasitoides. Dentre as diversas fontes biológicas existentes para realizar uma extração de DNA, é importante salientar que para himenópteros endoparasitoides são escassos os estudos de isolamento do material genético. A utilização de protocolos eficientes é imprescindível para uma correta extração, amplificação e visualização do DNA do parasitoide. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar dois métodos de extração de DNA que apresentasse integridade e quantidade suficientes para posteriores análises moleculares para *T. diatraeae* e *P. elaeisis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Insetos de estudo

Diferentes quantidades (*pools*), 25, 50, 100 e 150 indivíduos adultos dos parasitoides (*T. diatraeae* e *P. elaeisis*) foram utilizadas para a extração. Os parasitoides foram obtidos da criação do Laboratório de Entomologia/Controle Biológico (LECOBIOL) da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Os procedimentos técnicos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia aplicada à Produção Animal, Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados (FCA/UFGD).

Os parasitoides foram contados e colocados em microtubos de 1,5 mL, eutanasiados em nitrogênio líquido (N₂) e identificados pela inicial **T** para *T. diatraeae* e **P** para *P. elaeisis*. O material para as análises foram preparados com três repetições para cada quantidade de indivíduos por espécie.

Extração de DNA

Os “*pools*” de insetos de diferentes quantidades das duas espécies, foram submetidas à extração do DNA utilizando-se os protocolos denominados abaixo como A (adaptado de WALSH et al., 1991) e B (adaptado de HAMZE et al., 2003), com ou sem maceração prévia do material biológico.

Protocolo A

Os parasitoides em diferentes quantidades (T25, T50, T100, T150 e P25, P50, P100 e P150) previamente macerados ou não foram colocados em microtubos e adicionado 200 μ L de Chelex[®] a 5 % e incubados a temperatura de 95 °C por 15 minutos, e em seguida, as amostras foram centrifugadas a velocidade de 14.000 rpm por 2 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo e posteriormente foram armazenadas em freezer -20 °C para as análises posteriores.

Protocolo B

Os parasitoides em diferentes quantidades (T25, T50, T100, T150 e P25, P50, P100 e P150) previamente macerados ou não, foram colocados em microtubos e em seguida adicionou-se 800 μ l de tampão de extração (para 10 ml de solução: 1,4 mol l⁻¹ NaCl/ 0,812g; 20mm EDTA/ 0,4ml 0,5 mol l⁻¹; 10mm Tris-HCl pH8,0 / 1ml 1 mol l⁻¹; 5% PVP 0,5 mg) e 16 μ l de β -mercaptoetanol, posteriormente incubados em banho-maria a 60 °C por 60 minutos, agitando as amostras a cada 10 minutos. Em seguida foram adicionados 600 μ L de CIA (clorofórmio: álcool isioamílico 24:1) e agitou-se durante 5 minutos e em seguida centrifugou por 6 minutos à 12.000 rpm. A fase aquosa foi retirada e colocada em outro microtubo de 1,5 ml. Posteriormente, 600 μ l de isopropanol gelado foram adicionados e microtubos foram agitados em vórtex por 5 minutos. As amostras foram incubadas à -20°C overnight. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado, 1 mL de etanol 70%; foi adicionado. A etapa de centrifugação foi novamente repetida por 2 minutos e o sobrenadante desprezado e os microtubos foram invertidos para a secagem (10 a 15 minutos). Finalmente, foram adicionados 50 μ L de TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA) pH 8,7 com RNase 10 μ g/ μ L(Promega) às amostras e posteriormente foram incubadas a 37°C por 1 hora e armazenados em freezer a -20 °C até o momento do uso.

Análise da quantidade e qualidade do DNA

A quantidade e a pureza do DNA total extraído a partir dos dois protocolos A e B foram avaliadas por meio de espectrofotometria com o equipamento NanoPhotometer[®] (Implen 300).

Além dessas análises, as amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2%, por 30 minutos a 120 V. O gel foi preparado com tampão TBE (1x) e corado com brometo de etídio. O DNA foi visualizado por meio de fotodocumentador (UVP) sob luz UV (Figura 1).

Os dados da quantidade e qualidade do DNA provenientes de cada espécie de parasitoide de cada procedimento de extração (Protocolos A e B) foram submetidos à análise de variância e quando significativo a 5% de probabilidade foi realizado o teste de Tukey.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para testar se as amostras de DNA extraídas eram provenientes de indivíduos da família Eulophidae foram submetidas à PCR, seguindo o protocolo de AEBI et al., 2004, com algumas adaptações. As sequências de oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizadas estão listadas na Tabela 1.

As amostras para reação de amplificação foram preparadas da seguinte forma: 25 μ L contendo: 12,5 μ L de PCR Master Mix (Thermo scientific), 10 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (Forward e Reverse) e 50 a 100ng de DNA genômico. As reações em cadeia pela polimerase foram realizadas em termociclador (BioRad[®]) e consistiu em pré-aquecimento de 94°C por quatro minutos antes da inicialização dos 30 ciclos, cada qual conduzido a 94°C por 45 segundos, 56°C por 55 segundos para o anelamento dos primers e extensão, a 72°C por 45 segundos catalizada pela atividade da DNA polimerase, e então uma extensão final por quatro minutos a 72°C. Para monitoramento das reações de amplificação, utilizou-se uma amostra controle negativo, onde o DNA foi substituído por igual volume de água ultrapura.

Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, a uma voltagem de 120 V, por 40 minutos. O gel foi preparado com tampão TBE (1x), corado com brometo de etídio. O marcador de peso molecular utilizado foi 100 pb DNA Ladder (Thermo Scientific[®]). Os produtos da PCR e o controle negativo foram submetidos à eletroforese em gel de agarose acrescidos do tampão de corrida. A banda de DNA foi visualizado gel e fotografado em fotodocumentador (UVP) sob luz UV.

3. RESULTADOS

As técnicas utilizadas e otimizadas mostraram que os dois protocolos A (Chelex[®]) e B, resultaram em material com quantidade e pureza satisfatórias para amplificação do DNA, independente da quantidade de indivíduos (Figura 1).

Em *T. diatraeae* as concentrações de DNA extraídas pelo protocolo A (Chelex[®]) foram de $450,01 \pm 58,20$ ng/ μ L com 25 indivíduos e $1421,01 \pm 201,06$ ng/ μ L com 150 indivíduos, com razões de pureza variando de $1,54 \pm 0,02$ a $1,63 \pm 0,07$. Para *P. elaeisis*, as amostras extraídas

pelo mesmo protocolo tiveram médias de quantidade de 528,33 ± 63,50 ng/μL com 25 indivíduos e 1462,02 ± 140,93 ng/μL com 150 parasitoides, com razões entre 1,13 ± 0,04 a 1,15 ± 0,01 (Tabela 1).

As médias de quantidade de DNA obtidas pelo protocolo B foram de 21,24 ± 9,62 ng/μL com 25 indivíduos e 29,40 ± 11,14 ng/μL com 150 indivíduos de *T. diatraeae*, com razões entre 1,18 ± 0,02 a 1,95 ± 0,02. Em *P. elaeisis* as concentrações foram de 101,20 ± 16,29 ng/μL com 25 indivíduos e 1375,67 ± 29,30 ng/μL com 150 parasitoides, a razão variou de 1,55 ± 0,02 a 1,90 ± 0,07 (Tabela 1).

Para a técnica de PCR com os marcadores moleculares, as amostras de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* foram amplificadas e houve formação de bandas (Figura 2), quando extraídas pelo protocolo A (Chelex®), porém não houve amplificação com os marcadores moleculares das amostras de *P. elaeisis* extraídas pelo protocolo B.

4. DISCUSSÃO

Os produtos de extração do protocolo A foi o que apresentou maiores quantidades de DNA (ng/μL) para os parasitoides *T. diatraeae* e *P. elaeisis* (Tabela 1). A técnica de isolar ácidos nucleicos de tecidos/células em quantidade, pureza e integridade suficientes é uma fase essencial na prática da biologia molecular. Para tecidos de origem animal, as taxas de rendimento de concentração típicos variam entre 100 - 5000 ng/mL (MOLECULAR RESEARCH CENTER, 2008).

Comparando os dois protocolos, o método do protocolo A, resultou em taxas mais altas de rendimento DNA e menos degradação para *T. diatraeae* e *P. elaeisis*, sendo que para o último os valores da razão não foram altos (1,13 ± 0,04 a 1,15 ± 0,01), independente da quantidade de indivíduos utilizados. Segundo WALKER & RAPLEY (1999) a quantidade, pureza e integridade do ácido nucleico extraído dependem de muitos fatores e têm uma grande influência no resultado das técnicas que serão nele aplicadas, como por exemplo, na PCR.

A análise da pureza do DNA baseia-se na propriedade da molécula de absorver radiação ultravioleta no comprimento de onda de 260 nm/280 nm, onde a razão entre 1,5 a 2,0 o DNA apresenta boa qualidade e integridade, o equipamento também fornece a quantidade de DNA em μg/μL determinar a concentração de DNA (ROHLAND, 2004). Segundo REGITANO et al. (2001) os valores de razão de absorbância inferiores a 1,8 resultam de contaminação do DNA com proteínas, podendo inviabilizar a amplificação por PCR. No entanto para LEE et al. (2010),

valores inferiores a 1,55, como obtidos no presente estudo, podem ser considerados satisfatórios para utilização em PCR.

A qualidade do DNA extraído pelo protocolo A para aplicação molecular, proporcionou material genético suficiente para a PCR tal como demonstrado pelas ampliações com os marcadores moleculares microssatélites utilizados neste estudo para *T. diatraeae* e *P. elaeisis* (Figura 5),

O DNA extraído pode ser influenciado por muitos fatores, tais como espécie estudada, tecido, método de preservação, processo de extração e método de precipitação (CHEN et al., 2010). Fato que ocorreu para as amostras de DNA de *P. elaeisis* extraídas pelo protocolo B, onde apesar de apresentar valores de concentração e razões altas não foi o suficiente para a técnica da PCR com os marcadores moleculares, isso pode estar ligado ao material genético extraído, ou até mesmo o inseto estudado, como por exemplo, a pigmentação e a quitina presente no exoesqueleto do parasitoide.

Ao observar os resultados os protocolos A e B, o primeiro se apresenta como alternativa viável para a extração de DNA a partir dos espécimes estudados. Ele apresenta algumas vantagens em relação aos protocolos convencionais, pois requer um número menor de centrifugações e lavagens, que se constituem em etapas que favorecem a introdução de contaminantes, além de ser de execução mais simples e rápida dispensando o uso de solventes orgânicos.

O aperfeiçoamento dos métodos de extração de DNA de himenópteros parasitoides auxilia uma execução mais simples e rápida na obtenção de amostras desses indivíduos em estudos retrospectivos.

5. CONCLUSÃO

O protocolo A é possível e viável de ser utilizada para a extração de DNA para parasitoides himenópteros.

A otimização desta técnica permitiu utilizar as amostras de DNA de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* na reação de PCR com marcadores moleculares.

6. AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo. Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Fundação de Apoio ao

Desenvolvimento de Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), pelo auxílio financeiro para a execução deste trabalho.

7. REFERÊNCIAS

AEBI, A.; ALVAREZ, N.; BUTCHER, D.J.; HANSSON, A.M.; RISTERUCCI, M.; BENREY, B. Microsatellite markers in a complex of *Horismenus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoids of bruchid beetles. **Molecular Ecology**, v. 4, p. 707-709, 2004.

BELLON, P. P.; OLIVEIRA, H. N. ; PEREIRA, F. F. Teste de voo como critério de avaliação da qualidade de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae). **Bioscience Journal**, v. 30, p. 582-584, 2014.

BUEKEBOOM, L.W.; ZWAAN, B.J. Genetics. In: Jervis, M. A.. (Eds.). **Insects as Natural Enemies: A Practical Perspective**, Springer, Netherlands, 2005.p.167-201.

BUENO, V. DNA e aperfeiçoamento das técnicas de extração. **Revista Brasileira de Hematologia**, v.26, p-233-234, 2004.

CHEN, M.; ZHU, Y.; TAO, J.; LUO, Y. Methodological comparison of DNA extraction from *Holcocerrus hippophaecolus* (Lepidoptera: Cossidae) for AFLP analysis. **Forestry Studies in China**, v.10, p.189-192, 2008.

CHEN, H.; RANGASAMY, M.; TAN, S.Y.; WANG, H. Evaluation of Five Methods for Total DNA Extraction from Western Corn Rootworm Beetles. **PLoS One**, v.5, p.e11963, 2010.

FAVERO, K. ; PEREIRA, F. F. ; KASSAB, S.O. ; OLIVEIRA, H. N. ; COSTA, D. P. ; ZANUNCIO, J. C. Biological characteristics of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) are influenced by the number of females exposed per pupa of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Florida Entomologist**, v. 96, p. 583-589, 2013.

FAVERO, K.; PEREIRA, F. F. ; KASSAB, S.O.; COSTA, D. P.; ZANUNCIO, J. C. Life and Fertility Tables of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) With *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) Pupae. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 107, p. 621-626, 2014.

GLAESER, D. F. ; PEREIRA, F. F. ; VARGAS, E. L. ; CALADO, V. R. F. ; FAVERO, K. Desempenho reprodutivo de *Trichospilus diatraeae* no hospedeiro natural *Diatraea saccharalis* três gerações no hospedeiro alternativo *Tenebrio molitor*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, p. 213-218, 2014.

GRACHEV, M.A.; KUZNETSOVA, S.Y.; SHERBAKOVA, T.A. A method for the isolation of pure DNA for PCR. **Molecular Biology**, v.40, p.159-161, 2006.

HERATY, J.; RONQUIST, F.; CARPENTER, J.M.; HAWKS , D.; SCHULMEISTER, S.; DOWLING, A.P.; MURRAY, D.; MUNRO, J.; WHEELER, W.C.; SCHIFF, N.;

SHARKEY, M. Evolution of the hymenopteran megaradiation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 60, p.73–88, 2011.

LEE, P.L.M. & PRYS-JONES, R.P. Extracting DNA from museum bird eggs, and whole genome amplification of archive DNA. **Molecular Ecology Resources**, v.8, p.551-560, 2008.

LEE, J. H.; PARK, Y.; CHOI, J. R. Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory. **Yonsei Medical Journal**, v.51, p.104-10, 2010.

MACKAUER, M. Genetic problems in the production of biological control agents. **Annues Revist Entomology**, v.21, p. 369-385. 1972.

MELO, R.L., PRATISSOLI, D., POLANCZYK, R.A., TAVARES, M., MILANEZ, A.M., MELO, D.F. Ocorrência de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera.: Eulophidae) em broca-das-cucurbitáceas, no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 228-230, 2011.

MOLECULAR RESEARCH CENTER . **DNAzolH® genomic DNA isolation reagent**. 2008.

HAMZE, A.A.L.; FILHO, A.N.K.; SOUSA, V.A.; SANTOS; NEVES, E.J.M. Metodologia de extração de DNA para análise genética de populações de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 47, p.117-122, 2003.

OLIVEIRA, L.F.V.; WALLAU, G.L.; LORETO, E.L.S. Isolation of high quality DNA: a protocol combining “rennet” and glass milk. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.12, p.1-6, 2009.

PASTORI, P.L., PEREIRA, F.F., ANDRADE, G.S., SILVA, R.O., ZANUNCIO, J.C., PEREIRA, A.I.A. Reproduction of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) in pupae of two lepidopterans defoliators of eucalypt. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 38, p. 91-93, 2012.

PASTORI, P. L.; PEREIRA, F. F.; PRATISSOLI, D. ; ZANUNCIO, J. C. ; OLIVEIRA, F. A. L. ; ZAIDAN, U. R.. Dispersão de *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu (Hymenoptera: Eulophidae) em plantio de cana-de-açúcar. **Agrária**, v. 8, p. 85-89, 2013.

PEREIRA, F.F.; ZANUNCIO, J.C.; TAVARES, M.T.; PASTORI, P.L.; JACQUES, G.C. & VILELA, E.F. New Record of *Trichospilus diatraeae* as a Parasitoid of the Eucalypt Defoliator *Thyrinteina arnobia* in Brazil. **Phytoparasitica**, v.36, p. 304-306, 2008.

ROHLAND, N. et al. Nondestructive DNA extraction method for mitochondrial DNA analyses of museum specimens. **Biotechniques**, v.36, p.814-821, 2004.

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L.; SANTOS, I. K. F. M. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 215 p.

VARGAS, E. L.; PEREIRA, F. F. ; GLAESER, D.F.; CALADO, V. R. F.; OLIVEIRA, F.G.; PASTORI, P.L. Searching and parasitism of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) by *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae). **Acta Biologica Colombiana**, v. 18, p. 259-264, 2013.

ZACHÉ, B.; WILCKEN, C.F.; DACOSTA, R.R.; SOLIMAN, E.P. *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae), a new parasitoid of *Melanolophia consimilaria* (Lepidoptera: Geometridae). **Phytoparasitica**. v.38, p.355-357, 2010a.

ZACHÉ, B., WILCKEN, C.F., ZACHÉ, R.R.C., SOLIMAN, E.P. & SAN ROMAN, M.L.L. *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae), un nuevo parasitoide de *Hypsipyla grandella* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae). **Idesia**, v. 28, p.111-114, 2010b.

ZACHÉ, B., ZACHÉ, R.R.C.; SOLIMAN, E.P. & WILCKEN, C.F. Evaluation of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) as parasitoid of the eucalyptus defoliator *Euselasia eucerus* (Lepidoptera: Riodinidae). **International Journal Tropical Insect Science**, v.31, n. 1-2, p.118-121. 2011a.

ZACHÉ, B., ZACHÉ, R.R.C., SOUZA, N.M.; DIAS, T.K.R. & WILCKEN, C.F. 2011b. New record of *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Sarsina violascens* (Herrich-Schaeffer, 1856) (Lepidoptera: Lymantriic 51 n Brazil. **Journal Plant Protection Resistance**, v. 51, p.420-422, 2011b.

ZACHÉ, B., WILCKEN, C.F., ZACHÉ, R.R.C. & SOUZA, N.M. Novo registro de *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae), como parasitoide de *Spodoptera cosmioides* Walker, 1858 (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Biota Neotropica**, v. 12, p. 319-322, 2012.

WALSH, P.S.; METZGER, D.A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR- based typing from forensic material. **BioTechniques**. v.40, p 506-513, 1991.

WALKER, M. R. & RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo: Atheneu Editora, 334 p. 1999.

Tabela 2- Médias (\pm EP) de concentração (ng/ μ L) e pureza (valor da relação 260/280 nm) do DNA obtidos a partir de dois métodos de extração de DNA para *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae).

	Protocolo A				Protocolo B				
	Maceração em N ₂		Sem maceração		Maceração em N ₂		Sem maceração		
	n ²	Conc ¹ . (ng/ μ L)	Razão 260nm/280nm	Conc. (ng/ μ L)	Razão 260nm/280nm	Conc. (ng/ μ L)	Razão 260nm/280nm	Conc. (ng/ μ L)	Razão 260nm/280nm
<i>Trichospilus diatraeae</i>	25	450,01 \pm 58,20 A ² d ³	1,63 \pm 0,02Ba	106,20 \pm 26,52Bd	1,73 \pm 0,02Aa	21,24 \pm 9,62Dc	1,45 \pm 0,02Db	22,87 \pm 12,17Cc	1,49 \pm 0,08Ca
	50	686,67 \pm 75,04Ac	1,53 \pm 0,08Bc	270,33 \pm 59,01Bc	1,64 \pm 0,06Ab	13,04 \pm 3,56Dd	1,18 \pm 0,03Dd	47,83 \pm 15,44Ca	1,31 \pm 0,02Cc
	100	987,00 \pm 73,02Ab	1,53 \pm 0,07Bc	396,02 \pm 59,01Bb	1,63 \pm 0,06Bc	108,53 \pm 23,25Ca	1,95 \pm 0,09Aa	7,35 \pm 1, 30Dd	1,31 \pm 0,03Dc
	150	1421,00 \pm 201,06Aa	1,54 \pm 0,07Ab	502,67 \pm 61,54Ba	1,57 \pm 0,08Bd	29,40 \pm 11,14Cb	1,34 \pm 0,02Dc	27,20 \pm 9,30Db	1,45 \pm 0,05Cb
<i>Palmistichus elaeisis</i>	25	528,33 \pm 63,50Ad	1,15 \pm 0,04Ca	184,67 \pm 31,23Bd	0,93 \pm 0,014a	101,27 \pm 16,29Cd	1,55 \pm 0,02Ad	58,87 \pm 10,90Db	1,38 \pm 0,05Ba
	50	1348,33 \pm 187,64Ac	1,15 \pm 0,04Ca	390,67 \pm 52,54Cc	0,77 \pm 0,14Db	855,33 \pm 15,62Bc	1,90 \pm 0,08Aa	26,07 \pm 13,36Dd	1,19 \pm 0,04Bd
	100	1367,67 \pm 136,21Ab	1,13 \pm 0,03Cc	682,67 \pm 35,03Cb	0,56 \pm 0,12Dd	1441,3 \pm 63,95Ba	1,85 \pm 0,04Ab	53,97 \pm 11,61Dc	1,21 \pm 0,02Bc
	150	1462,00 \pm 140,93Aa	1,14 \pm 0,01Cb	1235,33 \pm 54,99Ca	0,72 \pm 0,08Dc	1375,67 \pm 29,30Bb	1,83 \pm 0,07Ac	92,77 \pm 12,31Da	1,28 \pm 0,02Bb

¹Concentração (quantidade de DNA contida em 1 μ L da solução).

²n =quantidade de indivíduos utilizados

³Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

⁴Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 1- Locus de microssatélite, tamanhos dos fragmentos amplificados em pares de bases (pb) pela mPCR de *Horisnemus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), utilizados para análises das amostras de DNA de *Trichopsilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) adaptado de AEBI et al. 2004.

Locus	Acesso no Genbank n°	Sequência de primers (5' – 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
Ho4b	AY66613	F: CATCGAAAGGGATATGCGCACG R: CTATACAAAGCTCCATTCACCTCG	126-140	61
Ho8b	AY655757	F:CTTAAAACTCTACAATGGCGTCTTT R: GATAAAGTACAGATTTTCGCGC	164-298	52
Ho10b	AY166616	F: GCATAGAGTCGCGGAATCG R: CCACTCGAAATACTTGTA ⁵⁴	154-174	58
Ho16	AY166618	F: TCTGAACTTGCATTGTCATG R: GCAAAATTGCGTTTCGTCTG	170-238	57
Ho6b	AY166614	F: CGTTATGCGCATAACGCTGGGT R:CAACACAAGACAACGCAGCTCCG	163-181	65

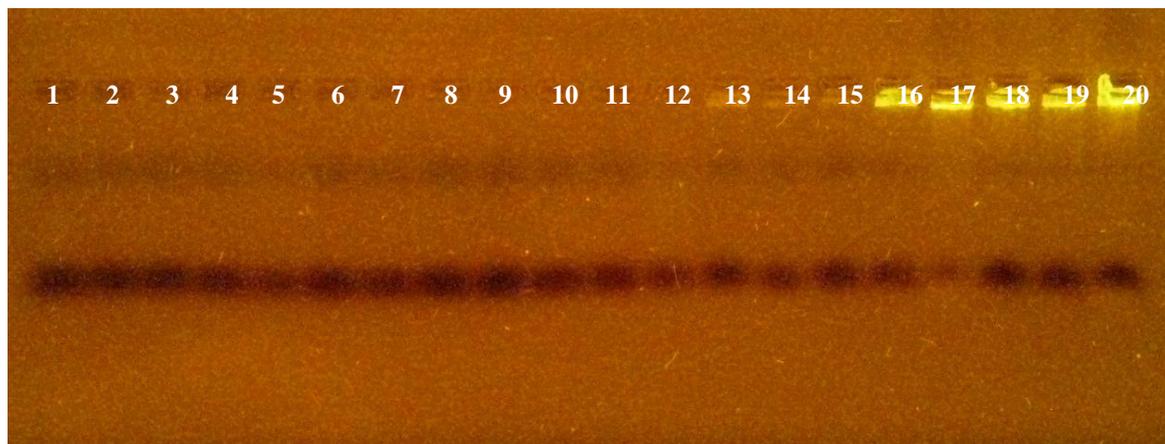


Figura 1. Fotografia dogel de agarose a 2% com brometo de etídio de amostras (sem maceração de 1 a 3 - 25, de 4 a 6 - 50, de 7 a 9 - 100, de 10 a 12- 150 indivíduos, com maceração de 13 a 15- 25, 16 a 18- 50, de 19 a 20- 100 indivíduos) de DNA extraído do Protocolo B (HAMZE et al., 2003 com adaptações) de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae).

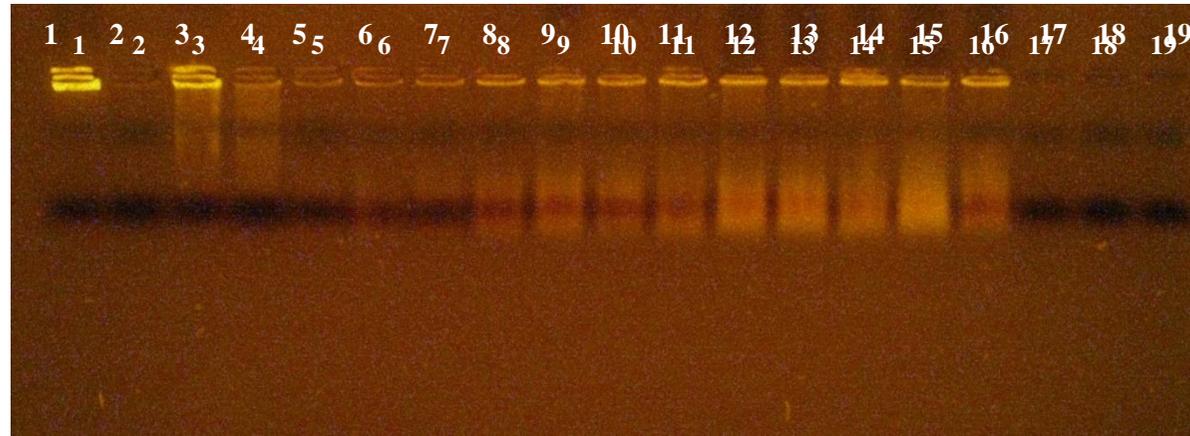


Figura 2. Fotografia do gel de agarose a 2% com bormeto de etídio de amostras (com maceração 1-100, 2 a 4- 150 indivíduos) de DNA extraído do Protocolo B (HAMZE et al., 2003 com adaptações) e (com maceração 4 a 7- 25, 8 a 10-50, 11 a 13-100, 14 a 16 150 indivíduos, sem maceração 17 a 19-25 indivíduos) de DNA extraído do Protocolo A (Chelex[®]) de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae).

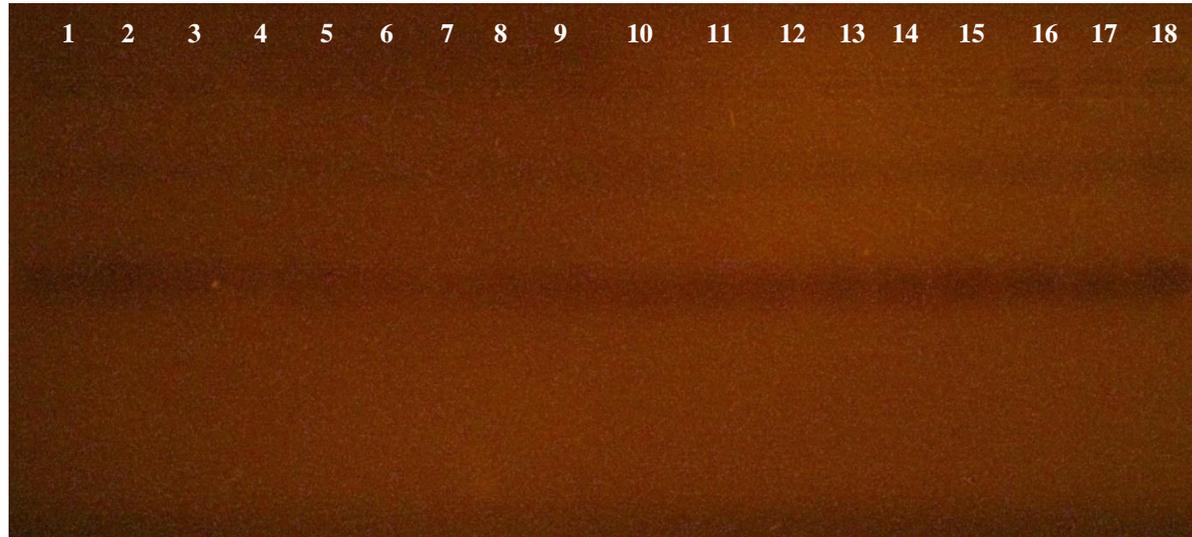


Figura 3. Fotografia do gel de agarose a 2% com bormeto de etídio de amostras (sem maceração 1 a 3-50, 4 a 6- 100, 7 a 9 150 indivíduos) de DNA extraído do Protocolo A (Chelex[®]) de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) e (sem maceração 10 a 12-25, 13 a 15 -50, 16 a 18-100 indivíduos) de DNA extraído do Protocolo B (HAMZE et al., 2003 com adaptações) de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae).

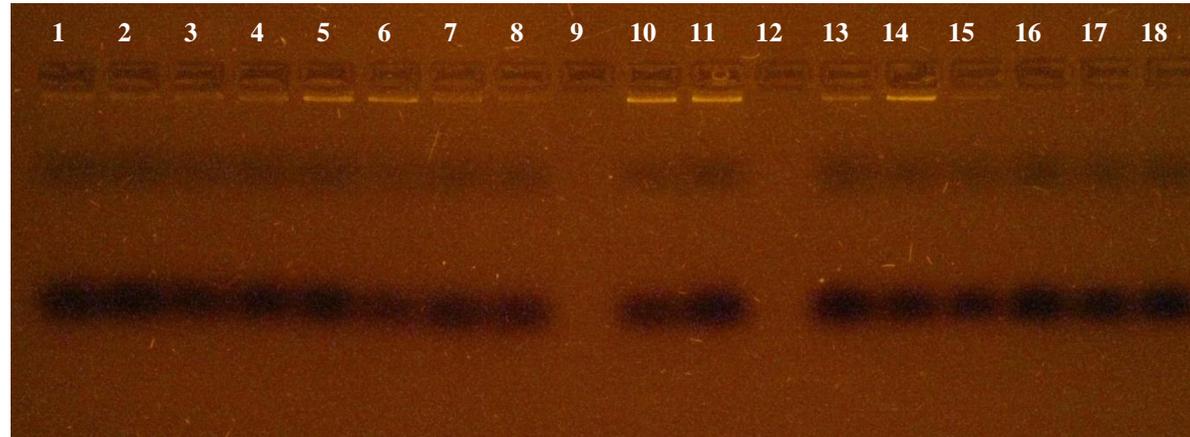


Figura 4. Fotografia do gel de agarose a 2% com bormeto de etídio de amostras (sem maceração 1 a 3-150 indivíduos, com maceração 4 a 6-25, 7 a 9- 50, 10 a 12- 100, 13 a15- 150 indivíduos) de DNA extraído do Protocolo B (HAMZE et al., 2003 com adaptações) e (sem maceração 16 a 17- 25 indivíduos) de DNA extraído do Protocolo A (Chelex[®]) de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae).

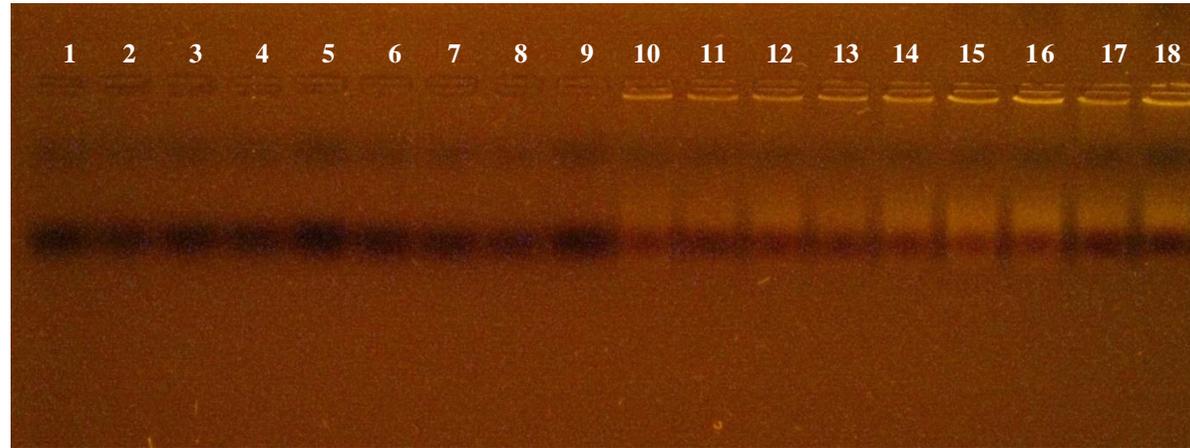


Figura 5. Fotografia do gel de agarose a 2% com bormeto de etídio de amostras (sem maceração 1 a 3-50, 4 a 6-100, 7 a 9- 150 indivíduos, com maceração 10 a12- 25, 13 a 14- 50, 16 a 18- 100 indivíduos) de DNA extraído do Protocolo A (Chelex®) de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae).

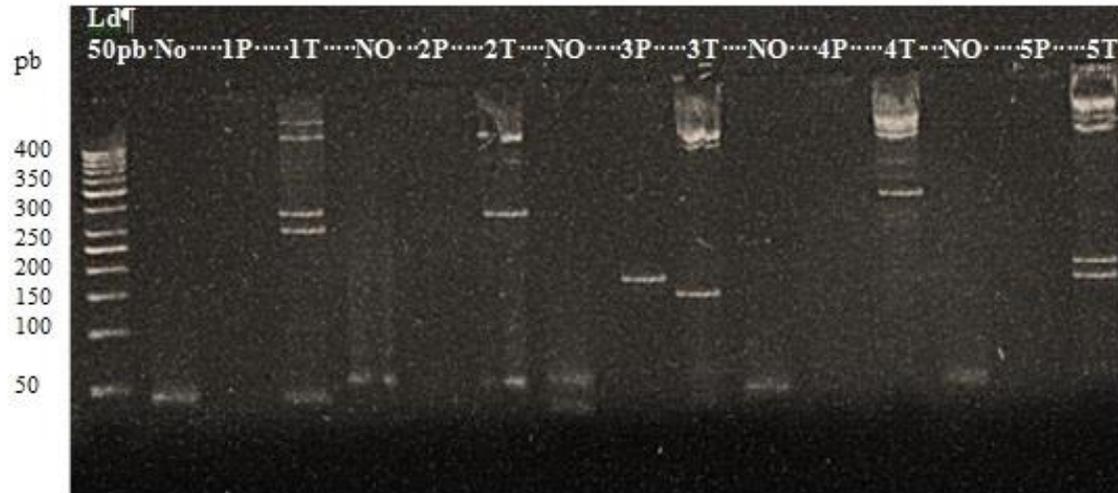


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídeo dos produtos amplificados com DNA de *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) com 100 insetos macerados. Coluna 1: Marcador de peso molecular 50 pares de bases (pb), Coluna 2: Controle Negativo (No), Colunas seguintes: Ho4b: 1P 0, 1T banda de aprox 250pb; Ho8b: 2P 0, 2T 260pb; Ho10b: 3P 0 e 3T 150pb, Ho16b: 4P0, 4T 450pb; Ho6b: 5P 0, 5T 210 e 230pb.

CAPÍTULO III

**Transferibilidade de marcadores nucleares microssatélites
para *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis*
(Hymenoptera: Eulophidae)**

Transferibilidade de marcadores nucleares microssatélites para *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae)

RESUMO: Espécies filogenéticas mais próximas são mais semelhantes geneticamente uma maior similaridade genética pode conduzir a uma maior possibilidade de transferência de marcadores moleculares já desenvolvidos para himenópteros parasitoides. Dentre os himenópteros parasitoides, destacam-se aqueles pertencentes à família Eulophidae, os endoparasitoides de pupas de lepidópteros *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu e *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae). O objetivo deste trabalho foi estabelecer a utilização do protocolo Chelex® para extração de amostras individuais de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* provenientes de diferentes gerações e testar a transferibilidade de microssatélites de espécies da mesma família Eulophidae. Fêmeas parasitoides de *T. diatraeae* e de *P. elaeisis* das criações das seguintes gerações: F1, F5, F10, F15 e F20, foram armazenadas em freezer -20 °C. O material para as análises foi preparado com três repetições para cada fêmea individualizada em microtubos de 1,5 mL, para cada geração. As amostras foram submetidas à extração do DNA e foram avaliadas a quantidade e pureza do DNA e feita a análise de PCR com os primers. Dois marcadores (Ho8b e Ho10b) revelaram amplificação por PCR para as amostras de DNA de *T. diatraeae* e apenas um (Ho10b) para *P. elaeisis*, porém esse número é insuficiente para permitir um amplo espectro de aplicações dos marcadores variando de espécies nos estudos moleculares, porém, é possível aplicar os marcadores estudados para pesquisas ao nível de identificação de indivíduos pertencentes a mesma família, indicando que as amostras são do parasitoides em estudo.

Palavras-chave: parasitoides; sequência de DNA; marcadores moleculares.

ABSTRACT: Phylogenetic species closer are more similar genetically greater genetic similarity can lead to greater portability of molecular markers already developed for Hymenoptera parasitoids. Among the hymenoptera parasitoids, we highlight those belonging to Eulophidae family, endoparasitoid pupae of lepidoptera *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu and *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae). The objective of this study was to establish the use of Chelex® protocol for extracting individual samples *T. diatraeae* and *P. elaeisis* from different generations and test the transferability of microsatellite species of the same family Eulophidae. Parasitoid females *T. diatraeae* and *P. elaeisis* the creations of the following generations: F1, F5, F10, F15 and F20, were stored in -20 ° C freezer. The material for analysis was prepared with three replicates for each separate female in microtubes of 1.5 ml for each generation. The samples were subjected to DNA extraction were evaluated and the amount and purity of DNA and PCR analysis performed with primers. Two markers (Ho8b and Ho10b) revealed for PCR amplification of DNA from *T. diatraeae* samples and only one (Ho10b) *P. elaeisis*, but this number is insufficient to allow a wide spectrum of applications ranging from markers in studies of species molecular, however, you can apply the markers studied for

research at the level of individuals identifying pertences the same family, indicating that the samples are the parasitoid under study.

Keywords: parasitoids; DNA sequence; molecular markers.

1.INTRODUÇÃO

Os himenópteros parasitoides estão presentes em quase todos os habitats terrestres e são uma das classes mais importantes de agentes de controle biológico em agroecossistemas e são também amplamente utilizadas em estudos de ecologia evolutiva e biologia de populações (GIBSON, 1993, GAUTHIER et al. 2000, WAJNBERG et al. 2008, HESAMI et al. 2010, HARDY et al. 2013).

Grande número de testes de laboratório tem sido conduzidos objetivando monitorar a qualidade de inimigos naturais, com base principalmente em parâmetros biológicos. Um dos maiores obstáculos do controle de qualidade é a detecção da perda da variabilidade genética em insetos criados massalmente (van LENTEREN, 2003, PREZOTTI et al. 2004, BEUKEBOOM & ZWAAN, 2005, HERATY et al. 2011, SØRENSEN et al. 2012). A detecção da variabilidade genética em insetos é normalmente obtida a partir da genética molecular, utilizando técnicas para isolar e caracterizar tais genes por meio de marcadores moleculares.

Os marcadores é um fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico do DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Microssatélites nucleares são atualmente um dos mais populares tipos de marcadores genéticos utilizados para estudos moleculares (BARBARÁ et al. 2007). Estes consistem em unidades curtas, repetidas de cerca de 2-6 pares de bases de comprimento, com um matriz que pode ser de até 200 pb de comprimento e são encontrada tanto em regiões codificantes e não codificantes em todos os genomas procarióticos e eucarióticos (BEUKEBOOM & ZWAAN, 2005, TALBOT et al. 2011; SCHROEDER et al. 2012).

Devido ao seu extremo potencial polimórfico independente do locus e espécies estudadas, estes marcadores moleculares de DNA são os indicados para fornecer informações sobre os processos evolutivos, a diversidade genética e diferenciação entre as populações através de medir o grau de heterozigosidade espécies de parasitoides (ANTON et al. 2007, NYABUGA et al. 2010, HERATY et al. 2011, KHIDR et al. 2014), bem como o grau de fluxo gênico e dispersão entre populações (ZAVODNA et al. 2005; DRESCHER et al. 2010; NYABUGA et al. 2010).

Dentre os himenópteros parasitoides, destacam-se aqueles pertencentes à família Eulophidae que apresenta cerca de 4.472 espécies, é constituída por insetos pequenos entre 0,4 a 0,6mm de comprimento e está subdividida em quatro subfamílias: Entedoninae, Eulophinae, Entiinae e Tetrastichinae (NOYES, 2008).

Dentro da família Eulophidae se destacam duas espécies de endoparasitoides de pupas de lepidópteros *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae) e *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle, 1993 (Hymenoptera: Eulophidae), onde ambos tem sido relatados e estudados como agentes potenciais no controle biológico de pragas agrícolas e florestais (BITTENCOURT & BERTI FILHO, 2004, PEREIRA et al. 2008, ZACHÉ et al. 2010a, 2010b, ZACHÉ et al. 2011 a, 2011b, MELO et al. 2011, PASTORI et al. 2012, ZACHÉ et al. 2012, VARGAS et al. 2013, PASTORI et al. 2013, BELLON et al. 2014).

Espécies filogenéticas mais próximas são mais semelhantes geneticamente (GAUTHIER et al., 2000, CERVERA et al. 2005, KHIDR et al. 2014), uma maior similaridade genética pode conduzir a uma maior possibilidade de transferência de marcadores moleculares já desenvolvidos para himenópteros parasitoides.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer a utilização do protocolo Chelex[®] para extração de amostras individuais de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* provenientes de diferentes gerações e testar a transferabilidade de microssatélites de espécies da mesma família Eulophidae.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os parasitoides *T. diatraeae* e *P. elaeisis* foram criados por três gerações em pupas de *A. gemmatalis* (hospedeiro neutro para eliminar um possível condicionamento pré-imaginal ao hospedeiro de criação). Sete fêmeas de cada espécie descendentes emergidas da pupa de *A. gemmatalis* foram selecionadas ao acaso e individualizadas em tubos de vidro, cada uma com uma pupa de *D. saccharalis* nas condições $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa do ar e fotofase de 14 horas, para compor a geração F1 de *T. diatraeae* e de *P. elaeisis*. Esse procedimento foi repetido sucessivamente até a geração F20 de *T. diatraeae* e de *P. elaeisis* em pupas de *D. saccharalis*.

Fêmeas parasitoides de *T. diatraeae* e de *P. elaeisis* das criações das seguintes gerações: F1, F5, F10, F15 e F20, foram armazenadas em freezer -20°C . O material para as análises foi preparado com três repetições para cada fêmea individualizada em microtubos de 1,5 mL, para cada geração.

As amostras foram submetidas à extração do DNA adicionado 200 µL de Chelex® a 5 % (com adaptações WALSH, 1991) para cada fêmea e incubados em termociclador Bio Rad® a temperatura de 95 °C por 15 minutos, e em seguida, as amostras foram centrifugadas a velocidade de 14.000 rpm por 2 minutos.

Após a centrifugação, as amostras foram armazenadas em freezer -20 °C para as análises posteriores.

Para testar se as amostras de DNA extraídas eram provenientes de indivíduos da família Eulophidae foram submetidas à PCR, seguindo o protocolo de AEBI et al., 2004, com algumas adaptações. As sequências de oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizadas estão listadas na Tabela 1.

As amostras para reação de amplificação foram preparadas da seguinte forma: 25 µL contendo: 12,5 µL de PCR Master Mix (Thermo scientific), 10 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (Forward e Reverse) e 50 a 100ng de DNA genômico. As reações em cadeia pela polimerase foram realizadas em termociclador (BioRad®) e consistiu em pré-aquecimento de 94°C por quatro minutos antes da inicialização dos 30 ciclos, cada qual conduzido a 94°C por 45 segundos, 56°C por 55 segundos para o anelamento dos *primers* e extensão, a 72°C por 45 segundos catalizada pela atividade da DNA polimerase, e então uma extensão final por quatro minutos a 72°C. Para monitoramento das reações de amplificação, utilizou-se uma amostra controle negativo, onde o DNA foi substituído por igual volume de água ultrapura.

Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0%, a uma voltagem de 120 V, por 40 minutos. O gel foi preparado com tampão TBE (1x), corado com brometo de etídio. O marcador de peso molecular utilizado foi 100 pb DNA Ladder (Thermo Scientific®). Os produtos da PCR e o controle negativo foram submetidos à eletroforese em gel de agarose acrescidos do tampão de corrida. A banda de DNA foi visualizado gel e fotografado em fotodocumentador (UVP) sob luz UV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações (quantidade de DNA contida em 1µL da solução) e as razões entre as amostras testadas 260/280nm estão representados na Tabela 2 e a amplificação da PCR com os marcadores moleculares estão na Figura 1. Dois marcadores (Ho8b e Ho10b) revelaram amplificação por PCR para as amostras de DNA de *T. diatraeae* e apenas um (Ho10b) para *P. elaeisis*, porém esse número é insuficiente para permitir um amplo espectro de aplicações dos marcadores variando de espécies nos estudos

moleculares, como por exemplo, em análise da variabilidade genética, porém a transferebilidade de numerosos loci SSR foi mostrada em espécies para quais os primers não foram desenvolvidos, podem ser consideradas como marcadores para ser aplicados para comprovação de parasitoides da família Eulophidae e auxiliar na construção de um banco genômico.

Estabelecer que existisse polimorfismo genético dentro de espécies de parasitoides abre um número de possibilidades para a utilização desses marcadores. Por exemplo, os marcadores moleculares têm sido usados caracterização molecular para auxiliar na identificação de espécies de himenópteros parasitoides da família Braconidae e Eulophidae (GEBIOLA et al. 2010, GUPTA et al. 2011, TOMANOVIĆ et al. 2014), identificação de populações de insetos da mesma espécie em diferentes regiões ou áreas próximas (ALTHOFF & THOMPSON, 2001, VICKERMAN et al. 2004, BERNARDO et al. 2008), estudos filogenéticos e taxonômicos (GAUTHIER et al. 2000, DRESCHER et al. 2010, MATSUO et al. 2014), diversidade genética (KAŇUCH et al. 2014) e também para identificar o sexo de ovos de himenópteros (ABE et al. 2009).

Além disso, o parentesco genético é um fator crucial na evolução de características biológicas e comportamentais entre indivíduos (LIZÉ et al. 2006; GARDNER & WEST, 2007).

Com base nos resultados é possível aplicar os marcadores estudados para pesquisas a nível de identificação de indivíduos pertencentes a mesma família, indicando que as amostras são do parasitoide em estudo.

4. CONCLUSÃO

Em *T. diatraeae* e *P. elaeisi* criados em laboratório foram encontrados polimorfismo em dois marcadores microssatélites.

Os marcadores podem ser aplicados na identificação de indivíduos pertencentes a família Eulophidae.

5. AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo. Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento de Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), pelo auxílio financeiro para a execução deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS

- ABE, J.; KAMIMURA, Y.; SHIMADA, M.; WEST, S.A. Extremely female-biased primary sex ratio and precisely constant male production in a parasitoid wasp *Melittobia*. **Animal Behaviour**. v. 78, p. 515-523. 2009.
- AEBI, A.; ALVAREZ, N.; BUTCHER, D.J.; HANSSON, A.M.; RISTERUCCI, M.; BENREY, B. Microsatellite markers in a complex of *Horismenus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoids of bruchid beetles. **Molecular Ecology**. v. 4, p. 707-709, 2004.
- ALTHOFF, D.M. & THOMPSON, J.N. Geographic structure in the searching behavior of a specialist parasitoid: combining molecular and behavioral approaches. **Journal of Evolutionary Biology**. v.14, p. 406-417. 2001.
- ANTON, C.; ZEISSET, I.; MUSCHE, M.; DURKA, W.; BOOMSMA, J.J.; SETTELE, J. Population structure of a large blue butterfly and its specialist parasitoid in a fragmented landscape. **Molecular Ecology**. v. 16, p. 3828-3838. 2007.
- BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G.M.; BERED, F.; FAY, M.F.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**. v.16, p. 3759-3767. 2007.
- BELLON, P. P.; OLIVEIRA, H. N.; PEREIRA, F. F. Teste de voo como critério de avaliação da qualidade de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae). **Bioscience Journal**, v. 30, p. 582-584, 2014.
- BERNARDO, U., MONTI, M.M., NAPPO, A.G., GEBIOLA, M., RUSSO, A., PEDATA, P.A. & VIGGIANI, G. Species status of two populations of *Pnigalio soemius* (Hymenoptera: Eulophidae) reared from two different hosts: An integrative approach. **Biological Control**. v. 46, p. 293–303. 2008.
- BITTENCOURT, M.A.L.; BERTI-FILHO, E. Desenvolvimento dos estágios imaturos de *Palmistichus elaeis* Delvare & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de Lepidoptera. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.48, p.65-68, 2004.
- BUEKEBOOM, L.W.; ZWAAN, B.J. Genetics. In: Jervis, M. A.. (Eds.). **Insects as Natural Enemies: A Practical Perspective**, Springer, Netherlands, 2005. p.167-201.
- CERVERA, M.T.; STORME, V.; SOTO, A.; IVENS, B.; VAN MONTAGU, M.; RAJORA, O.P.; BOERJAN, W. Intraspecific and interspecific genetic and phylogenetic relationships in the genus *Populus* based on AFLP markers. **Theory Applied Genetic**. v. 111, p.1440–1456. 2005.
- DRESCHER, J.; BÜTHGEN, N.; SCHMITT, T.; BÜHLER, J.; FELDHAAR, H. Societies drifting apart? Behavioural, genetic and chemical differentiation between supercolonies in the yellow crazy ant *Anoplolepis gracilipes*. **PLoS One**. v.5, p.13581. 2010.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília, EMBRAPA, 220p. 1998.

GUPTA, A.; GHOSH, A.; BABY, N.L.; JALALI, S.K. Morphological and Molecular Characterization of *Apanteles mohandasi* Sumodan & Narendran (Hymenoptera: Braconidae), a Solitary Endoparasitoid of *Pammene critica* Meyrick (Lepidoptera: Tortricidae), with Notes on Biology from India. **The American Entomological Society**. v.122, p:354-365. 2011.

GARDNER, A. & WEST, S.A. Social evolution: the decline and fall of genetic kin recognition. **Current Biology**. v.17, p: 810-812. 2007.

GAUTHIER, N.; LASSALE, J.; QUICKE, D.L.J.; GODFRAY, H.C.J. Phylogeny of Eulophidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), with a reclassification of Eulophinae and the recognition that Elasmidae are derived eulophids. **Systematic Entomology**, v.25, p.521-539, 2000.

GEBIOLA, M.; BERNARDO, U.; BURKS, R.A. A reevaluation of the generic limits of *Pnigalio* Schrank (Hymenoptera: Eulophidae) based on molecular and morphological evidence. **Zootaxa**. v. 2484, p: 35–44. 2010.

GIBSON, G. A. P., Superfamilies Mymarommatoidea and Chalcidoidea. In: Goulet, H., Huber, J. T. (Eds.). **Hymenoptera of the World; an identification guide to Families**. Canada Communication Group, Ottawa, Canada. 1993. p. 570-655.

HARDY, I.C.W.; GOUBAULT, M.; BATCHELOR, T.P. Hymenopteran contests and agonistic behaviour. In: Hardy ICW, Briffa M, Editors. **Animal Contests**. Cambridge University Press. pp 147-177. 2013.

HERATY, J.; RONQUIST, F.; CARPENTER, J.M.; HAWKS, D.; SCHULMEISTER, S.; DOWLING, A.P.; MURRAY, D.; MUNRO, J.; WHEELER, W.C.; SCHIFF, N.; SHARKEY, M. Evolution of the hymenopteran megaradiation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 60, p.73–88, 2011.

HESAMI, S.; EBRAHIM, E.; OSTOVAN, H.; SHOJAI, M.; KAMALI, K.; YEFREMOVA, Z. E YEGORENKOVA, E. Contribution to the study of Eulophidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) of fars province of Iran: I Subfamilies Entedoninae and Tetrastichinae. **Munis Entomology Zoology**, v. 5, p. 157, 2010.

KAŇUCH, P.; BERGGREN, A.; CASSEL-LUNDHAGEN, A. Genetic diversity of a successful colonizer: isolated populations of *Metrioptera roeselii* regain variation at an unusually rapid rate. **Ecology and Evolution**. v.4, p. 1117–1126. 2014.

KHIDR, S.K.; HARDY, I.C.W.; ZAVIEZO, T.; MAYES, S. Development of microsatellite markers and detection of genetic variation between *Goniozus* wasp populations. **Journal of Insect Science**. v. 14, p.43. 2014.

LENTEREN, J.C. van. **Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures**. CABI Publishing, 315 págs. 2003.

LIZÉ, A.; CARVAL, D.; CORTESERO, A.M.; FOURNET, S.; POINSOT, D. Kin discrimination and altruism in the larvae of a parasitoid insect. **Proceedings the Royal Society of London B**. v. 273, p. 2381-2386. 2006.

MATSUO, K.; HIROSE, Y.; JOHNSON, N.J. A taxonomic issue of two species of *Trissolcus* (Hymenoptera: Platygasteridae) parasitic on eggs of the brown-winged green bug, *Plautia stali* (Hemiptera: Pentatomidae): resurrection of *T. plautiae*, a cryptic species of *T. japonicus* revealed by morphology, reproductive isolation and molecular evidence. **Applied Entomology Zoology**. v.49, p:385–394. 2014.

MELO, R. L.; PRATISSOLI, D.; POLANCZYK, R. A.; TAVARES, M.; MILANEZ, A. M.; MELO, D. F. Ocorrência de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera.: Eulophidae) em broca-das-cucurbitáceas, no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 29, p. 228- 230, 2011.

NYABUGA, F.; LOXDALE, H.; HECKEL, D.G.; WEISSER, W.W. Spatial population dynamics of a specialist aphid parasitoid, *Lysiphlebus hirticornis* Mackauer (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae): evidence for philopatry and restricted dispersal. **Heredity**. v.105, p. 433-442. 2010.

NOYES, J.S. 2003. Universal Chalcidoidea Database. Disponível em <http://www.nhm.ac.uk/entomology/chalcidoids/index.html> [acessada em 10.mar.2013].

PASTORI, P.L., PEREIRA, F.F., ANDRADE, G.S., SILVA, R.O., ZANUNCIO, J.C., PEREIRA, A.I.A. Reproduction of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) in pupae of two lepidopterans defoliators of eucalypt. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 38, p. 91-93, 2012.

PASTORI, P. L.; PEREIRA, F. F.; PRATISSOLI, D. ; ZANUNCIO, J. C. ; OLIVEIRA, F. A. L. ; ZAIDAN, U. R.. Dispersão de *Trichospilus diatraeae* Chierian & Margabandhu (Hymenoptera: Eulophidae) em plantio de cana-de-açúcar. **Agrária**, v. 8, p. 85-89, 2013.

PEREIRA, F.F.; ZANUNCIO, J.C.; TAVARES, M.T.; PASTORI, P.L.; JACQUES, G.C. & VILELA, E.F. New Record of *Trichospilus diatraeae* as a Parasitoid of the Eucalypt Defoliator *Thyrintea arnobia* in Brazil. **Phytoparasitica**, v.36, p. 304-306, 2008.

PREZOTTI, L.; PARRA, J.R.; VENCOVSKY, R.; COELHO, A.S.G.; CRUZ, I. Effect of the size of the founder population on the quality of sexual populations of *Trichogramma pretiosum*, in laboratory. **Biological Control**, v. 30, p. 174-180, 2004.

SØRENSEN, J.G.; ADDISON, M.F.; TERBLANCHE, J.S. Mass-rearing of insects for pest management: Challenges, synergies and advances from evolutionary physiology. **Crop Protection**, v. 38, p. 87-94, 2012.

SCHROEDER, H.; HOELTKEN, A.M.; FLADUNG, M. Differentiation of *Populus* species using chloroplast single nucleotide polymorphism (SNP) markers—essential for comprehensible and reliable poplar breeding. **Plant Biology**, v. 14, p.374–381, 2012.

TALBOT, P.; THOMPSON, S.L.; SCHROEDER, W.; ISABEL, N. An efficient single nucleotide polymorphism assay to diagnose the genomic identity of poplar species and hybrids on the Canadian prairies. **Canadian Journal For Research**, v. 41, p.1102–1111, 2011.

TOMANOVIC', Ž.; PETROVIC', A.; MITROVIC', M. KAVALLIERATOS, N.G.; STARÝ, P.; RAKHSHANI, E.; RAKHSHANIPOUR, M.; POPOVIC', A.; SHUKSHUK, A.H.; IVANOVIC, A. Molecular and morphological variability within the *Aphidius colemani* group with redescription of *Aphidius platensis* Brethes (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). **Bulletin of Entomological Research**. v.104, p.552–565. 2014.

VARGAS, E. L.; PEREIRA, F. F.; GLAESER, D.F.; CALADO, V. R. F.; OLIVEIRA, F.G.; PASTORI, P.L. Searching and parasitism of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) by *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae). **Acta Biologica Colombiana**, v. 18, p. 259-264, 2013.

VICKERMAN, D.B.; HODDLE, M.S.; TRIAPITSYN, S.; STOUTHAMER, R. Species identity of geographically distinct populations of the glassy-winged sharpshooter parasitoid *Gonatocerus ashmeadi*: morphology, DNA sequences, and reproductive compatibility. **Biological Control**. v. 31, p. 338–345. 2004.

ZACHÉ, B., WILCKEN, C.F., DACOSTA, R.R., SOLIMAN, E.P.. *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae), a new parasitoid of *Melanolophia consimilaria* (Lepidoptera: Geometridae). **Phytoparasitica**. v.38, p.355-357, 2010a.

ZACHÉ, B., WILCKEN, C.F., ZACHÉ, R.R.C., SOLIMAN, E.P. & SAN ROMAN, M.L.L. *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae), un nuevo parasitoide de *Hypsipyla grandella* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae). **Idesia**, v. 28, p.111-114, 2010b.

ZACHÉ, B., ZACHÉ, R.R.C.; SOLIMAN, E.P. & WILCKEN, C.F. Evaluation of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) as parasitoid of the eucalyptus defoliator *Euselasia eucerus* (Lepidoptera: Riodinidae). **International Journal Tropical Insect Science**, v.31, p.118-121. 2011a.

ZACHÉ, B., ZACHÉ, R.R.C., SOUZA, N.M.; DIAS, T.K.R. & WILCKEN, C.F. 2011b. New record of *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Sarsina violascens* (Herrich-Schaeffer, 1856) (Lepidoptera: Lymantriidae) in Brazil. **Journal Plant Protection Resistance**, v. 51, p.420-422, 2011b.

ZAVODNA, M.; ARENS, P.; VAN DIJK, P.J.; PARTOMIHARDJO, T.; VOSMAN, B., VAN DAMME, J.M. Pollinating fig wasps: genetic consequences of island recolonization. **Journal of Evolutionary Biology**. v. 18, p. 1234- 1243. 2005.

WAJNBERG, E.; BERNSTEIN, C.; VAN ALPHEN, J.J.M. **Behavioral Ecology of Insect Parasitoids: from Theoretical Approaches to Field Applications**. Blackwell Publishing. 2008

WALSH, P.S.; METZGER, D.A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR- based typing from forensic material. **BioTechniques**. v.40, p 506-513, 1991.

Tabela 1- Locus de microssatélite, tamanhos dos fragmentos amplificados em pares de bases (pb) pela mPCR de *Horisnemus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), utilizados para análises das amostras de DNA de *Trichopsilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) adaptado de AEBI et al. 2004.

Locus	Acesso no Genbank n°	Sequência de primers (5' – 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
Ho8b	AY655757	F:CTTAAAACTCTACAATGGCGTCTTT R: GATAAAGTACAGATTTCGCGC	164-298	52
Ho10b	AY166616	F: GCATAGAGTCGCGGAATCG R: CCACTCGAAATACTTGTAAC	154-174	58

Tabela 2- Médias (\pm EP) de concentração (ng/ μ L) e pureza (valor da relação 260/280 nm) do DNA obtidos a partir de método de extração Chelex[®] com adaptações, para *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae).

Fêmeas adultas	Geração	Quantidade de DNA μ g/ μ L	Razão 260nm/280nm
<i>Trichospilus diatraeae</i>	1	16,30 \pm 6,07	1,55 \pm 0,09
	5	19,00 \pm 8,57	1,51 \pm 0,09
	10	21,70 \pm 11,35	1,72 \pm 0,10
	15	20,50 \pm 11,17	1,53 \pm 0,9
	20	18,60 \pm 8,14	1,72 \pm 0,09
<i>Palmistichus elaeisis</i>	1	28,20 \pm 3,58	1,38 \pm 0,01
	5	41,43 \pm 8,61	1,29 \pm 0,01
	10	15,33 \pm 6,56	1,00 \pm 0,02
	15	30,60 \pm 9,49	1,02 \pm 0,03
	20	30,40 \pm 6,80	1,05 \pm 0,03

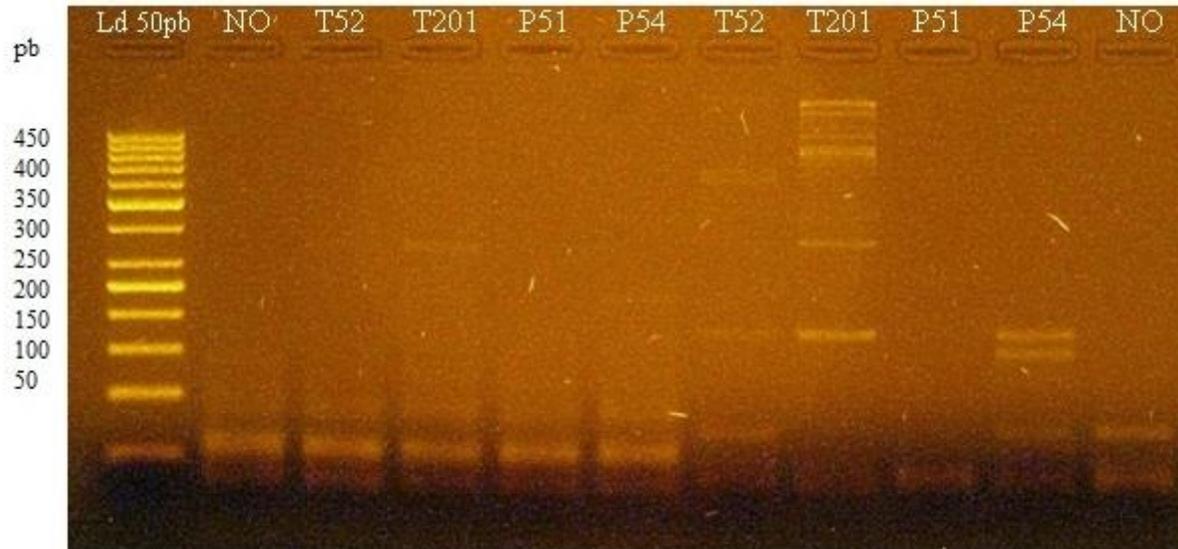


Figura 1- Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo de produtos amplificados de marcadores microsatélites de *Homerus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae) em parasitoides *Trichospilus diatreae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) extraídos com Chelex[®], amostras contendo uma fêmea de cada geração. Coluna 1: Marcador de peso molecular 50 pares de bases (pb), Coluna 2: Controle Negativo (No), Colunas seguintes:Ho8b: T5-2 banda de aprox 250pb; T 20-1 banda de aprox. 250 pb, P5-1 0, Ho10b: T 5-2 banda de aprox.150 pb, T 20-1 banda de aprox. 250pb e 150 pb, P 5-1 0, P5-4 banda de aprox. 150 pb e 100pb.

CONCLUSÕES GERAIS

A criação de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* em pupas de *D. saccharalis* por 20 gerações sucessivas não compromete a qualidade biológica do parasitoide.

O protocolo A (Chelex[®]) é possível e viável de ser utilizada para extração de DNA de himenópteros parasitoides.

A otimização desta técnica permitiu utilizar as amostras de DNA de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* na reação de PCR com marcadores moleculares, tendo resultados satisfatórios (formação de bandas).

Em *T. diatraeae* e *P. elaeisi* criados em laboratório foram encontrados polimorfismo em dois marcadores e microssatélites já desenvolvidos o que indica que podem ser consideradas como marcadores para ser aplicados na identificação de indivíduos pertencentes a mesma família.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As populações das duas espécies parasitoides criadas ao longo de vinte gerações no mesmo hospedeiro e em laboratório não sofreram perdas significativas em suas características biológicas. Essas informações são importantes, pois podem contribuir para otimização da multiplicação de *T. diatraeae* e *P. elaeisis* em laboratório, assim como para o planejamento de estudos visando o controle biológico de pragas agrícolas e florestais utilizando estes inimigos naturais em condição de campo.

Os processos de otimização de análises moleculares estabelecem um protocolo padrão para obter as amostras e realizar as análises com maior segurança na coleta dos dados. É importante salientar que para himenópteros endoparasitoides são escassos os estudos de isolamento do material genético. Com base nos resultados inéditos obtidos é possível aplicar o protocolo com Chelex[®] para uma correta extração, amplificação e visualização do DNA do parasitoide.

Os marcadores moleculares microssatélites estudados e que foram desenvolvidos para *Horisnemus* sp., serviram em pesquisas a nível de identificação da espécie da família Eulophidae para *T. diatraeae* e *P. elaeisis*. Com essas informações é possível construir um banco genômico com as informações genéticas dos parasitoides e também construir primers (marcadores) específicos para *T. diatraeae* e *P. elaeisis*, abrindo um amplo caminho para estudos de filogenia, para a variabilidade genética e a dinâmica populacional, para a eficácia de liberação no campo e para o estabelecimento de uma nova técnica para o controle de qualidade de criações massais.