

Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - FCBA
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade - PPGE CB

Identificação molecular de *Trichospilus diatraeae*, *Palmistichus elaeisis*, *Trichogramma pretiosum* e caracterização de imaturos de *Tetrastichus howardi*
(Hymenoptera: Chalcidoidea)

Izabella de Lima Palombo

Dourados - MS
Maio de 2026

Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - FCBA
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade - PPGECEB

Izabella de Lima Palombo

Identificação molecular de *Trichospilus diatraeae*, *Palmistichus elaeisis*, *Trichogramma pretiosum* e caracterização de imaturos de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Chalcidoidea)

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Entomologia e Conservação da Biodiversidade.

Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Dr. Fabricio Fagundes Pereira
Coorientador: Dr. Patrik Luiz Pastori

Dourados - MS
Maio de 2026

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

P181i Palombo, Izabella De Lima

Identificação molecular de *Trichospilus diatraeae*, *Palmistichus elaeisis*, *Trichogramma pretiosum* e caracterização de imaturos de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Chalcidoidea)
[recurso eletrônico] / Izabella De Lima Palombo. -- 2026.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Fabricio Fagundes Pereira.

Coorientador: Patrik Luiz Pastori.

Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2025.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. controle biológico. 2. desenvolvimento de imaturos. 3. parasitoides. 4. sequenciamento genômico. I. Pereira, Fabricio Fagundes. II. Pastori, Patrik Luiz. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

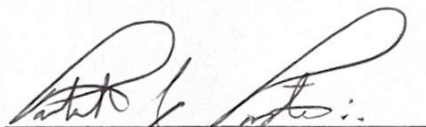
©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

"Identificação molecular de *Trichospilus diatraeae*, *Palmistichus elaeisis*, *Trichogramma pretiosum* e caracterização de imaturos de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Chalcidoidea)".

Por

IZABELLA DE LIMA PALOMBO

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
MESTRE EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação



Dr. Patrik Luiz Pastori
Coorientador/Presidente - UFGD



Dr. Marcos Gino Fernandes - UFGD
Membro titular



Dr.ª Nadja Nara Pereira da Silva - UNESP
Membro titular

Dissertação aprovada em: 17 de julho de 2025

BIOGRAFIA

Izabella de Lima Palombo, filha de Jullyane Barbosa de Lima e Wagner Zanata Palombo, nasceu em 23 de julho de 1999, na cidade de Dourados, Mato Grosso do Sul. Iniciou o ensino fundamental em 2011, na Escola Estadual São José, localizada no distrito de Indápolis, Dourados. Posteriormente, cursou o ensino médio na Escola Estadual Dom Bosco, concluindo na Escola Estadual São José, distrito de Indápolis.

Em 2018, ingressou no curso de Biotecnologia (Bacharelado) na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), formando-se em 2023. Durante a graduação, atuou como voluntária em diferentes laboratórios, adquirindo experiências nas áreas de microbiologia, controle biológico de insetos, ecotoxicologia e genotoxicidade de organismos aquáticos.

Além disso, participou de projetos de pesquisa e iniciação científica com apresentação de trabalhos com foco em técnicas de criação de eulofídeos para seu uso no controle biológico, efeito do parasitismo em insetos alvo e não-alvo, desenvolvimento de parasitoides de ovos criopreservados e sua reprodução.

Iniciou o mestrado em 2023 no Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, pela Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como bolsista CAPES.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, que possibilitou a realização deste curso. CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a FUNDECT - Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia, pelo apoio financeiro às pesquisas realizadas no laboratório. Agradeço a Associação Sul-Mato-Grossense de Produtores e Consumidores de Florestas Plantadas REFLORE, pela confiança e pelo apoio financeiro das nossas pesquisas. A Sistêmica Kovê, em especial ao Dr. Carlos R. G. Cardoso pelo apoio.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Fabricio Fagundes Pereira, pela orientação, apoio, paciência e dedicação durante todos esses anos. Ao meu coorientador Patrik Luiz Pastori, que, mesmo ingressando no projeto durante o caminho, esteve sempre disponível, prestativo e disposto a contribuir. E aos professores e servidores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, minha profunda gratidão pela dedicação e apoio ao longo dessa jornada.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Controle Biológico de Insetos – LECO-BIOL, que me acolheu desde o início da graduação. Sou grata pela amizade, pelas risadas com café que fazem parte da nossa rotina e pelos conhecimentos adquiridos. Em especial, a minha amiga Jéssica Terilli Lucchetta pela amizade que construímos que vai muito além de um jaleco branco e uma bancada de laboratório. Aos meus amigos e parceiros de pesquisa Amanda Buzzanari, Alex Polatto, André Costa, Carlos Cardoso e Lavinia Careaga.

Aos amigos que foram unidos pela música e que, por meio dela, deixou essa etapa da minha vida muito mais especial. À Vida Maria, Aline Benites, Paula Costa, Beatriz Anjos, Leonardo Moreira e a toda banda MeiFio, obrigada por encherem meus dias de alegria, leveza e boas memórias. Em especial, à minha companheira de casa e vida Thais Scherer, amo você com todo o meu coração.

À minha família, agradeço pelo amor, incentivo, apoio e por sempre caminharem ao meu lado. Todas as minhas conquistas são para vocês, Jullyane, Wagner, Cleusa, meus irmãos caçulas Pedro Henrick e Maria Luiza, meus tios e tias. Amo vocês incondicionalmente.

Ao meu parceiro e afeto, Vinicius Soares, você esteve presente desde a primeira aula, naquelas trocas de olhares e nas risadas tímidas. Obrigada pela companhia, pela construção do nosso amor e por dividir seu fone de ouvido comigo naquele dia e seguir dividindo.

*“Aos genes que, silenciosamente moldam comportamentos e à ciência, que nos permite
desvendar suas mensagens.”*

Adaptado de Richard Dawkins

SUMÁRIO

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Trichospilus diatraeae*, *Palmistichus elaeisis*, *Trichogramma pretiosum* E CARACTERIZAÇÃO DE IMATUROS DE *Tetrastichus howardi* (HYMENOPTERA: CHALCIDOIDEA)

RESUMO GERAL	1
GENERAL ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO GERAL	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Controle Biológico	5
2.2 Características biológicas de <i>Trichospilus diatraeae</i> , <i>Palmistichus elaeisis</i> , <i>Tetrastichus howardi</i> e <i>Trichogramma pretiosum</i>	4
2.3 Identificação molecular de parasitoides	6
3. OBJETIVO GERAL	8
4. HIPÓTESES	9
5. REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO I - Molecular Identification of <i>Palmistichus elaeisis</i> , <i>Tetrastichus howardi</i> , <i>Trichospilus diatraeae</i> e <i>Trichogramma pretiosum</i> (Hymenoptera: Chalcidoidea) — Important Biocontrol Agents	
RESUMO	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1 Coleção de insetos	20
2.2 Extração, quantificação e sequenciamento de DNA	21
2.3 Análise bioinformática para detecção de variantes	21
2.4 Simulação de amostras	22
3. RESULTADOS	23
4. DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÃO	29
6. REFERÊNCIAS	29
CAPÍTULO II - Caracterização de imaturos de duas linhagens de <i>Tetrastichus howardi</i> (Hymenoptera: Eulophidae)	
RESUMO	34
1. INTRODUÇÃO	35
2. MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1 Criação de insetos	36
2.2 Desenvolvimento experimental	37
3. RESULTADOS	37
4. DISCUSSÃO	41
5. CONCLUSÃO	42
6. REFERÊNCIAS	43
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
7. ANEXOS	47

RESUMO GERAL

As vespas parasitoides desempenham um papel fundamental no controle biológico. Os endoparasitoides de pupas *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942, *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle, 1993, *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) e o parasitoide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) são amplamente utilizados no controle populacional de lepidópteros considerados pragas. A diferenciação entre linhagens de parasitoides pode resultar em variações biológicas significativas, tais como alterações no ciclo de vida e no desenvolvimento dos estágios imaturos. No entanto, sua identificação morfológica pode ser limitada devido ao seu pequeno tamanho e à alta similaridade morfológica entre as espécies. Diante disso, abordagens moleculares se destacam como ferramentas complementares para uma identificação rápida e precisa, garantindo a liberação segura e eficaz desses agentes de controle em campo. Nosso objetivo foi identificar variantes genômicas específicas das espécies-alvo *T. diatraeae*, *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. pretiosum* por meio do sequenciamento de genoma completo, bem como descrever o desenvolvimento dos estágios larvais de duas linhagens de *T. howardi*. Os parasitoides foram coletados de seus hospedeiros e estabelecidos em laboratório após a emergência dos adultos. Amostras de cada espécie foram enviadas ao Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e à Coleção Entomológica de Insetos Entomófagos Oscar Monte para identificação morfológica. Posteriormente, amostras compostas por fêmeas de cada parasitoide foram preservadas em etanol absolute e enviadas a Empresa Agropartners Consulting. O DNA foi extraído, quantificado e sequenciado na plataforma Illumina NovaSeq 6000. Ferramentas bioinformáticas foram utilizadas para o controle de qualidade dos dados, detecção de variantes genômicas específicas, análise de componentes principais (PCA) e classificação por máquina de vetores de suporte (SVM). O sequenciamento genômico gerou dados de alta qualidade para os parasitoides analisados, permitindo a identificação de quatro variantes específicas para *T. diatraeae*, quatro para *P. elaeisis*, duas para *T. howardi* e cinco para *T. pretiosum*. Adicionalmente, foram estabelecidas em laboratório as linhagens DO (Dourados) e LA (Ladário) de *T. howardi*, cujas fêmeas foram expostas a pupas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) por 24 horas. Durante 20 dias, pupas parasitadas foram coletadas diariamente, preservadas, dissecadas e fotografadas. A determinação dos instares larvais foi realizada por meio de medições morfométricas da cápsula cefálica, comprimento e largura corporal, seguidas de análise de componentes principais. Ambas as linhagens apresentaram três instares larvais, com diferenças no tempo de desenvolvimento dos imaturos. Este estudo contribui de forma significativa para o conhecimento biológico e molecular de parasitoides utilizados em programas de controle biológico ao facilitar a identificação em futuras coletas e subsidiar o planejamento e o monitoramento de populações em campo.

PALAVRA-CHAVE: controle biológico, desenvolvimento de imaturos, parasitoides, sequenciamento genômico

GENERAL ABSTRACT

Parasitoid wasps play a fundamental role in biological control. The pupal endoparasitoids *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942, *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle, 1993, *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae), and the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) are widely used for the population control of lepidopteran pests. Differentiation among parasitoid strains may result in significant biological variations, such as changes in the life cycle and immature development. However, their morphological identification may be limited due to their small size and the high morphological similarity among species. Therefore, molecular approaches stand out as complementary tools for rapid and accurate identification, ensuring the safe and effective release of these biological control agents in the field. Our objective was to identify species-specific genomic variants of the target species *T. diatraeae*, *P. elaeisis*, *T. howardi*, and *T. pretiosum* through whole-genome sequencing, as well as to describe the larval development of two strains of *T. howardi*. Parasitoids were collected from their hosts and established in the laboratory after adult emergence. Samples of each species were sent to the Department of Biological Sciences at the Federal University of Espírito Santo (UFES) and to the Oscar Monte Entomophagous Insect Collection for morphological identification. Subsequently, samples composed of females of each parasitoid species were preserved in absolute ethanol and sent to Agropartners Consulting Company. DNA was extracted, quantified, and sequenced on the Illumina NovaSeq 6000 platform. Bioinformatic tools were used for data quality control, detection of species-specific genomic variants, principal component analysis (PCA), and support vector machine (SVM) classification. Genomic sequencing generated high-quality data for the analyzed parasitoids, allowing the identification of four specific variants for *T. diatraeae*, four for *P. elaeisis*, two for *T. howardi*, and five for *T. pretiosum*. Additionally, the DO (Dourados) and LA (Ladário) strains of *T. howardi* were established under laboratory conditions, and females were exposed to *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) pupae for 24 h. Over a period of 20 days, parasitized pupae were collected daily, preserved, dissected, and photographed. Larval instars were determined through morphometric measurements of head capsule width, body length, and body width, followed by principal component analysis. Both strains exhibited three larval instars, with differences in immature developmental time. This study significantly contributes to the biological and molecular knowledge of parasitoids used in biological control programs by facilitating species identification in future collections and supporting the planning and monitoring of field populations.

KEYWORDS: biological control, immature development, parasitoids, genomic sequencing

1. INTRODUÇÃO GERAL

O controle biológico com vespas parasitoides é uma alternativa viável e ecologicamente sustentável para o manejo de pragas agrícolas, ao reduzir o uso de inseticidas químicos e minimizar impactos ambientais (Teder & Knapp, 2019). A introdução de parasitoides além de suas barreiras biogeográficas naturais, de forma intencional ou acidental, permite que espécies se adaptem a novos ambientes (Renault et al., 2018). No entanto, esse processo pode levar a diferenciação de linhagens e o surgimento de espécies crípticas, sendo morfologicamente semelhantes, mas distintas em aspectos biológicos e comportamentais, dificultando a correta identificação (Colazza & Rosi, 2001). Essas variações geralmente se associam a fatores genéticos e ambientais, especialmente em regiões tropicais pela alta diversidade ecológica (D'ercole et al., 2023; Struck et al., 2018).

Vespas endoparasitoides são constantemente utilizadas como agentes de controle biológico ao depositar seus ovos no interior do hospedeiro. Durante o desenvolvimento, as larvas consomem os tecidos até à morte do hospedeiro (Wang et al., 2019). Os parasitoides *Trichospilus diatraeae* (Cherian & Margabandhu, 1942), *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle, 1993, *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) e o parasitoide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) são amplamente utilizados no controle populacional de lepidópteros considerados pragas (Parra et al., 2024; Pereira et al., 2021).

Trichospilus diatraeae foi registrado no sul da Índia, parasitando pupas de *Diatraea venosata* (Walker, 1863) (Lepidoptera: Crambidae). Em 1963, foi introduzido no Caribe para controle populações de *Diatraea* spp. Posteriormente, foi registrado no Brasil parasitando indivíduos da família Arctiidae (Lepidoptera) (Bennett et al., 1987; Paron & Berti-Filho, 2000). *P. elaeisis* é nativo da região Neotropical, com registros de parasitismo em *Eupseudosoma involuta* (Sepp, 1852) (Lepidoptera: Erebididae) e *Euselasia eucerus* Hewitson, 1872 (Lepidoptera: Riodinidae) em cultivos de eucalipto no Brasil (Delvare & LaSalle, 1993).

O parasitoide *T. howardi* é originário da Ásia e foi introduzido na África do Sul através das Filipinas, como potencial agente de controle de *Chilo partellus* (Swinhoe, 1885) (Lepidoptera: Crambidae) e *Busseola fusca* (Fuller, 1901) (Lepidoptera: Noctuidae) presentes em cultivos de milho e sorgo (Cruz et al., 2011; Kfir et al., 1993; Kfir, 2001; La Salle & Polaszek, 2007). No Brasil, foi registrado parasitando lagartas e pupas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) em cultivos de cana-

de-açúcar e milho (Cruz et al., 2011; Vargas et al., 2011; Rodrigues et al., 2021). Informações sobre as características biológicas e comportamentais dessa espécie foram relatadas em diversos estudos, possibilitando a criação massal em laboratório e liberação em cultivos agrícolas e florestais (Pereira et al., 2021). Entretanto, o desenvolvimento dos imaturos e o número de instar larvais de *T. howardi* são desconhecidos.

Assim como os eulofídeos, *T. pretiosum* possui ampla distribuição geográfica, com ocorrência na América do Norte e América do Sul, sendo um produto biológico registrado no Brasil para manejo de lepidópteros em cultivos de soja e milho (Bueno et al., 2024; Oliveira et al., 2017; Pinto et al., 1986). Apesar de origens distintas, os parasitoides compartilham características comuns, como desenvolvimento gregário, alta eficiência de parasitismo e uma ampla gama de hospedeiros (Zaché et al., 2011; Pereira et al., 2021).

A identificação morfológica de parasitoides possui limitações pela alta diversidade de espécies, tamanho corporal reduzido e a alta demanda de especialistas taxonômicos, principalmente pela existência de espécies crípticas (Smith et al., 2008). Portanto, o sequenciamento genômico é uma ferramenta que permite a identificação e diferenciação de espécies, complementando dados dos aspectos biológicos das espécies *T. diatraeae*, *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. pretiosum* como agentes de controle biológico, liberado por biofábricas (Frézal & Leblois, 2008; Pereira et al., 2021).

A eficácia dos parasitoides em campo dependem da correta identificação e a compreensão da interação parasitoide-hospedeiro, que influencia o comportamento de busca, fecundidade, desenvolvimento dos imaturos, progênie e longevidade (Konopka et al., 2018). Diante disso, compreender o desenvolvimento biológico de linhagens adaptadas a diferentes ambientes é fundamental para o uso desses agentes de controle biológico. A integração de métodos moleculares, como o sequenciamento genômico e o depósito de dados moleculares dos parasitoides, facilita futuras identificações, coletas e monitoramento de populações em programas de controle biológico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Controle Biológico

A agricultura é a forma mais extensa do uso da terra, ocupando mais de um terço da massa terrestre global para produção de insumos alimentares, promovendo profundas alterações na estrutura e no funcionamento dos ecossistemas (Wanger et al., 2020). O foco extensivo em produtividade trouxe ameaças sociais, mudanças climáticas, perda da biodiversidade e degradação de ecossistemas naturais e artificiais (Wyckhuys et al., 2024). Considerando as problemáticas, cresce a demanda por práticas agrícolas sustentáveis, como o controle biológico pelo uso de inimigos naturais que regulam populações consideradas pragas a níveis economicamente aceitáveis (Baker et al., 2020; DeBach & Schlinger, 1964).

O controle biológico pode ser classificado em quatro tipos principais: natural, de conservação, clássico e aumentativo. O controle aumentativo é um programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP) e envolve a produção massal de inimigos naturais, como insetos parasitoides, predadores, nematoides ou entomopatogênicos com liberações regulares em larga escala para reduzir populações em cultivos agrícolas (Van Lenteren et al., 2018). No entanto, a implementação dessa prática é complexa, pois depende da preservação do agroecossistema que favorece inimigos naturais, diminuição do uso intensivo de inseticidas sistêmicos não seletivos e adoção da prática pelos agricultores (Bonmatin et al., 2021; Bueno et al., 2021; Teder & Knapp, 2019).

O Brasil é um dos maiores produtores agrícola do mundo e o segundo maior exportador de produtos agrícolas, com destaque para culturas de soja e cana-de-açúcar (IBGE, 2021). Para atender essa demanda, a legislação brasileira tem favorecido o registro de agentes de controle biológico (Togni et al., 2019). Entretanto, a liberação de inimigos naturais no ambiente exige o registro de identificação, especificidade, avaliações biológicas e regulamentação legal para prevenir impactos ambientais negativos e manter o equilíbrio ecológico (Loomans, 2021). Nos últimos anos, várias espécies de parasitoides foram identificadas e registradas como produtos biológicos, incluindo os parasitoides *T. diatraeae*, *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. pretiosum* amplamente utilizados no controle de lepidópteros desfolhadores (Pereira et al., 2021).

2.2 Características biológicas de *Trichospilus diatraeae*, *Palmistichus elaeisis*, *Tetrastichus howardi* e *Trichogramma pretiosum*

Vespas parasitoides são inimigos naturais com alta diversidade e riqueza de espécies, constantemente utilizadas como agentes de controle biológico ao depositar seus ovos

em hospedeiros, que são consumidos pelas larvas em desenvolvimento, causando a mortalidade do hospedeiro parasitado (Wang et al., 2019). Os parasitoides também são conhecidos como indicadores de qualidade ambiental, pela suscetibilidade à fragmentação de habitats e perturbações ecológicas (Kruess & Tschamntke, 2000).

Entre os principais grupos de parasitoides utilizados no controle biológico destaca-se a família Eulophidae, pertencente à ordem Hymenoptera, sendo altamente diversa, com mais de 6.500 espécies documentadas, organizadas em aproximadamente 320 gêneros (Burks et al., 2025). As principais características diagnósticas incluem tarsos com quatro segmentos em ambos os sexos, antenas compostas de sete a nove segmentos, com no máximo quatro segmentos no funículo, e um gáster com pecíolo distinto, formando um estreitamento entre o propódeo e o gáster (Noyes, 2019).

De acordo com a literatura, o desenvolvimento de imaturos endoparasitoides ocorrem no interior do hospedeiro. Os ovos são himenopteriforme, ou seja, alongados e finos, característicos da ordem Hymenoptera, normalmente de coloração branca ou translúcida, com duração de 2 dias até a eclosão das larvas. As larvas são fusiformes, e a hipótese inicial indicava de três a cinco instares larvais, com tamanhos variados pela competição de recursos e o tamanho do hospedeiro. As pupas são exaradas e possuem coloração inicialmente clara e escurecimento ao final do estágio (Hanson & Gauld 1995; La Salle & Schauff, 1995). Os adultos são de vida livre com coloração escura e brilho metálico, possui duas setas na veia submarginal na face dorsal da asa anterior, como indicado por La Salle & Polaszek (2007).

As espécies *T. diatraeae*, *P. elaeisis* e *T. howardi* são endoparasitoides gregários com comportamento primário ou hiperparasitoide facultativo associados a diferentes espécies de lepidópteros (La Salle & Polaszek, 2007; Ribeiro et al., 2018). *T. diatraeae* é caracterizado por ovos hialinos e himenopteriformes, sendo alongados nas extremidades com período de incubação em aproximadamente 24 horas. As larvas possuem cutícula transparentes com segmentação do corpo bem definida e instares larvais variando de 7 a 8 dias. A pré-pupa e a pupa possuem a cabeça, tórax e abdômen bem definidos, variando de 9 a 10 dias (Paron, 1999; Melo et al., 2011).

De acordo com Bittencourt & Berti Filho, (2004), *P. elaeisis* possui ovos hialinos, tipicamente himenopteriforme e um período de incubação de 48 horas. As larvas são ápodas com cutículas transparentes em 12 segmentos, com quatro instares larvais variando entre 5 e 10 dias. As pré-pupas teve um período de duração de 24 horas, e o estágio de pupa com duração de aproximadamente 9 dias.

Uma revisão taxonômica de Hansson & Schmidt, (2020) sobre espécies europeias do gênero *Tetrastichus* Haliday, 1844, destaca os desafios da identificação morfológica devido a alta similaridade entre as espécies e a importância de abordagens integrativas moleculares. As características diagnósticas do gênero incluem uma cerda dorsal na nervura submarginal da asa anterior, três cerdas de cada lado do lobo médio no mesoscuto e uma carena longitudinal que se divide em duas partes formando um “Y” invertido.

A família Trichogrammatidae é representada por 89 gêneros e mais de 800 espécies descritas mundialmente (Querino et al., 2009). Entre elas, *T. pretiosum* pode ser identificada morfológicamente principalmente por caracteres da genitália masculina, combinado com o tipo de antena, asas e pigmentação do corpo (Hua et al., 2018). É uma das espécies mais utilizadas no controle biológico da praga *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) em cultivos de tomate na região Nordeste do Brasil (Oliveira et al., 2017).

O comportamento reprodutivo de *T. diatraeae*, *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. pretiosum* é o sistema haplodiplóide, onde fêmeas não copuladas produzem apenas descendentes machos por partenogênese arrenótoca, enquanto fêmeas fecundadas geram prole de ambos os sexos, influenciando significativamente as características biológicas da descendência (Beserra et al., 2003; Tsutsui et al., 2014).

Atualmente, *T. diatraeae*, *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. pretiosum* foram identificados morfológicamente e registrados como agentes de controle biológico. Entretanto, de acordo com Renault et al., (2018) espécies exóticas que foram introduzidas, seja de forma intencional ou acidental, podem se estabelecer e disseminar em habitats diversos. Esse processo pode levar a diferenciação de linhagens, comprometendo a eficiência em programas biológicos pelas variações comportamentais (Smith et al., 2008).

Diante dessas limitações, ferramentas moleculares passaram a ser empregadas de forma complementar à identificação morfológica, suprimindo lacunas decorrentes da similaridade entre espécies. A presença de espécies crípticas, associada às variações intra-específicas e às adaptações resultantes do estabelecimento em diferentes ambientes, pode mascarar diferenças relevantes entre populações (Smith et al., 2008; Renault et al., 2018). Nesse contexto, abordagens moleculares tornam-se essenciais para assegurar a correta identificação dos parasitoides, contribuindo para a manutenção do equilíbrio ecológico e para a eficácia dos programas de controle biológico (Chen et al., 2021).

2.3 Identificação molecular de parasitoides

A caracterização molecular da biodiversidade é fundamental para estudos ecológicos e ambientais, principalmente em grupos de insetos utilizados como agentes de controle biológico para prevenir impactos ambientais negativos (Singer et al., 2019). Com o avanço das tecnologias de sequenciamento genômico, foi possível sequenciar mais de 20 milhões de pares de base em leituras de 100 pb em questão de horas. O aprimoramento dessa técnica permitiu resultados com alto rendimento e flexibilidade, incluindo a construção de bibliotecas genômicas por síntese, maior resolução filogenética, identificação de organismos, além de novas perspectivas sobre a ecologia comportamental e evolutiva (Cameron, 2024; DeSalle & Amato, 2004; Evans & Kitson, 2020; Imelfort et al., 2009).

Entre os marcadores moleculares para a identificação de insetos, destaca-se a região mitocondrial COI (*Cytochrome Oxidase I*), amplamente utilizada em abordagens filogenéticas, estudos de genética de populações e na identificação de espécies, especialmente em grupos com elevada similaridade morfológica (Cameron, 2024). Apesar da evolução tecnológica e boa capacidade discriminatória para análises taxonômicas e evolutivas, a ferramenta apresenta algumas limitações, incluindo vieses taxonômicos associados à eficiência dos primers universais, que podem amplificar de forma desigual diferentes grupos de insetos ou restringir a análise a regiões específicas do genoma mitocondrial (Kurata et al., 2024). Dessa forma, embora amplamente empregado, o COI deve ser interpretado de maneira cautelosa, especialmente quando aplicado isoladamente em grupos taxonomicamente próximos.

O sequenciamento Illumina possui o sistema NovaSeq 6000 que permite a geração de sequências de DNA em quantidades maiores e em menor tempo, com alta qualidade e cobertura. A biblioteca genômica é construída a partir da fragmentação do DNA permitindo a detecção de variantes genômicas específicas para identificação e diferenciação entre espécies próximas ou crípticas (Modi et al., 2021).

Diversos estudos demonstram a eficácia dos métodos moleculares na identificação de parasitoides. Calado et al., (2015) identificou polimorfismos genéticos das espécies *T. diatraeae* e *P. elaeisis* com marcadores microssatélites aplicados a identificação de indivíduos da mesma família. Além disso, foi testado diferentes métodos de extração do DNA para garantir a qualidade e pureza dos resultados. A utilização de técnicas moleculares fornece informações de processos evolutivos, diversidade genética e diferenciação entre as populações criadas massalmente.

Tang et al., (2021) caracterizou o genoma mitocondrial de *T. howardi* pela tecnologia Illumina Hiseq e comparou com o genoma referência de *Tamarixia radiata*

(Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) para identificar relações filogenética dentro da família Eulophidae. Diferentes linhagens de *T. pretiosum* foram sequenciadas com o objetivo de avaliar o modo reprodutivo, além de aspectos evolutivos e ecológicos em comparação a outros himenópteros (Lindsey et al., 2018). Entretanto, Santos et al., (2015) utilizou a região ITS2 do DNA ribossômico para diferenciar molecularmente espécies do gênero *Trichogramma*. A integração de dados morfológicos e moleculares tem se mostrado essencial para o controle de qualidade na produção de agentes de controle biológico, evitando a disseminação de espécies não desejadas, contaminações cruzadas e a mistura de espécies morfológicamente semelhantes.

Nesse contexto, abordagens moleculares de sequenciamento genômico surge como uma ferramenta complementar na identificação e diferenciação das espécies *T. diatraeae*, *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. pretiosum*. Essa estratégia permite a detecção de variantes específicas, que assegura a correta liberação de espécies, facilita a identificação de futuras coletas de parasitoides, preservando o equilíbrio ecológico (Frézal & Leblois, 2008).

3. OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo identificar variantes genômicas específicas para a diferenciação das espécies *T. diatraeae*, *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. pretiosum* por meio do sequenciamento genômico, além de descrever o desenvolvimento e caracterizar os estágios larvais de duas linhagens de *T. howardi*.

3.1 Objetivos Específicos

1. Identificar variantes genômicas específicas de *T. diatraeae*, *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. pretiosum* por sequenciamento genômico, validando o método de extração de DNA.
2. Depositar as sequências genômicas no banco de dados GenBank.
3. Descrever o desenvolvimento de imaturos com o período dos estágios e o ciclo completo em duas linhagens de *T. howardi*.
4. Caracterizar os estágios larvais por medições morfométricas da cápsula cefálica, largura e comprimento do corpo em duas linhagens de *T. howardi*.

4. HIPÓTESES

1. O protocolo de extração do material genético aplicado as espécies *T. diatraeae*, *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. pretiosum* é eficiente, com amostras de alta qualidade e pureza.
2. O sequenciamento genômico permite detectar variantes genômicas específicas para identificar e diferenciar as espécies *T. diatraeae*, *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. pretiosum* molecularmente.
3. As linhagens de *T. howardi* apresentam diferenças comportamentais após muitas gerações em laboratório.

NOTA¹

¹Esta dissertação segue normas da ABNT com adaptações para as normas de trabalhos acadêmicos da Universidade Federal da Grande Dourados e da Revista Insects.

5. REFERÊNCIAS

- Baker, B.P., Green, T.A., Loker, A.J. Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. **Biological Control** 140: 104095, 2020. 10.1016/j.biocontrol.2019.104095.
- Bennett, F.D., Glenn, H., Yaseen, M., Baranowski, R.M. Records of *Trichospilus diatraeae*, an Asian parasite (Hymenoptera: Eulophidae) from the Caribbean and Florida. **The Florida Entomologist** 70(1): 184-186, 1987. DOI: 10.2307/3495110.
- Beserra, E.B., Querino, R.B., Parra, J.R. Ocorrência de ginandromorfismo em *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology** 32: 507-509, 2003. DOI: 10.1590/S1519-566X2003000300021.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K., Meier, R., Winker, K., Das, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in ecology & evolution** 22(3): 148-155, 2007. DOI: 10.1016/j.tree.2006.11.004.
- Bittencourt, M.A., Berti Filho, E. Desenvolvimento dos estágios imaturos de *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera, Eulophidae) em pupas de Lepidoptera. **Revista Brasileira de Entomologia** 48: 65-68, 2004. DOI: 10.1590/S0085-56262004000100012.
- Bonmatin, J.M., Giorio, C., Sánchez-Bayo, F., Bijleveld van Lexmond, M. An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. **Environmental Science and Pollution Research** 28: 11709-11715, 2021. DOI: 10.1007/s11356-021-12853-6.
- Bueno, A.D.F., Panizzi, A.R., Hunt, T.E., Dourado, P.M., Pitta, R.M., Gonçalves, J. Challenges for adoption of integrated pest management (IPM): the soybean example. **Neotropical Entomology** 50: 5-20, 2021. DOI: 10.1007/s13744-020-00792-9.
- Bueno, A.D.F., Sutil, W.P., Cingolani, M.F., Colmenarez, Y.C. Using Egg Parasitoids to Manage Caterpillars in Soybean and Maize: Benefits, Challenges, and Major Recommendations. **Insects** 15(11): 869, 2024. DOI: 10.3390/insects15110869.
- Burks, R.A., Gumovsky, A.V., Hansson, C., Gates, M.W., Domer, T., Perry, R.K. Eulophidae. In: Chalcidoidea of the World. Heraty, J.; Woolley, J. **CABI International, Wallingford, UK** 357–375, 2025. DOI: 10.1079/9781800623545.0027.
- Calado, V.R.F. **Metódos moleculares e características biológicas de *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae)**. Tese de Doutorado da Universidade Federal da Grande Dourados, 2015.
- Cameron, S. L. Insect mitochondrial genomics: A decade of progress. **Annual Review of Entomology** 70: 2024. DOI: 10.1146/annurev-ento-013024-015553.
- Chen, M.N., Santander, R.D., Talamas, E.J., Jentsch, P.J., Bon, M.C., Acimović, S.G. Molecular identification of *Trissolcus japonicus*, parasitoid of the brown marmorated stink bug, by species-specific PCR. **Insects** 12(5): 467, 2021. DOI: 10.3390/insects12050467.

Colazza, S.T.E.F.A.N.O., Rosi, M.C. Differences in the searching behaviour of two strains of the egg parasitoid *Telenomus busseolae* (Hymenoptera: Scelionidae). **European Journal of Entomology** 98(1): 47-52, 2001.

Cruz, I., Redoan, A.C., Silva, R.B.D., Figueiredo, M.D.L.C., Penteado-Dias, A.M. New record of *Tetrastichus howardi* (Olliff) as a parasitoid of *Diatraea saccharalis* (Fabr.) on maize. **Scientia Agricola** 68: 252-254, 2011. DOI: 10.1590/S0103-90162011000200017.

D’Ercole, J., Vila, R., Dapporto, L., Pentinsaari, M., Talavera, G., Dincă, V., Hebert, P.D. Molecular evolution in introduced insect species a mitochondrial perspective. **Frontiers in Ecology and Evolution** 11: 1218690, 2023. DOI: 10.3389/fevo.2023.1218690.

DeBach, P., Schlinger, E.I. Biological control of insect pests and weeds. 1964.

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** 27(2): 435-444, 1993. DOI: 10.1080/00222939300770201.

Melo, R.L.D., Pratisoli, D., Polanczyk, R.A., Tavares, M., Milanez, A.M., Melo, D.F. Occurrence of the parasitoid *Trichospilus diatraeae* (Hym.: Eulophidae) in melonworm, in Brazil. **Horticultura Brasileira** 29: 228-230, 2011. DOI: 10.1590/S0102-05362011000200016.

DeSalle R., Amato G. The expansion of conservation genetics. **Conservation genetics in the age of genomics** 31: 1-24, 2009. DOI: 10.7312/amat12832-006.

Evans, D.M., Kitson, J.J. Molecular ecology as a tool for understanding pollination and other plant–insect interactions. **Current opinion in insect science** 38: 26-33, 2020. DOI: 10.1016/j.cois.2020.01.005.

Favoreto, A.L., Pavani, R.F., Ribeiro, M.F., Zanuncio, A.J.V., Soares, M.A., Zanuncio, J.C., Wilcken, C.F. (2021). *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae): first report of parasitism in *Oxydia vesulia* (Lepidoptera: Geometridae). **Brazilian Journal of Biology** 81(2): 406–410, 2021. DOI: 10.1590/1519-6984.228541.

Frézal, L.; Leblois, R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. **Infection, Genetics and Evolution** 8(5): 727-736, 2008. DOI: 10.1016/j.mee-gid.2008.05.005.

Frézal, L.; Leblois, R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. **Infection, Genetics and Evolution** 8(5): 727-736, 2008. DOI: 10.1016/j.mee-gid.2008.05.005

Hanson, P.E., Gauld, I.D. (Eds.). The biology of Hymenoptera. In: The Hymenoptera of Costa Rica. New York, **Oxford University Press** 893: 20-28, 1995.

Hansson, C., Schmidt, S. A revision of European species of the genus *Tetrastichus* Haliday (Hymenoptera: Eulophidae) using integrative taxonomy. **Biodiversity data journal** 8: e59177, 2020. DOI: 10.3897/BDJ.8.e59177.

Hua, H.Q., Zhao, Z.Y., Zhang, Y., Hu, J., Zhang, F., Li, Y.X. Inter- and Intra-Specific Differentiation of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Species Using PCR-RFLP Targeting COI. **Journal of Economic Entomology** 111(4): 1860-1867, 2018. DOI: 10.1093/jee/toy119.

IBGE, I. I. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: Estatística da Produção Agrícola. Rio de Janeiro. 2021. https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2021_dez.pdf

Kfir, R. Prospects for biological control of the stem borer *Chilo partellus* in grain crops in South Africa. **Insect Science and its Application** 21(4): 275-280, 2001. DOI: 10.1017/S1742758400008353.

Kfir, R., Gouws, J., Moore, S.D. Biology of *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae): a facultative hyperparasitoid of stem borers. **Biocontrol Science and Technology** 3(2): 149-159, 1993. DOI: 10.1080/09583159309355271.

Konopka, J.K., Poinapen, D., Garipey, T., McNeil, J.N. Understanding the mismatch between behaviour and development in a novel host-parasitoid association. **Scientific reports** 8(1): 15677, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-33756-6.

Kruess, A., Tscharnkte, T. Species richness and parasitism in a fragmented landscape: experiments and field studies with insects on *Vicia sepium*. **Oecologia** 122: 129-137, 2000. DOI: 10.1007/PL00008829.

Kurata, S., Mano, S., Nakahama, N., Hirota, S.K., Suyama, Y., Ito, M. Development of mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I primer sets to construct DNA barcoding library using next-generation sequencing. **Biodiversity Data Journal** 12: e117014, 2024. DOI: 10.3897/BDJ.12.e117014.

La Salle, J., Polaszek, A. Afrotropical species of the *Tetrastichus howardi* species group (Hymenoptera: Eulophidae). **African Entomology** 15: 45-56, 2007. DOI: 10.4001/1021-3589-15.1.45.

LaSalle, J., Schauff, M.E., Hansson, C. Eulophidae. In: The Hymenoptera of Costa Rica. Hanson, P.E., Gauld, I.D. **Oxford University Press** Oxford, United Kingdom, 315-329, 1995.

Lindsey, A.R., Kelkar, Y.D., Wu, X., Sun, D., Martinson, E.O., Yan, Z., Werren, J.H. Comparative genomics of the miniature wasp and pest control agent *Trichogramma pretiosum*. **BMC biology** 16: 1-20, 2018. DOI: 10.1186/s12915-018-0520-9.

Loomans, A.J.M. Every generalist biological control agent requires a special risk assessment. **BioControl** 66: 23-35, 2021. DOI: 10.1007/s10526-020-10022-1.

Modi, A.; Vai, S.; Caramelli, D.; Lari, M. The Illumina Sequencing Protocol and the NovaSeq 6000 System. In: Mengoni, A., Bacci, G., Fondi, M. Eds.; **Bacterial Pangenomics. Methods in Molecular Biology**, Humana, New York, United States; 2242: 15-42, 2021. DOI:10.1007/978-1-0716-1099-2_2.

Noyes, J. Universal Chalcidoidea Database in the Catalogue of Life. **The Catalogue of Life Partnership** 2019.

Oliveira, C.M., Oliveira, J.V., Barbosa, D.R.S., Breda, M.O., França, S.M., Duarte, B.L.R. Biological parameters and thermal requirements of *Trichogramma pretiosum* for the management of the tomato fruit borer (Lepidoptera: Crambidae) in tomatoes. **Crop Protection** 99: 39-44, 2017. DOI: 10.1016/J.CROPRO.2017.04.005.

Paron, M.R., Berti-Filho, E. Capacidade reprodutiva de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de diferentes hospedeiros (Lepidoptera). **Scientia Agricola** 57: 355-358, 2000. DOI: 10.1590/S0103-90162000000200025.

Paron M.R. Bioecologia de *Trichospilus diatraeae* Cherian & Maragabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae), endoparasitóide de Lepidoptera Piracicaba, SP: USALQ, 1999.

Parra, J.R.P., de Sene Pinto, A., Nava, D.E., de Oliveira, R.C., Diniz, A.J.F. Controle biológico com parasitoides e predadores na agricultura brasileira. **Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz** 2024.

Paterson, I.D., Mangan, R., Downie, D.A., Coetzee, J.A., Hill, M.P., Burke, A.M., Compton, S.G. Two in one: cryptic species discovered in biological control agent populations using molecular data and crossbreeding experiments. **Ecology and Evolution** 6(17): 6139-6150, 2016. DOI: 10.1002/ece3.2297.

Pereira, F.F., Kassab, S.O., Calado, V.R.F., Vargas, E.L., de Oliveira, H.N., Zanuncio, J.C. Parasitism and emergence of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) on *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae, pupae and adults. **Florida Entomologist** 98(1): 377-380, 2015. DOI: 10.1653/024.098.0164.

Pereira, F.F., Pastori, P.L., Kassab, S.O., Torres, J.B., Cardoso, C.R.G., Fernandes, W.C., Oliveira, H.N., Zanuncio, J.C. Uso de eulofídeos no controle biológico de pragas. In: Controle biológico com parasitoides e predadores na agricultura Brasileira. Parra, J. R. P., Pinto, A. S., Nava, D. E., Oliveira, R. C., Diniz, A. J. F. **Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz**, Piracicaba, Sao Paulo, Brazil, 317-361, 2021.

Pinto, J.D., Oatman, E.R., Platner, G.R. *Trichogramma pretiosum* and a new cryptic species occurring sympatrically in Southwestern North America (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Annals of the Entomological Society of America** 79(6): 1019-1028, 1986. DOI: 10.1093/AESA/79.6.1019.

Querino, R.B., Zucchi, R.A., Pinto, J.D. Systematics of the Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) with a Focus on the Genera Attacking Lepidoptera. In: Consoli, F.L., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A. Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on *Trichogramma*. **Progress in Biological Control**, Piracicaba, Sao Paulo, Brazil, 9: 197-218, 2009. DOI:10.1007/978-1-4020-9110-0_7.

Rasplus, J.Y., Blaimer, B.B., Brady, S.G., Burks, R.A., Delvare, G., Fisher, N., Gates, M., Gauthier, N., Gumovsky, A.V., Hansson, C. and Heraty, J.M., A first phylogenomic hypothesis for Eulophidae (Hymenoptera, Chalcidoidea). **Journal of Natural History** 54 (9-12): 597-609, 2020. DOI: 10.1080/00222933.2020.1762941.

Renault, D., Laparie, M., McCauley, S.J., Bonte, D. Environmental adaptations, ecological filtering, and dispersal central to insect invasions. **Annual review of entomology** 63(1): 345-368, 2018. DOI: 10.1146/annurev-ento-020117-043315.

Ribeiro, R.C., Pikart, T.G., Fouad, H.A., Parreira, M.C., Zanuncio, J.C., Soares, M.A., Castro, V.R. *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae): development and reproduction in Lepidoptera palm oil pests. **Brazilian Journal of Biology** 79: 377-382, 2018. DOI: 10.1590/1519-6984.173211.

Rodrigues, A., Pereira, F.F., Barbosa, P.R., Silva-Torres, C.S., Torres, J.B. Parasitism behavior of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) on larvae and pupae of sugarcane borers. **Journal of Insect Behavior** 34(3): 71-81, 2021. DOI: 10.1007/s10905-021-09770-4.

Seehausen, M.L., Ris, N., Driss, L., Racca, A., Girod, P., Warot, S., Kenis, M. Evidence for a cryptic parasitoid species reveals its suitability as a biological control agent. **Scientific reports** 10(1): 19096, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-76180-5.

Singer, G.A.C., Fahner, N.A., Barnes, J.G., McCarthy, A., Hajibabaei, M. Comprehensive biodiversity analysis via ultra-deep patterned flow cell technology: a case study of eDNA metabarcoding seawater. **Scientific reports** 9(1): 5991, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-42455-9.

Smith, M.A., Rodriguez, J.J., Whitfield, J.B., Deans, A.R., Janzen, D.H., Hallwachs, W., Hebert, P.D. Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 105(34): 12359-12364, 2008. DOI: 10.1073/pnas.0805319105.

Struck, T.H., Feder, J.L., Bendiksby, M., Birkeland, S., Cerca, J., Gusarov, V.I., Dimitrov, D. Finding evolutionary processes hidden in cryptic species. **Trends in Ecology & Evolution** 33(3): 153-163, 2018. DOI: 10.1016/j.tree.2017.11.007.

Tang, X., Lyu, B., Lu, H., Tang, J., Meng, R., Cai, B. Characterization of the mitochondrial genome of *Tetrastichus howardi* (Olliff 1893) (Hymenoptera: Eulophidae). **Mitochondrial DNA Part B** 6(9): 2683-2685, 2021. DOI: 10.1080/23802359.2021.1963340.

Teder, T., Knapp, M. Sublethal effects enhance detrimental impact of insecticides on non-target organisms: A quantitative synthesis in parasitoids. **Chemosphere** 214: 371-378, 2019. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.09.132.

Togni, P.H., Venzon, M., Lagôa, A.C.G., Sujii, E.R. Brazilian legislation leaning towards fast registration of biological control agents to benefit organic agriculture. **Neotropical entomology** 48: 175-185, 2019. DOI: 10.1007/s13744-019-00675-8.

Tsutsui, Y., Maeto, K., Hamaguchi, K., Isaki, Y., Takami, Y., Naito, T., Miura, K. Apomictic parthenogenesis in a parasitoid wasp *Meteorus pulchricornis*, uncommon in the haplodiploid order Hymenoptera. **Bulletin of Entomological Research** 104(3): 307-313, 2014. DOI: 10.1017/S0007485314000017.

Van Lenteren, J.C., Bolckmans, K., Köhl, J. Controle biológico usando invertebrados e microrganismos: inúmeras novas oportunidades. **BioControl** 63: 39-59, 2018. DOI: 10.1007/s10526-017-9801-4.

Vargas, E.L., Pereira, F.F., Tavares, M.T., Pastori, P.L. Record of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Diatraea* sp. (Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane crop in Brazil. **Entomotropica** 26 (3): 143-146, 2011.

Wang, Z.Z., Liu, Y.Q., Min, S.H., Huang, J.H., Chen, X.X. Parasitoid wasps as effective biological control agents. **Journal of Integrative Agriculture** 18(4): 705-715, 2019. DOI: 10.1016/S2095-3119(18)62078-7.

Wanger, T.C., DeClerck, F., Garibaldi, L.A., Ghazoul, J., Kleijn, D., Klein, A.M., Weisser, W. Integrating agroecological production in a robust post-2020 Global Biodiversity Framework. **Nature Ecology & Evolution** 4(9): 1150-1152, 2020. 10.1038/s41559-020-1262-y.

Wyckhuys, K.A., Gu, B., Fekih, I.B., Finger, R., Kenis, M., Lu, Y., Hadi, B.A. Restoring functional integrity of the global production ecosystem through biological control. **Journal of Environmental Management** 370: 122446, 2024. 10.1016/j.jenvman.2024.122446.

Zaché, B., da Costa Zaché, R.R., Soliman, E.P., Wilcken, C.F. Evaluation of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) as parasitoid of the eucalyptus defoliator *Euselasia eucerus* (Lepidoptera: Riodinidae). **International Journal of Tropical Insect Science** 31(1-2): 118-121, 2011. DOI: 10.1017/S1742758411000117.

Zúñiga-Reinoso, Á., Méndez, M.A. Hidden and cryptic species reflect parallel and correlated evolution in the phylogeny of the genus *Callyntra* (Coleoptera: Tenebrionidae) of Central Chile. **Molecular phylogenetics and evolution** 127: 405-415, 2018.

Capítulo I

Molecular Identification of *Palmistichus elaeisis*, *Tetrastichus howardi*, *Trichospilus diatraeae* e *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Chalcidoidea) —
Important Biocontrol Agents

Article

Molecular Identification of *Palmistichus elaeisis*, *Tetrastichus howardi*, *Trichospilus diatraeae* and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Chalcidoidea) – Important Biocontrol Agents

Izabella de Lima Palombo ^{1,†}, Fabricio Fagundes Pereira ^{1,*†}, André Pessoa da Costa ¹, Patrik Luiz Pastori ², Alex Polatto Carvalho ², Andrea Renata da Silva Romero ³, André Vieira do Nascimento ³, Ana Maria Perez Obrien ³, Patricia Iana Schmidt ³, Carlos Reinier Garcia Cardoso ⁴ and Marcelo Teixeira Tavares ⁵

¹ Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais. Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados/Itahum, Km 12, Dourados 79804-970, MS, Brazil; izabella.palombo060@academico.ufgd.edu.br (I.d.L.P.); andrecoستا1970@hotmail.com (A.P.d.C.)

² Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados/Itahum, Km 12, Dourados 79804-970, MS, Brazil; patrikpastori@ufgd.edu.br (P.L.P.); alexpolatto@hotmail.com (A.P.C.)

³ Empresa Agropartners Consulting, Centro, Araçatuba 16010-220, SP, Brazil; andrea@agropartners.com.br (A.R.S.R.); andrevn@agropartners.com.br (A.V.d.N.); anamaria@agropartners.com.br (A.M.P.O.); patricia@agropartners.com.br (P.I.S.)

⁴ Empresa Sistêmica Kovê Ltda., Rodovia Dourados/Itahum, Km 12, Dourados 79804-970, MS, Brazil; cr.garcia.cardoso@gmail.com (C.R.G.C.)

⁵ Centro de Ciências Humanas e Naturais, Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória 29043-900, ES, Brazil; tavares.mt@gmail.com (M.T.T.)

* Correspondence: fabriciofagundes@ufgd.edu.br (F.F.P.); Tel.: +55-67-98134-5574 or +55-67-3410-2198

† These authors contributed equally to this work.

Simple Summary

Parasitoid wasps play a fundamental role in the biological control of pests. However, their morphological identification can be limited due to the high morphological similarity between species. Our objective was to identify specific genomic variants of the target species *Palmistichus elaeisis*, *Tetrastichus howardi*, *Trichospilus diatraeae* and *Trichogramma pretiosum* by whole-genomic sequencing. The parasitoids were collected from their hosts and reared in the laboratory. Subsequently, samples composed of adult specimens were preserved in absolute ethanol for morphological and molecular identification. Genomic sequencing generated high-quality data for the four parasitoid species analyzed, allowing for the consistent identification of specific genomic variants. These results provide a precise molecular tool for distinguishing parasitoids used in biological control programs.

Abstract

Parasitoid wasps play a fundamental role in the biological control of pests. However, their morphological identification may be limited due to their small size and the high morphological similarity between species. Our objective was to identify specific genomic variants of the target species *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle, 1993, *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893), *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942, and *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, (Hymenoptera: Chalcidoidea) by whole-genomic sequencing. Parasitoids were collected from their hosts and established in the laboratory after adult emergence. A sample of each parasitoid was sent to the Departamento de Ciências Biológicas at Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) and “Oscar Monte” Entomophagous Insect Collection for morphological identification. Subsequently, samples composed of 20 individuals were preserved in absolute ethanol for DNA extraction. The DNA was

Academic Editor: Lin Jin

Received: 12 February 2026

Revised: 30 March 2026

Accepted: 2 April 2026

Published: 5 April 2026

Copyright: © 2026 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the [Creative Commons Attribution \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

extracted, quantified and sequenced on the Illumina Novaseq 6000 platform. Bioinformatic tools were used for quality control, detection of specific genomic variants, principal component analysis (PCA), and support vector machine (SVM). Genomic sequencing generated high-quality data for the analyzed parasitoids, allowing the identification of four specific variants for *P. elaeisis*, two for *Te. howardi*, four for *Ts. diatraeae* and five for *Tg. pretiosum*. These results provide a precise molecular tool for distinguishing parasitoids used in biological control programs.

Keywords: biological control; parasitoids; genomic sequencing

1. Introduction

Parasitoid wasps act as natural enemies of a wide range of arthropods, being widely used as biological control agents to regulate insects that cause economic damage in agricultural and forestry systems [1]. In recent years, several parasitoid species have been identified and recorded as biological products in agricultural crops in Brazil [2,3]. Examples include the gregarious endoparasitoids *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle, 1993, *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893), *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae), and the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). These species are used to control various lepidopteran species, especially in integrated pest management programs [2].

Accurate identification of these species is fundamental for the success of biological control programs, since incorrect identification can compromise the efficiency of parasitoid releases and the interpretation of ecological interactions. Traditionally, insect identification is based on the description and classification of species according to observable external and internal characteristics [4]. However, in groups of parasitoid wasps, this approach has some limitations due to the great diversity of species, their minuscule body size, and the high demand for specialized taxonomic expertise [5].

The challenges of species identification are evident in the families Eulophidae and Trichogrammatidae due to the number of morphologically similar species. The family Eulophidae comprises approximately 6000 described species distributed across 347 genera and exhibits high morphological and genetic diversity [6,7]. Species such as *P. elaeisis*, *Te. howardi*, and *Ts. diatraeae* share morphological and behavioral similarities in host selection, frequently parasitizing the eucalyptus brown looper *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) and the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) thereby contributing to insect population balance [2,8,9]. Similarly, Trichogrammatidae has a worldwide distribution and is represented by 89 genera and more than 800 described species of egg parasitoid wasps [10]. Among these, *Tg. pretiosum* can be easily confused with other species of the genus, since its identification depends on the combination of morphological characteristics of the male genitalia, type of antennae, wings and body pigmentation [11,12]. This is one of the most utilized species for the biological control of tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), in tomato crops in Brazil [13].

Due to the economic and ecological importance of these parasitoid insects, the correct identification of species is fundamental for the success of biological control programs. In this context, molecular approaches have emerged as complementary tools for the rapid and accurate identification and differentiation of species [14]. More consistent genetic information is available for *Tg. pretiosum* [15,16], whereas *P. elaeisis*, *Te. howardi*, and *Ts. diatraeae* remain underrepresented in molecular studies.

To date, available molecular data for these species are restricted to specific genetic markers, such as mitochondrial genes or ribosomal regions. Although useful, these markers may have limited resolution for distinguishing closely related species [17]. Genomic variants correspond to differences in the deoxyribonucleic acid (DNA) sequence among individuals or species and represent an important source of genetic information for comparative genomic analyses. These variants include single-nucleotide polymorphisms (SNPs), insertions and deletions (indels), and other structural differences distributed across the genome, which can provide higher resolution for distinguishing closely related taxa [18].

The complete mitochondrial genome of *Te. howardi* has been sequenced, providing insights into its genetic composition and phylogenetic relationships within the family Eulophidae [19]. Similarly, the 28S rDNA region of *Ts. diatraeae* has been sequenced, with phylogenetic analyses corroborating its placement within this family [20].

In contrast, whole-genome sequencing (WGS) is a flexible high-throughput technology that enables the generation of whole-genome data and the construction of genomic libraries, allowing the identification of unique regions distributed throughout the genome and providing a more robust alternative for the molecular identification of these parasitoids [21]. Furthermore, it is possible to analyze genomic variants that correspond to differences in DNA sequences within species. Among these, the analysis of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) is a powerful tool for genetic studies, evolutionary processes, and comparative analyses between taxa. SNPs are widely used due to their abundance in genomes and their functional relevance [18].

In this study, we employed Illumina NovaSeq 6000 sequencing to generate complete genomic data and identify polymorphic regions to differentiate species-specific genomic variants, thereby ensuring accurate identification for biological control programs [22]. Therefore, our objective was to identify specific genomic variants of the target species *P. elaeisis*, *Te. howardi*, *Ts. diatraeae* and *Tg. pretiosum* by whole-genomic sequencing.

2. Materials and Methods

The work was developed at the Laboratory of Biological Control of Insects (LECOBIOL) of the Federal University of Grande Dourados in the city of Dourados, state of Mato Grosso do Sul, Brazil, in partnership with Agropartners Consulting Company of Araçatuba, São Paulo, Brazil.

2.1. Insect Collection

Parasitoids were collected from their hosts, and a rearing was established at LECOBIOL after adult emergence. The species *P. elaeisis* and *Ts. diatraeae* were obtained from pupae of *T. arnobia* in eucalyptus crops [23,24], while *Te. howardi* was collected in pupae of *D. saccharalis* in sugarcane stalks [25]. A sample of each pupal parasitoid was sent to the Departamento de Ciências Biológicas at Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) for morphological identification. Following population establishment in the laboratory, these species were reared on alternative hosts such as *Anticarsia gemmatilis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) and *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae).

Trichogramma pretiosum was obtained from eggs of *Iridopsis panopla* (Prout, 1932) (Lepidoptera: Geometridae) in eucalyptus crops [26]. The eggs were maintained under controlled conditions (25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ relative humidity, and a 14 h photophase) until parasitoid emergence. Specimens were sent to the “Oscar Monte” Entomophagous Insect Collection, located in Campinas, São Paulo, Brazil, at the Reference Laboratory Unit for Biological Control of the Biological Institute under the care of Dr. Nadja Nara Pereira da

Silva. Subsequently, *Tg. pretiosum* were maintained in eggs of host *Ephestia kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) [2].

2.2. DNA Extraction, Quantification and Sequencing

Each sample consisted of a pool of 50 adult individuals of the same species preserved in absolute ethanol and identified as PA03 (*P. elaeisis*), TH04 (*Te. howardi*), TD01 (*Ts. diatraeae*) and TP02 (*Tg. pretiosum*). Genomic DNA extraction was performed using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's protocol for insects [27]. Briefly, specimens were homogenized in 400 µL of lysis buffer, followed by the addition of 20 µL of Proteinase K, and incubated at 56 °C for 30 min to promote cell digestion. After incubation, samples were centrifuged at approximately 10,000× g for 1 min to pellet cellular debris. The supernatant containing genomic DNA was then transferred to a new tube and subjected to purification using a silica column system.

DNA quality was initially assessed by measuring the 260/280 absorbance ratio using a biophotometer. DNA concentration was quantified using the Quantus™ Fluorometer (Promega, Madison, WI, USA) together with the QuantiFluor® ONE dsDNA System reagent (Promega, Madison, WI, USA), following manufacturer's recommendations.

Genomic libraries were prepared using the ABclonal Rapid Plus DNA Lib Prep Kit for Illumina V2 (ABclonal, Wuhan, China) and sequenced on the Illumina Novaseq 6000 platform (Illumina, San Diego, CA, USA), using the paired-read method (PE150), targeting an average sequencing depth of approximately 30 × per sample. The choice of method was based on practicality for preparing libraries based on the selected genomic variants due to its high-throughput capacity and suitability for generating high-quality paired-end reads, enabling robust detection of genomic variation for comparative analyses among species, including those lacking reference genomes [28]. The resulting high-quality sequences were deposited in the GenBank Sequence Read Archive (SRA) under accession number: SRS24932171 for *P. elaeisis*, SRS24932172 for *Te. howardi*, SAMN48318921 for *Ts. diatraeae* and SRS24932169 for *Tg. pretiosum*.

2.3. Bioinformatic Analysis for Variant Detection

Raw sequencing read quality was assessed using FastQC (v0.11.8). Subsequently, reads were filtered and trimmed using fastp (v0.24.0) to remove adapters, poly-G tails associated with NovaSeq technology, and low-quality bases [29]. Reads shorter than 50 bp after filtering were discarded and the first 10 bases from the 5' end of each read were trimmed to reduce potential sequencing biases. Sequencing summary statistics, including the number of reads and mean read length per sample before and after quality control, are presented in Table 1.

Table 1. Summary of sequencing reads and read length before and after quality control filtering.

Sample	Species	Number of Reads	Mean Read Length (bp)
BJ24000564-TH04	<i>Tetrastichus howardi</i>	31,074,280	150
BJ24000564-TH04_QC	<i>Tetrastichus howardi</i>	30,943,738	140
PA03	<i>Palmistichus elaeisis</i>	41,805,363	150
PA03_QC	<i>Palmistichus elaeisis</i>	41,693,209	140
TD01	<i>Trichospilus diatraeae</i>	43,207,578	150
TD01_QC	<i>Trichospilus diatraeae</i>	43,040,652	140
TP02	<i>Trichogramma pretiosum</i>	111,828,317	150
TP02_QC	<i>Trichogramma pretiosum</i>	111,157,289	140

In order to identify the most suitable reference genome for maximizing species differentiation, a literature review was conducted to illustrate the phylogenetic proximity between the studied taxa and species with available genomic resources [30]. Based on this analysis, the four target species of this study (*Tetrastichus howardi*, *Palmistichus elaeisis*, *Trichospilus diatraeae*, and *Trichogramma pretiosum*) were aligned against three selected reference genomes: *Aphelinus certus* (Yasnosh, 1963) (Hymenoptera: Aphelinidae) and *Chouioia cunea* (Yang, 1989) (Hymenoptera: Eulophidae) and *Trichogramma pretiosum* (GenBank assembly accession GCA_000599845.3). Reference species were selected based on the availability of complete genomes in public databases and their relatively close phylogenetic relationship with the studied taxa. Sequences were aligned to identify the greatest number of common regions across the target species, considering only biallelic variants and excluding variants fixed among species, thereby enabling efficient genetic differentiation.

Filtered sequences were aligned to the selected reference genomes using the Burrows–Wheeler Aligner (BWA, v0.7.17) [31], allowing the identification of genomic regions shared among the studied species [16]. Alignment files were processed using BEDTools (v2.30.0) [32], allowing the identification of overlapping genomic intervals among the four target species for comparative genomic variant detection. Variant calling was performed using the mpileup algorithm implemented in SAMtools (v1.15) [33], retaining only biallelic single-nucleotide variants (SNVs). Variants were filtered according to the following criteria: sequencing depth greater than 10 reads ($DP > 10$), absence of multi-allelic sites, and removal of variants that were fixed between species or lacked at least 20 base pairs of high-quality flanking sequence on each side, ensuring sufficient genomic context for reliable downstream analyses. Only variants meeting these criteria were retained, ensuring their applicability for genetic discrimination among the studied taxa.

To validate the most suitable reference genome, a principal component analysis (PCA) was performed with two approaches: (i) using variants with a call rate above 0.5, and (ii) using variants present in the species of interest, enabling comparisons between the first principal component (PC1) observed in the sampling points of the following graphs. Subsequently, the selection of candidate variants was verified using the support vector machine (SVM) model for identification [31].

2.4. Principal Component Analysis, Marker Selection and Distance-Based Validation

Principal component analysis (PCA) was performed to explore the structure of the data and to identify highly informative markers. Two filtering strategies were applied: (i) variants with call rate > 0.5 , and (ii) variants shared among all four species of interest and without missing data across samples. Considering the small sample size ($n = 4$), this threshold corresponds to variants genotyped in at least two samples, allowing retention of informative loci while minimizing data loss.

The PCA was conducted using the `prcomp` function in R [34], based on a matrix of allele proportions (reference allele dosage) that was centered and scaled. The analysis was used in an exploratory manner to identify markers with the highest contributions to PC1, PC2, and PC3, which were subsequently selected for downstream analyses aimed at species differentiation.

To quantitatively evaluate the discriminatory power of the selected markers, pairwise Euclidean distances were calculated from the same scaled matrix using the `dist` function in R version 4.4.2 [34]. The resulting distance matrix was visualized as a heatmap with hierarchical clustering using the `pheatmap` package [35]. Subsequently, candidate variants were further evaluated using the support vector machine (SVM) model for species classification [36], aiming to validate their discriminatory power among the studied taxa.

2.5. Sample Simulation

Considering the limited number of sequences available in the sample set of the target species, additional samples with similar genetic profiles were simulated to expand the test population and evaluate the robustness of variants for species differentiation in different scenarios. Sixty pure samples were simulated, with replications of the individual genetic profiles of *P. elaeisis*, *Te. howardi*, *Ts. diatraeae* and *Tg. pretiosum*. To evaluate the ability of variants to correctly identify different taxa, 18 mixed samples were generated, combining pairs of species in proportions of 25–75%, 50–50%, and 75–25%.

To validate the efficiency of the selected genetic variants, the data were subjected to PCA with two approaches: (i) using variants with a call rate above 0.5, and (ii) using variants present in the species of interest, allowing comparisons between the first principal component (PC1). Selected variants were validated in silico by the SVM model to predict species.

3. Results

3.1. Reference Genome

Genome sequencing generated high-quality data for the four parasitoid species analyzed (*P. elaeisis*, *Te. howardi*, *Ts. diatraeae*, and *Tg. pretiosum*), enabling the consistent identification of genomic variants in regions shared among taxa. The quality of the obtained sequences and the performance of the bioinformatic analysis allowed comparisons among the available reference genomes (Table S1).

The results indicate differences in performance among the evaluated reference genomes when considering variant detection and interspecies comparability (Table 2). Although *C. cunea* presented the highest total number of variants ($n = 24,316$) and *Tg. pretiosum* showed the highest number of common variants ($n = 866$), these results were also associated with a higher proportion of low-depth variants ($DP < 10$), which may affect the overall reliability of variant detection. Therefore, these metrics alone were not sufficient to ensure consistent discrimination among species.

In contrast, *A. certus* exhibited a more balanced performance across multiple criteria, including a lower number of fixed variants ($n = 296$) and a consistent proportion of high-quality variants, showing more consistent variant detection and alignment among allelic sequences across the analyzed species (Table 2).

Table 2. Selection of variants in the common regions of the target species *Palmistichus elaeisis*, *Tetrastichus howardi*, *Trichospilus diatraeae* and *Trichogramma pretiosum* with reference species *Aphelinus certus*, *Chouioia cunea* and *Tg. pretiosum* (Hymenoptera: Chalcidoidea). DP (Depth): depth of coverage. CR (Call rate): proportion of variants correctly identified.

Reference	Total	Indels and Multiallelic Systems	DP < 10	Quality	Fixes	Common Among the Four	CR > 0.5	TOP100
<i>Trichogramma pretiosum</i>	173,167	57,792 (33.34%)	95938 (55.35%)	18,164 (10.47%)	387 (0.22%)	866	4725	0
<i>Chouioia cunea</i>	192,976	25,543 (13.21%)	142,469 (73.71%)	24,316 (12.58%)	299 (0.15%)	349	5247	109 (82 + 27) ¹
<i>Aphelinus certus</i>	121,009	17,355 (14.32%)	86,667 (71.52%)	16,162 (13.46%)	296 (0.24%)	529	3166	88 (88 + 0) ¹

¹ Sum of Major Components (PC1 + PC2) of common regions.

The PCA, used here as an additional validation step, revealed clear differences among the evaluated reference genomes in terms of consistency and informativeness of variant detection. *Aphelinus certus* showed the highest concordance between the two

filtering strategies, presenting the largest number of variants simultaneously identified in both approaches and shared across all four species (Table 2). Among the top-ranked variants contributing to PC1, 88 were common in the *A. certus* reference, compared to 82 for *C. cunea* and none for *Tg. pretiosum*, indicating greater robustness and reproducibility in the variants identified using *A. certus*.

Furthermore, *A. certus* exhibited the highest average length of shared genomic regions, suggesting improved continuity of aligned segments and a more reliable representation of polymorphic sites (Table 3). Overlaps as short as 1 bp may occur due to the intersection of regions across species. These results, together with the quality metrics described above, support the selection of *A. certus* as the most suitable reference genome for subsequent analyses.

Table 3. Characterization of the number of overlapping genomic regions shared among *Palmistichus elaeisis*, *Tetrastichus howardi*, *Trichospilus diatraeae* and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Chalcidoidea). Values correspond to the minimum, median, mean, and maximum lengths of these regions expressed in base pairs (bp).

Reference	Number of Regions	Minimum Length ¹	Median Length ¹	Mean Length ¹	Maximum Length ¹
<i>Trichogramma pretiosum</i>	244,745	1	16	19.23	934
<i>Chouioia cunea</i>	201,397	1	17	21.64	1934
<i>Aphelinus certus</i>	150,825	1	14	22.72	1132

¹ Length of overlapping genomic regions.

3.2. Variant Identification and Differentiation

PCA provided evidence for separation between species based on identified genomic variants. The first two principal components (PC1 and PC2) clearly separate the TP02 sample from the other samples with major variation along the first principal component which explains 51.12% of the total variation. From this separation, 15 candidate variants were identified as informative for species differentiation, of which 12 were able to perform this distinction in pairs, totaling 27 variants. In contrast, TD01 and TH04 appear closer, indicating a reduced genetic distance based on the evaluated variants. The second and third PC projections reinforce the differentiation among the samples, with TD01 showing a greater separation along the PC3, which explains 15.07% of the variation (Figure 1).

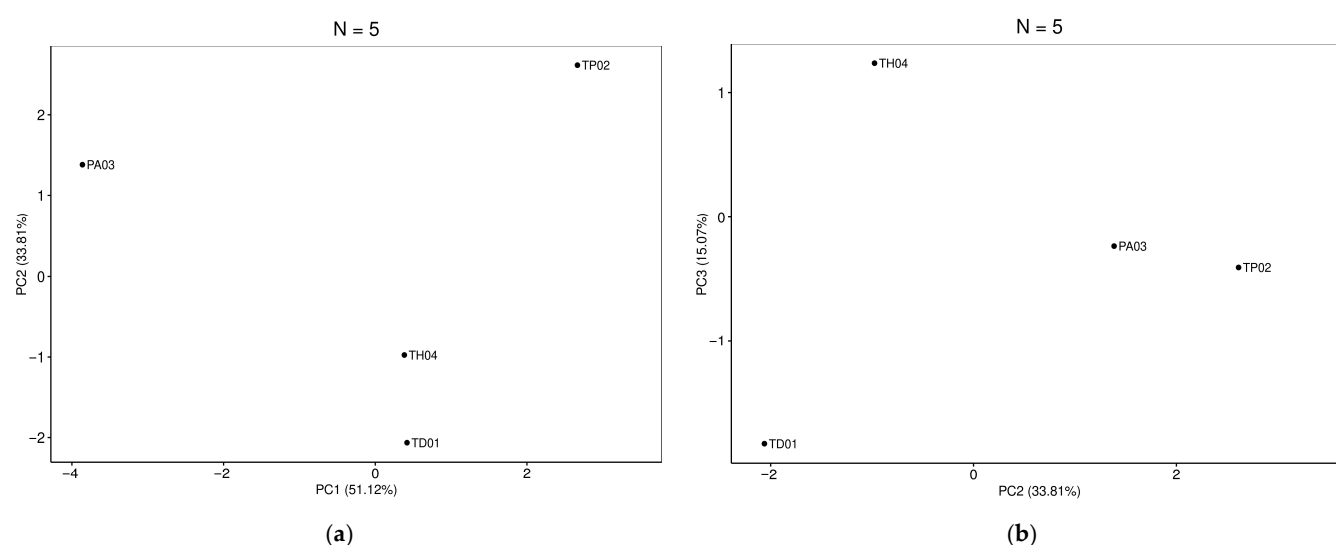


Figure 1. Principal component analysis (PCA) based on the most informative variants. **(a)** Projection of the samples in the space formed by the components PC1 (51.12%) and PC2 (33.81%), indicating the separation between the species. **(b)** Projection of the same samples in the PC2 (33.81%) and PC3 (15.07%) planes, reinforcing the consistency of the separation observed between the genetic groups.

This pattern is further supported by the Euclidean distance heatmap, which provides a quantitative assessment of genetic relationships among samples (Figure 2). The heatmap reveals shorter pairwise distances between TD01 and TH04, confirming their closer genetic relationship, while TP02 exhibits greater distances in relation to the other samples, consistent with the separation observed in the PCA. Overall, the Euclidean distance analysis reinforces the effectiveness of the selected variants in capturing interspecific genetic differentiation.

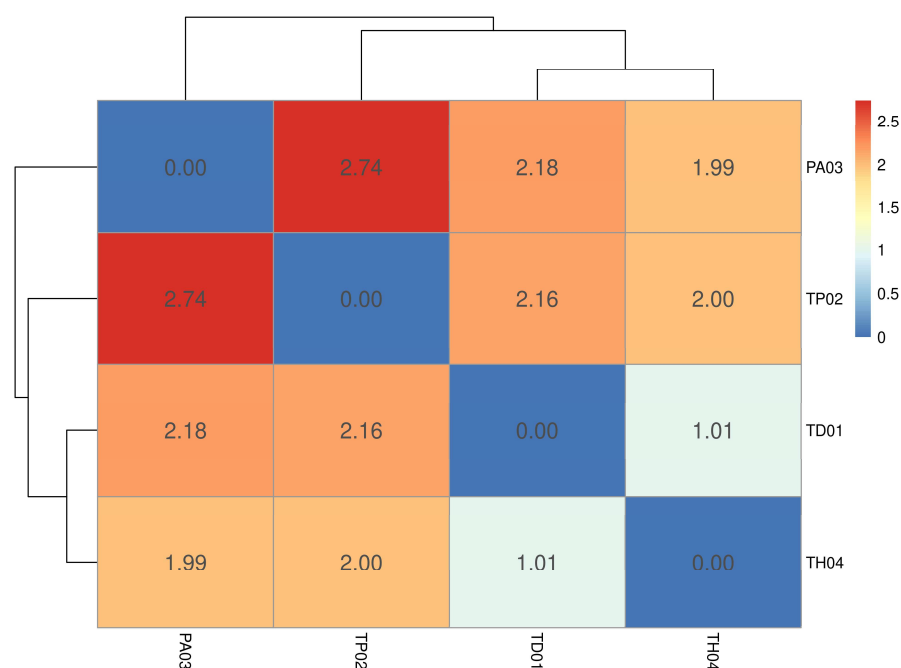


Figure 2. Heatmap of Euclidean distances among samples based on the selected set of informative genomic variants. Color intensity ranges from blue (lower genetic distance; 0) to red (higher genetic distance; 2.5), representing the magnitude of pairwise dissimilarity. Numerical values within each cell indicate the exact Euclidean distance between sample pairs.

From this dataset, a subset of diagnostic variants was selected based on their contribution to species differentiation as identified through PCA and Euclidean distance analyses, as well as their allele frequency distribution among species. Table 4 summarizes SNPs showing species-specific patterns, in which the variant allele was fixed or highly frequent in one species while absent or rare in the others. Using this criterion, four diagnostic variants were identified for *P. elaeisis*, two for *Te. howardi*, four for *Ts. diatraeae* and five for *Tg. pretiosum* allowing their identification of each species individually. In addition to species-specific markers, a set of variants capable of differentiating species in pairwise comparisons was also identified (Table 5). These SNPs display contrasting allele frequencies between species pairs, allowing discrimination between combinations of taxa rather than a single exclusive lineage.

An SVM model was implemented to test the efficiency of these variants in identifying the target species. The performance of the model was evaluated in both pure and mixed samples between multiple species, demonstrating high accuracy in the identification of the target species. The simulation of these species showed that mixed samples were

positioned between their respective parental species, supporting the discriminatory capacity of the selected SNPs observed in the PCA (Figure 3).

Each variant was analyzed considering the 50 base pair flanking sequence on each side of the SNP (single-nucleotide polymorphism) type variant, allowing the construction of species-specific probes. This flanking length was defined based on standard criteria for primer and probe design, as regions of 18–25 bp free of variation are generally sufficient for primer binding [37], and the use of ~50 bp on each side ensures adequate sequence context for the selection of primers with suitable physicochemical properties and efficient amplification.

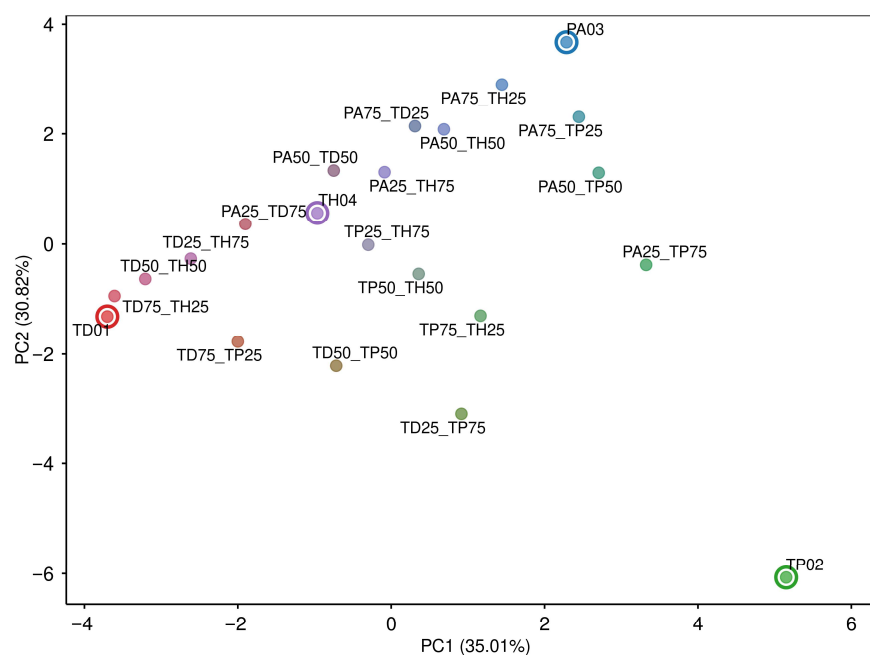


Figure 3. PCA based on simulations of mixed samples, evidencing the clear separation of pure samples and reinforcing the selection of informative variants.

Table 4. Specific variants of the target species *Palmistichus elaeisis* (PA03), *Tetrastichus howardi* (TH04), *Trichospilus diatraeae* (TD01) and *Trichogramma pretiosum* (TP02) (Hymenoptera: Chalcidoidea) that allow their individual identification.

Variants	Freq					GQ *					Specific
	PA03	TD01	TP02	TH04	TH04	PA03	TD01	TP02	TH04	TH04	
CM037083.1_8482984	1	0	1	1	1	127	127	127	127	117	TD01
CM037083.1_8483193	0	0	0	1	1	127	127	127	127	127	TH04
CM037083.1_8534743	0	0	0.004	1	1	127	127	127	127	127	TH04
CM037085.1_14072991	0.05	0.016	1	0	0	33	127	102	127	104	TP02
CM037087.1_13816	0	0.959	0.953	1	1	24	127	127	38	15	PA03
CM037087.1_13892	1	0.005	0.977	1	1	84	127	127	63	30	TD01
CM037087.1_3202	0.93	0.914	0	1	0.984	70	37	127	127	127	TP02
CM037087.1_3220	0	0.972	1	1	1	127	70	127	127	127	PA03
CM037087.1_8678	0.965	0	0.021	0	0	127	127	126	127	127	PA03
CM037087.1_8773	0.009	0.041	0.991	0	0	127	127	127	127	127	TP02
CM037087.1_8956	0	0.974	1	1	1	127	127	127	127	65	PA03
CM037087.1_9160	0.026	0	1	0	0	127	127	127	127	127	TP02
JAJGXB010002921.1_86	0.012	0	1	0	0	127	127	127	127	127	TP02
JAJGXB010011211.1_115	1	0	0.996	1	1	127	127	127	127	127	TD01

JAJGXB010011928.1_660	1	0	0.995	1	1	73	53	52	89	80	TD01
-----------------------	---	---	-------	---	---	----	----	----	----	----	------

* GQ (Genotype Conditional Quality): Represents the quality of the genotypic call, encoded with Phred score and calculated by the formula ($10\log_{10} (p(\text{genotype call is wrong} \mid \text{site is variant}))$); Higher GQ values indicate greater confidence in the accuracy of the assigned genotype.

Table 5. Variants for pairwise differentiation of the target species *Palmistichus elaeisis* (PA03), *Tetrastichus howardi* (TH04), *Trichospilus diatraeae* (TD01) and *Trichogramma pretiosum* (TP02) (Hymenoptera: Chalcidoidea).

Variants	PA03	TD01	TP02	TH04	TH04	*GQ_PA03	GQ_TD01	GQ_TP02	GQ_TH04	GQ_TH04	* Low	* High
CM037083.1_8483200	1	0	0	1	0.987	127	127	127	127	127	TD01 × TP02	PA03 × TH04
CM037083.1_8483224	0	0.996	0	1	1	127	127	127	127	127	PA03 × TP02	TD01 × TH04
CM037085.1_14072988	0	0	1	1	1	121	127	112	127	76	PA03 × TD01	TP02 × TH04
CM037087.1_15154	0.991	0.992	0	0	0	127	127	127	127	127	TP02 × TH04	PA03 × TD01
CM037087.1_3238	0.994	1	0	0	0	127	127	127	127	127	TP02 × TH04	PA03 × TD01
CM037087.1_3241	0.006	1	0	1	1	127	127	127	127	127	PA03 × TP02	TD01 × TH04
CM037087.1_8968	0	1	1	0	0	127	127	127	127	76	PA03 × TH04	TD01 × TP02
CM037087.1_9106	1	0	1	0	0	127	127	127	127	127	TD01 × TH04	PA03 × TP02
CM037087.1_9133	0.005	0	1	1	1	127	127	127	127	127	PA03 × TD01	TP02 × TH04
JA-JGXB010000273.1_8514	0	1	1	0	0	127	127	127	127	127	PA03 × TH04	TD01 × TP02
JA-JGXB010011211.1_107	1	0	0	1	1	127	127	127	127	127	TD01 × TP02	PA03 × TH04
JA-JGXB010012658.1_191	1	0	1	0	0	127	127	127	127	100	TD01 × TH04	PA03 × TP02

* GQ (Genotype Conditional Quality): Represents the quality of the genotypic call, encoded with Phred score and calculated by the formula ($10\log_{10} (p(\text{genotype call is wrong} \mid \text{site is variant}))$); Higher GQ values indicate greater confidence in the accuracy of the assigned genotype. * Low: contains the species pairs with low frequency of the respective variant; High: shows the pairs with high frequency. Contributing to the differentiation between species.

4. Discussion

Accurate species identification is essential for effective biological control. In this study, we established a molecular approach based on whole-genome sequencing to identify four parasitoid species *P. elaeisis*, *Te. howardi*, *Ts. diatraeae* and *Tg. pretiosum*. The identification of species-specific genomic variants provides a new resource for the reliable recognition of these biological control agents. In addition, the availability of genomic sequences in public databases such as GenBank enables future studies comparing

populations from different regions, investigating phylogenetic relationships, and supporting systematic and comparative analyses [4].

An important methodological step in this study was the selection of reference genome for specific variant detection. Among the evaluated references, *A. certus* showed the best alignment performance, allowing the identification of informative genomic variants based on differences in nucleotide base calls that distinguished the target species. Although the use of a phylogenetically distant reference genome may reduce mapping efficiency and the number of variants detected, the generation of species-specific reference genomes still requires highly validated DNA sequences, advanced bioinformatics knowledge, and substantial financial investment [38]. Consequently, the use of reference genomes from related species has become a common strategy in genomic studies of non-model organisms when specific resources are not available [39]. Even under these conditions, informative variants can still be detected, preserving biologically significant patterns, such as the molecular discrimination of insects previously identified by morphological methods [40].

High-quality genomic sequencing technologies enable the generation of reference genomes and population datasets, contributing to biodiversity monitoring, conservation, and environmental restoration efforts [41]. In biological control programs, parasitoid populations are often multiplied for several generations in biofactories, which may lead to genetic changes associated with mass rearing [2]. Recent studies have shown that long-term mass rearing can reduce genetic diversity and alter population structure, highlighting the importance of genetic monitoring of biological control agents [42]. In the present study, the analysis of simulated mixed samples demonstrated the high accuracy of the selected genomic variants for species identification, even when one species represented only 25% of the sample and another species had 75% representation.

There is no doubt that DNA barcoding sequencing has become a standard and efficient genetic approach for species identification and biodiversity monitoring [43]. Over the years, molecular markers such as COI, ITS2, and 28S have been widely used in studies of parasitoid wasps [44–46]. Beyond their taxonomic applicability, these markers have also contributed to understanding processes such as speciation, gene flow, and local adaptation, particularly in ITS2 regions with discriminatory potential among closely related species [47,48]. In addition, markers such as COI and ITS2 have proven useful in quality control of mass rearing by enabling the identification of parasitoid lineages and the investigation of parasitoid–host interactions, including comparisons of genes encoding venom proteins between populations [49,50]. Together, these studies highlight the importance of molecular markers for distinguishing species at both intra- and interspecific levels.

However, sequencing small loci from informative DNA regions may limit the accurate characterization of genetic and taxonomic diversity within communities [41]. In this context, whole-genome sequencing allows the detection of species-specific variants, such as SNPs and indels, providing greater resolution for distinguishing closely related or morphologically similar taxa [16,21,51]. This approach also enables a more detailed investigation of the genetic bases of adaptive traits in insects, including mechanisms related to environmental adaptation and other evolutionary responses [52].

Furthermore, genomic datasets and publicly deposited sequences facilitate comparisons among lineages from different geographic regions and support the genetic monitoring of parasitoid populations used in biological control programs [49,53]. Thus, the advances obtained through whole-genomic sequencing and genetic analyses in this study contribute directly to strengthening the scientific bases of parasitoid production, promoting more efficient, reliable, and sustainable biological control programs.

5. Conclusions

The combination of high-quality DNA extraction and whole-genome sequencing enabled the identification of species-specific genomic variants for *P. elaeisis*, *Te. howardi*, *Ts. diatraeae* and *Tg. pretiosum*. The approach presented here establishes a novel genomic methodology for the precise molecular identification of these parasitoid species, including mixed samples. By providing reliable genetic markers and publicly available genomic data, these findings open new avenues for future research and have the potential to optimize the application of these species as biological control agents in sustainable agricultural and forestry systems.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/insects17040395/s1>, Table S1: Comparative sequencing and alignment metrics across reference genomes for the four parasitoid species.

Author Contributions: Conceptualization, I.d.L.P. and F.F.P.; methodology, I.d.L.P., A.V.d.N., A.M.P.O., P.I.S. and A.R.d.S.R.; formal analysis, I.d.L.P., F.F.P., A.V.d.N., A.M.P.O., P.I.S. and A.R.d.S.R.; investigation, I.d.L.P. and F.F.P.; resources, F.F.P. and C.R.G.C.; data curation, A.V.d.N., A.M.P.O., P.I.S. and A.R.d.S.R.; software, A.R.d.S.R.; preparation of the original draft, writing—revision and editing, I.d.L.P., F.F.P., A.P.d.C., P.L.P., A.P.C., M.T.T., P.I.S. and C.R.G.C.; visualization, I.d.L.P., F.F.P. and P.L.P.; supervision, F.F.P.; project administration, F.F.P. and I.d.L.P.; obtaining financing, F.F.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The research project was funded by the Associação Sul-Mato-Grossense de Produtores and Consumidores de Florestas Plantadas—REFLORE MS: Projeto 86: CTR 01/2023/UFMG/ Controle de Pragas de Eucalipto com Macrobiológicos no Mato Grosso do Sul - Reflore 3.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article/supplementary material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Acknowledgments: The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the fellowship, which made it possible to carry out this course. CNPQ—Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and the FUNDECT—Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia provided financial support to the laboratory research. We are also grateful to the Associação Sul-Mato-Grossense de Produtores e Consumidores de Florestas Plantadas REFLORE for the trust and financial support of our research. We also received support from the Kovê Systemic, especially Carlos R. G. Cardoso, and the Koppert Brasil Company. F.F.P. thanks CNPq (Proc. #312021/2023-2). M.T.T. thanks FAPES (RONEM 1018/2022, P: 2022-KX881; PROFIX 657/2022, P: 2022-PTJH4), and INCT-HYMPAR (CNPq Proc. # 465562/2014-0; FAPESP Proc. # 2014/50940-2).

Conflicts of Interest: Authors Andrea Romero, André Nascimento, Ana Perez Obrien, and Patricia Schmidt were employed by the company Empresa Agropartners Consulting. Author Carlos Cardoso was employed by the company Empresa Sistêmica Kovê Ltda. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Giunti, G.; Canale, A.; Messing, R.H.; Donati, E.; Stefanini, C.; Michaud, J.P.; Benelli, G. Parasitoid learning: Current knowledge and implications for biological control. *Biol. Control* **2015**, *90*, 208–219. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.06.007>.
2. Pereira, F.F.; Pastori, P.L.; Kassab, S.O.; Torres, J.B.; Cardoso, C.R.G.; Fernandes, W.C.; Oliveira, H.N.; Zanuncio, J.C. Uso de eulofídeos no controle biológico de pragas. In *Controle Biológico Com Parasitoides E Predadores Na Agricultura Brasileira*; Parra, J.R.P., Pinto, A.S., Nava, D.E., Oliveira, R.C., Diniz, A.J.F., Eds.; Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz: Piracicaba, São Paulo, Brazil, 2021; pp. 317–361.

3. Wang, Y.; Nansen, C.; Zhang, Y. Integrative insect taxonomy based on morphology, mitochondrial DNA, and hyperspectral reflectance profiling. *Zool. J. Linn. Soc.* **2016**, *177*, 378–394. <https://doi.org/10.1111/zoj.12367>.
4. Smith, M.A.; Rodriguez, J.J.; Whitfield, J.B.; Deans, A.R.; Janzen, D.H.; Hallwachs, W.; Hebert, P.D. Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 12359–12364. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805319105>.
5. Rasplus, J.Y.; Blaimer, B.B.; Brady, S.G.; Burks, R.A.; Delvare, G.; Fisher, N.; Gates, M.; Gauthier, N.; Gumovsky, A.V.; Hansson, C.; Heraty, J.M. A first phylogenomic hypothesis for Eulophidae (Hymenoptera, Chalcidoidea). *J. Nat. Hist.* **2020**, *18*, 597–609. <https://doi.org/10.1080/00222933.2020.1762941>.
6. Burks, R.A.; Gumovsky, A.V.; Hansson, C.; Gates, M.W.; Domer, T.; Perry, R.K. Eulophidae. In *Chalcidoidea of the World*; Heraty, J., Woolley, J., Eds.; CABI International: Wallingford, UK, 2025; pp. 357–375.
7. UCD Community. 2023. Universal Chalcidoidea Database (UCD) Curated in TaxonWorks. Available online: <https://sfg.taxonworks.org/api/v1/> (accessed on 16 December 2025).
8. Gokhman, V.E.; Yefremova, Z.A.; Yegorenkova, E.N. Karyotypes of parasitic wasps of the family Eulophidae (Hymenoptera) attacking leaf-mining Lepidoptera (Gracillariidae, Gelechiidae). *Comp. Cytogenet.* **2014**, *8*, 31. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v8i1.6537>.
9. Pereira, F.F.; Kassab, S.O.; Calado, V.R.F.; Vargas, E.L.; de Oliveira, H.N.; Zanoncio, J.C. Parasitism and emergence of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) on *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae, pupae and adults. *Fla. Entomol.* **2015**, *98*, 377–380. <https://doi.org/10.1653/024.098.0164>.
10. Burks, R.A.; Pinto, J.D.; Lindsey, A.R. Trichogrammatidae. In *Chalcidoidea of the World*; Heraty, J., Woolley, J., Eds.; CABI International: Wallingford, UK, 2025; pp. 648–659. <https://doi.org/10.1079/9781800623545.0060>.
11. Querino, R.B.; Zucchi, R.A.; Pinto, J.D. Systematics of the Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) with a Focus on the Genera Attacking Lepidoptera. In *Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*; Consoli, F.L., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Eds.; Progress in Biological Control; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2009; Volume 9, pp. 197–218. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9110-0_7.
12. Hua, H.Q.; Zhao, Z.Y.; Zhang, Y.; Hu, J.; Zhang, F.; Li, Y.X. Inter- and Intra-Specific Differentiation of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Species Using PCR-RFLP Targeting COI. *J. Econ. Entomol.* **2018**, *111*, 1860–1867. <https://doi.org/10.1093/jee/toy119>.
13. Oliveira, C.M.; Oliveira, J.V.; Barbosa, D.R.S.; Breda, M.O.; França, S.M.; Duarte, B.L.R. Biological parameters and thermal requirements of *Trichogramma pretiosum* for the management of the tomato fruit borer (Lepidoptera: Crambidae) in tomatoes. *Crop Prot.* **2017**, *99*, 39–44. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2017.04.005>.
14. Frézal, L.; Leblois, R. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infect. Genet. Evol.* **2008**, *8*, 727–736. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.05.005>.
15. Yan, Z.C.; Qi, G.Y.; Yao, T.Y.; Li, Y.X. Mitochondrial genomes of two asexual *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) strains and comparison with their sexual relatives. *Insects* **2022**, *13*, 549. <https://doi.org/10.3390/insects13060549>.
16. Lindsey, A.R.; Kelkar, Y.D.; Wu, X.; Sun, D.; Martinson, E.O.; Yan, Z.; Rugman-Jones, P.F.; Hughes, D.S.T.; Murali, S.C.; Qu, J.; et al. Comparative genomics of the miniature wasp and pest control agent *Trichogramma pretiosum*. *BMC Biol.* **2018**, *16*, 54. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0520-9>.
17. Dong, Z.; Wang, Y.; Li, C.; Li, L.; Men, X. Mitochondrial DNA as a molecular marker in insect ecology: Current status and future prospects. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **2021**, *114*, 470–476. <https://doi.org/10.1093/aesa/saab020>.
18. Lozada-Chávez, A.N.; Bonizzoni, M. Identification of Single Nucleotide Polymorphism from Insect Genomic Data. In *Insect Genomics: Methods and Protocols*; Springer: New York, NY, USA, 2025; pp. 29–49. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4583-3_2.
19. Tang, X.; Lyu, B.; Lu, H.; Tang, J.; Meng, R.; Cai, B. Characterization of the mitochondrial genome of *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae). *Mitochondrial DNA Part B* **2021**, *6*, 2683–2685. <https://doi.org/10.1080/23802359.2021.1963340>.
20. Santos-Murgas, A.; Jaen, L.A. Contribución al conocimiento e identificación molecular de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitando pupas de *Agraulis vanillae* (Lepidoptera: Nymphalidae) en cultivos de *Passiflora edulis* (Platae: Passifloraceae) en Panamá. *Acta Zoológica Mex.* **2025**, *41*, 1–10. <https://doi.org/10.21829/azm.2025.4112738>.
21. Ahmed, Z.; Renart, E.G.; Zeeshan, S. Genomics pipelines to investigate susceptibility in whole genome and exome sequenced data for variant discovery, annotation, prediction and genotyping. *PeerJ* **2021**, *9*, e11724. <https://doi.org/10.7717/peerj.11724>.

22. Modi, A.; Vai, S.; Caramelli, D.; Lari, M. The Illumina Sequencing Protocol and the NovaSeq 6000 System. In *Bacterial Pangenomics*; Mengoni, A., Bacci, G., Fondi, M., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana: New York, NY, USA, 2021; Volume 2242, pp. 15–42. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1099-2_2.
23. Pereira, F.F.; Zanuncio, T.V.; Zanuncio, J.C.; Pratisoli, D.; Tavares, M.T. Species of Lepidoptera defoliators of *Eucalyptus* as new host for the parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2008**, *51*, 259–262. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000200004>.
24. 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* **2008**, *36*, 304–306. <https://doi.org/10.1007/BF02980777>.
25. Vargas, E.L.; Pereira, F.F.; Tavares, M.T.; Pastori, P.L. Record of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Diatraea* sp. (Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane crop in Brazil. *Entomotropica* **2011**, *26*, 143–146.
26. dos Santos, F.H.M.; Pereira, F.F.; Cardoso, C.R.G.; Lucchetta, J.T.; Santos, J.P.; Ramos, L.F.N.; dos Santos, F.A. First record of *Trichogramma pretiosum* parasitizing *Iridopsis panopla* eggs in eucalyptus in Brazil. *Fla. Entomol.* **2024**, *107*, 20240042. <https://doi.org/10.1515/flaent-2024-0042>.
27. Blood, D.; Kits, T. *DNeasy Blood and Tissue Handbook*; QIAGEN: Hilden, Germany, 2023.
28. Pasquinelli, E.; Rollo, G.; Tinella, F.; Danelli, M.; Minetto, S.; Casamassima, G.; Renieri, A. Validation of the NovaSeq6000 Platform and automated library preparation for CE-IVD equivalence. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2025**, *27*, 4838–4845. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2025.10.051>.
29. Chen, S.; Zhou, Y.; Chen, Y.; Gu, J. fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* **2018**, *34*, i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>.
30. Symonds, M.R.; Elgar, M.A. The evolution of body size, antennal size and host use in parasitoid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea): A phylogenetic comparative analysis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e78297. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078297>.
31. Li, H.; Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>.
32. Quinlan, A.R.; Hall, I.M. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>.
33. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *15–25*, 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.
34. R-Core Team. R Version 4.4.2 (Pile of Leaves). Available online: <https://www.r-project.org/> (accessed on 2 February 2025).
35. Kolde, R. Package ‘pheatmap’. R package version 1.0.13; 2025, 1, 790. Available online: <https://cran.ms.unimelb.edu.au/web/packages/pheatmap/pheatmap.pdf> (accessed on 18 February 2025).
36. Noble, W.S. What is a support vector machine? *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1565–1567. <https://doi.org/10.1038/nbt1206-1565>.
37. Dieffenbach, C.W.; Lowe, T.M.; Dveksler, G.S. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl.* **1993**, *3*, S30–S37. <https://doi.org/10.1101/gr.3.3.S30>.
38. Bohling, J. Evaluating the effect of reference genome divergence on the analysis of empirical RADseq datasets. *Ecol. Evol.* **2020**, *10*, 7585–7601. <https://doi.org/10.1002/ece3.6483>.
39. Ellegren, H. Genome sequencing and population genomics in non-model organisms. *Trends Ecol. Evol.* **2014**, *29*, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.09.008>.
40. Ekblom, R.; Wolf, J.B. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. *Evol. Appl.* **2014**, *7*, 1026–1042. <https://doi.org/10.1111/eva.12178>.
41. Theissinger, K.; Fernandes, C.; Formenti, G.; Bista, I.; Berg, P.R.; Bleidorn, C.; Bombarely, A.; Crottini, A.; Gallo, G.R.; Godoy, J.A.; et al. How genomics can help biodiversity conservation. *Trends Genet.* **2023**, *39*, 545–559. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.01.005>.
42. Li, B.; Duan, Y.; Du, Z.; Wang, X.; Liu, S.; Feng, Z.; Tian, L.; Song, F.; Yang, H.; Cai, W.; et al. Natural selection and genetic diversity maintenance in a parasitic wasp during continuous biological control application. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 1379. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45631-2>.
43. Kress, W.J.; García-Robledo, C.; Uriarte, M.; Erickson, D.L. DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends Ecol. Evol.* **2015**, *30*, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.10.008>.

44. Hebert, P.D.; Ratnasingham, S.; De Waard, J.R. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. Biol. Sci.* **2003**, *270*, S96–S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>.
45. Dong, Z.; Liu, S.; Zhang, Z. Efficacy of using DNA barcoding to identify parasitoid wasps of the melon-cotton aphid (*Aphis gossypii*) in watermelon cropping system. *BioControl* **2018**, *63*, 677–685. <https://doi.org/10.1007/s10526-018-9894-4>.
46. Garipey, T.D.; Haye, T.; Zhang, J. A molecular diagnostic tool for the preliminary assessment of host–parasitoid associations in biological control programmes for a new invasive pest. *Mol. Ecol.* **2014**, *23*, 3912–3924. <https://doi.org/10.1111/mec.12515>.
47. Ratnasingham, S.; Hebert, P.D. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol. Ecol. Notes* **2007**, *7*, 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>.
48. Fagan-Jeffries, E.P.; Cooper, S.J.B.; Bradford, T.M.; Austin, A.D. Intragenomic internal transcribed spacer 2 variation in a genus of parasitoid wasps (Hymenoptera: Braconidae): Implications for accurate species delimitation and phylogenetic analysis. *Insect Mol. Biol.* **2018**, *28*, 485–498. <https://doi.org/10.1111/imb.12564>.
49. Roderick, G.K.; Navajas, M. Genes in new environments: Genetics and evolution in biological control. *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4*, 889–899. <https://doi.org/10.1038/nrg1201>.
50. Ye, X.; Yang, Y.; Zhao, X.; Fang, Q.; Ye, G. The state of parasitoid wasp genomics. *Trends Parasitol.* **2024**, *40*, 914–929. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2024.08.003>.
51. Avise, J.C. *Phylogeography: The History and Formation of Species*; Harvard University Press: Cambridge, MA, USA, 2000.
52. Pita, S.; Rico-Porras, J.M.; Lorite, P.; Mora, P. Genome assemblies and other genomic tools for understanding insect adaptation. *Curr. Opin. Insect Sci.* **2025**, *68*, 101334. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2025.101334>.
53. Li, F.; Wang, X.; Zhou, X. The genomics revolution drives a new era in entomology. *Annu. Rev. Entomol.* **2025**, *70*, 379–400. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-013024-013420>.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Capítulo II

Caracterização de imaturos de duas linhagens de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae)

RESUMO

O endoparasitoide gregário *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae) é um agente de controle biológico amplamente utilizado contra diversas espécies de lepidópteros, como *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae). Apesar de sua relevância para programas de controle biológico, informações sobre o desenvolvimento e a morfologia de seus estágios imaturos ainda são limitadas. O objetivo deste estudo foi descrever o desenvolvimento e caracterizar os estágios larvais de duas linhagens de *T. howardi*. O experimento foi conduzido em condições controladas (25 ± 2 °C, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h) no Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Federal da Grande Dourados. Pupas de *D. saccharalis* foram expostas às fêmeas de *T. howardi* durante 24 horas. Durante 20 dias, pupas parasitadas foram coletadas diariamente, preservadas em formol 10%, dissecadas e fotografadas. A determinação dos instares larvais foi realizada por meio de medições morfométricas da cápsula cefálica, comprimento e largura corporal, seguidas de análise de componentes principais (PCA). Ambas as linhagens apresentaram três instares larvais, com diferenças no tempo de desenvolvimento dos estágios imaturos. O ciclo de vida foi concluído em 18 dias para a linhagem Dourados (DO) e em 16 dias para a linhagem Ladário (LA). A linhagem DO apresentou as fases de ovo, três instares larvais morfologicamente semelhantes, pré-pupa e pupa. A largura da cápsula cefálica, o comprimento e a largura corporal permitiram a caracterização dos instares larvais, embora tenham sido observadas sobreposições entre alguns períodos de desenvolvimento. Os resultados ampliam o conhecimento sobre a biologia de *T. howardi* e fornecem informações relevantes para programas de criação massal e estudos taxonômicos envolvendo estágios imaturos de parasitoides gregários. A caracterização do desenvolvimento imaturo contribui para a otimização dos sistemas de criação e para o planejamento do uso de hospedeiros parasitados em estágios mais resistentes de desenvolvimento, aumentando a eficiência dos programas de controle biológico.

1. INTRODUÇÃO

A ordem Hymenoptera é uma das maiores ordem de Insecta, incluindo formigas, abelhas e vespas (Darshan & Hegde, 2024). Vespas endoparasitoides são agentes eficazes no controle biológico de insetos ao depositar seus ovos no interior do hospedeiro, as larvas em desenvolvimento consomem os tecidos até a mortalidade do hospedeiro (Wang et al., 2019). Eulophidae é uma família altamente diversa de parasitoides, com aproximadamente 6.500 espécies documentadas, organizadas em aproximadamente 320 gêneros distribuídas em diversos habitats, e com alta diversidade morfológica e genética (Rasplus et al., 2020). Entre eles, o gênero *Tetrastichus* Haliday, 1844 tem sido alvo de estudos biológicos, ecológicos e comportamentais pelo potencial uso na regulação de diversos insetos em ecossistemas naturais e agrícolas (Hansson & Schmidt, 2020).

Tetrastichus howardi (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) é um endoparasitoide gregário com comportamento primário ou hiperparasitoide facultativo associados a diferentes espécies de lepidópteros (La Salle & Polaszek, 2007). O comportamento reprodutivo dessa espécie foi descrito na literatura como haplodiplóide, onde fêmeas não fecundadas produzem apenas descendentes machos por partenogênese arrenótoca, enquanto fêmeas fecundadas geram descendentes de ambos os sexos, influenciando significativamente as características biológicas da descendência (Tsutsui et al., 2014).

De acordo com Yan et al. (2024) e Zhu et al. (2022), fatores ambientais como temperatura e a disponibilidade de recursos no habitat podem influenciar taxas de parasitismo, desenvolvimento e o tamanho corporal de parasitoides, assim como a preferência e condição do hospedeiro (Barbosa et al., 2022). Informações sobre as características biológicas e comportamentais dessa espécie foram relatadas em diversos estudos, possibilitando a criação massal em laboratório e liberação em cultivos agrícolas e florestais (Pereira et al., 2021).

Tetrastichus howardi foi introduzido na África do Sul através das Filipinas, como potencial agente de controle de *Chilo partellus* (Swinhoe, 1885) (Lepidoptera: Crambidae) e *Busseola fusca* (Fuller, 1901) (Lepidoptera: Noctuidae). (Kfir et al., 1993; Kfir, 2001; La Salle & Polaszek, 2007). Nos últimos anos, *T. howardi* foi registrado parasitando lagartas e pupas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) e *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), presentes em cultivos de couve (*Brassica oleraceae* var. *acephala*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) e milho (*Zea mays* L.) (Cruz et al., 2011; Vargas et al., 2011; Rodrigues et al., 2021).

Espécies introduzidas de parasitoides podem sofrer variações associadas a fatores genéticos e ambientais, sendo comum em regiões tropicais pela alta diversidade ecológica (Struck et al., 2018). A evolução de linhagens, populações de uma ou mais espécies que compartilham um ancestral em comum, podem sofrer variações em aspectos biológicos, como o desenvolvimento, comportamento reprodutivo e ciclo de vida dependendo das condições ambientais (D'Ercole et al., 2023; Neto, 2019). Nesse contexto, a caracterização dos estágios imaturos em diferentes linhagens permite selecionar linhagens mais adaptadas às condições ambientais e, conseqüentemente, planejar liberações mais eficientes em programas de controle biológico. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo foi descrever e caracterizar o desenvolvimento dos estágios larvais de duas linhagens de *T. howardi*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados na cidade de Dourados, estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, em ambiente controlado, temperatura 25 ± 2 °C, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h.

2.1 Criação de insetos

Pupas do hospedeiro *Diatraea saccharalis* foram adquiridas das empresas Auca Controle Biológico LTDA e Biocana Controle Biológico, pesadas e utilizadas para montagem dos experimentos e criação da vespa parasitoide.

A linhagem Dourados (DO) de *T. howardi*, foi coletada em pupas de *D. saccharalis* na cidade de Dourados, MS (22°13'16"S, 54°48'2"W, 530 m) (Vargas et al., 2011) e estabelecida em laboratório com pupas de hospedeiros alternativos, como *Anticarsia gemmatilis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae). A linhagem Ladário (LA) foi coletada em pupas de *A. gemmatilis* na base de estudos da UFGD em Ladário, MS (19°01'07"S, 57°34'22.2"W), com nuances comportamentais no ciclo de vida e na progênie de fêmeas não copuladas, motivando a comparação entre diferentes linhagens (Palombo et al., 2024). Posteriormente, foi estabelecida em pupas de *A. gemmatilis* e *D. saccharalis*. Espécimes adultos dos parasitoides foram preservados em etanol 70% e enviados para identificação na Universidade Federal do Espírito Santo. O resultado da identificação morfológica coincidiu com *T. howardi*, com diferenças em características biológicas.

Para a multiplicação dos parasitoides, pupas de *A. gemmatalis* com 24 horas de idade foram individualizadas e expostas ao parasitismo com cinco fêmeas de *T. howardi* com 24 horas de idade em tubos de vidro (14,0×2,0cm) tampados com algodão e alimentadas com mel puro, até a emergência dos adultos.

2.2 Desenvolvimento experimental

Para avaliar o desenvolvimento de imaturos, fêmeas de *T. howardi* das duas linhagens com 24 horas de idade, foram individualizadas em microtubos (2 mL) e alimentadas com mel. 120 pupas de *D. saccharalis* foram expostas individualmente, ao parasitismo durante 24 horas. As pupas foram mantidas em ambiente controlado a 25 ± 1 °C, $70\pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas (Vargas et al., 2011).

Durante 20 dias, pupas *D. saccharalis* foram retiradas diariamente e imersas em formol 10% para preservar o estágio do parasitoide no interior da pupa. Um total de 60 pupas de *D. saccharalis* foram conservadas e avaliadas para cada linhagem de *T. howardi*, sendo realizado em triplicata (Bittencourt & Berti Filho, 2004). O controle foi com pupas de *D. saccharalis* conservadas em formol a 10% diariamente, durante 20 dias em triplicata. As pupas foram recortadas ao meio com auxílio de um bisturi, o desenvolvimento foi observado em lupa ZEISS SterREO e cada dia foi fotografado.

Para determinar o número de instares larvais de *T. howardi*, cada pupa dissecada que correspondia ao dia larval foi avaliada para isolar dez parasitoides imaturos de cada linhagem. Posteriormente, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) com base na largura da cápsula cefálica, comprimento e largura do corpo da larva utilizando pacotes do RStudio versão 2024.12.1+563. O objetivo da análise estatística multivariada foi verificar a separação ou agrupamento que apresentam maior correlação, auxiliando na caracterização dos diferentes instares larvais (Araujo & Coelho, 2009).

3. RESULTADOS

Os estágios imaturos, ovo, larva, pré-pupas e pupas de *T. howardi* linhagem (DO) e linhagem (LA) possui diferenças na duração do ciclo de desenvolvimento. Na linhagem DO, os ovos são esféricos e translúcidos. As larvas eclodiram no quarto dia, sendo himenopteriforme sem mandíbulas aparentes e seu comprimento variou entre $1,89 \pm 0,08$ mm e $2,38 \pm 0,04$ mm. Durante o estágio pré-pupa, a coloração das larvas tornou-se branca ou amarelada e inicia a definição corporal do adulto. As pupas são do tipo exarada e apresentam olhos castanho-avermelhados e segmentos corporais bem definidos, sua coloração é escura próximo a emergência dos adultos. O período de desenvolvimento das

pré-pupas foi um dia e as pupas foi de sete dias. A linhagem LA de *T. howardi* possui os mesmos padrões morfológicos, com o comprimento das larvas de $2,58 \pm 0,04$ mm e $3,20 \pm 0,05$ mm (Figura 1). O período de desenvolvimento da fase de pré-pupa e pupa foi de seis dias.



Figura 1. Estágios imaturos de *Tetrastichus howardi*, linhagem Dourados (DO). Ovo (a), larvas (b) pupas (c). Barra de escala = 0,05 mm



Figura 2. Estágios imaturos da linhagem 2 de *Tetrastichus howardi* (LA). Ovo (a), larvas (b) pupas e adulto (c). Barra de escala = 0,05 mm

O desenvolvimento de *T. howardi* linhagem (DO) iniciou com a oviposição em pupas de *D. saccharalis*, de forma gregária, permanecendo nesse estágio até o terceiro dia. A eclosão das larvas ocorreu no quarto dia, e o período larval foi até o nono dia, com progressões nas medidas morfométricas que caracterizam os instares larvais (Tabela 1). Em comparação, a linhagem (LA) apresentou um desenvolvimento mais acelerado, com

um período larval mais curto, iniciando no sexto dia e encerrando-se no oitavo, com a fase de pré -pupa e pupa se estendendo até o décimo quinto dia (Figura 3).

Tabela 1. Caracterização do desenvolvimento de imaturos de *Tetrastichus howardi*, linhagem Dourados (DO) e linhagem Ladário (LA) pelo período larval com as médias da cápsula cefálica, largura e comprimento do corpo (mm $\pm$ erro padrão).

Linhagem	Período larval (dias)	Cápsula cefálica (mm)	Largura (mm)	Comprimento (mm)
DO	4	0,16 $\pm$ 0,00	0,49 $\pm$ 0,02	1,89 $\pm$ 0,08
	5	0,18 $\pm$ 0,01	0,60 $\pm$ 0,01	2,22 $\pm$ 0,05
	6	0,19 $\pm$ 0,01	0,95 $\pm$ 0,03	1,89 $\pm$ 0,08
	7	0,18 $\pm$ 0,01	0,68 $\pm$ 0,02	2,30 $\pm$ 0,06
	8	0,18 $\pm$ 0,00	0,62 $\pm$ 0,02	2,38 $\pm$ 0,04
	9	0,19 $\pm$ 0,00	0,56 $\pm$ 0,02	2,03 $\pm$ 0,07
LA	6	0,19 $\pm$ 0,01	0,73 $\pm$ 0,02	2,58 $\pm$ 0,04
	7	0,16 $\pm$ 0,01	0,96 $\pm$ 0,02	3,20 $\pm$ 0,05
	8	0,19 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,02	3,10 $\pm$ 0,03



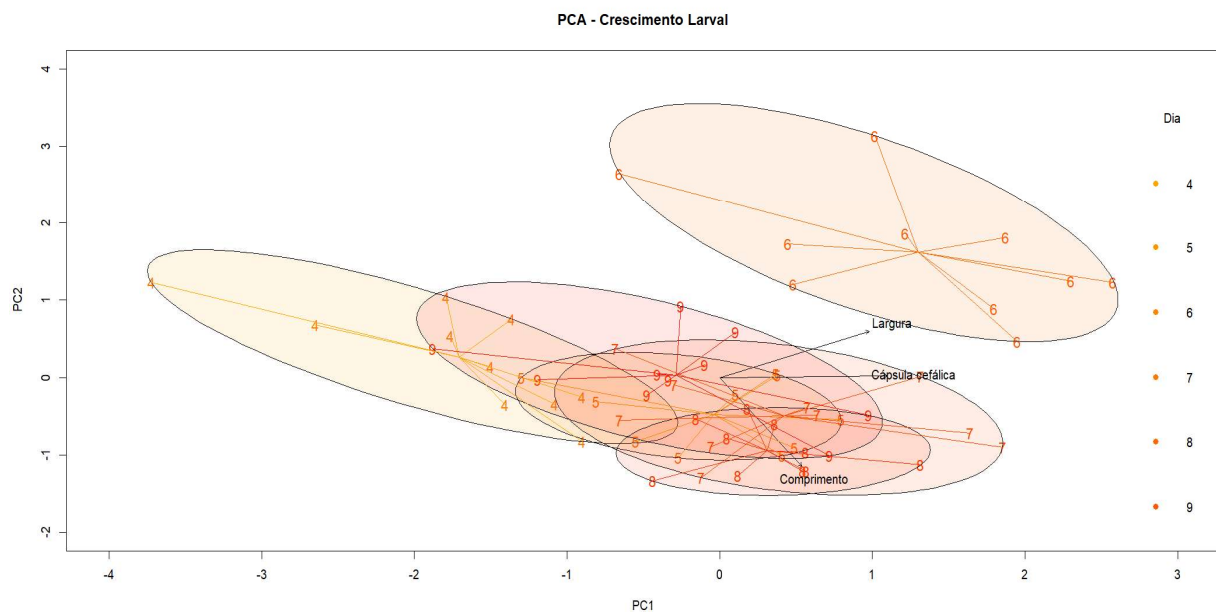
Figura 3. Ciclo de desenvolvimento completo da linhagem (LA) de *Tetrastichus howardi*.

A caracterização dos estágios larvais das duas linhagens de *T. howardi* foi realizada com base nas medições da cápsula cefálica, largura e comprimento pela análise PCA, indicando três agrupamentos distintos que caracterizamos como instares larvais. As setas indicadas nas análises, destacam a contribuição das variáveis morfométricas na separação

dos grupos. Na linhagem DO, o primeiro instar é representado pela menor medida da cápsula cefálica no quarto dia, com progressão na largura e comprimento corporal. No sexto dia, houve um crescimento significativo na largura corporal das larvas, com aumento das demais variáveis indicando a troca de instar. O terceiro instar pode ser caracterizado pelo maior comprimento das larvas, com variações nas medidas de cápsula cefálica e largura pela sobreposição entre os dias 5, 7, 8 e 9 (Figura 4).

A linhagem (LA) de *T. howardi* indica o primeiro instar na menor medida da largura e comprimento corporal no sexto dia de desenvolvimento. No entanto, a progressão dos estágios larvais não foi claramente identificada pela medição da cápsula cefálica ao longo dos dias, apenas consideramos o agrupamento entre as três variáveis. Larvas do sétimo dia apresentaram um crescimento significativo na largura e comprimento corporal, diferenciando o segundo agrupamento. No oitavo dia, houve uma diminuição nas medidas de largura e comprimento corporal em relação ao dia anterior (Figura 5).

Figura 4. Número de estágios larvais de *Tetrastichus howardi* (DO) determinado pela



largura da cápsula cefálica, comprimento e largura corporal pelos dias larvais, usando o método de componentes principais (PCA).

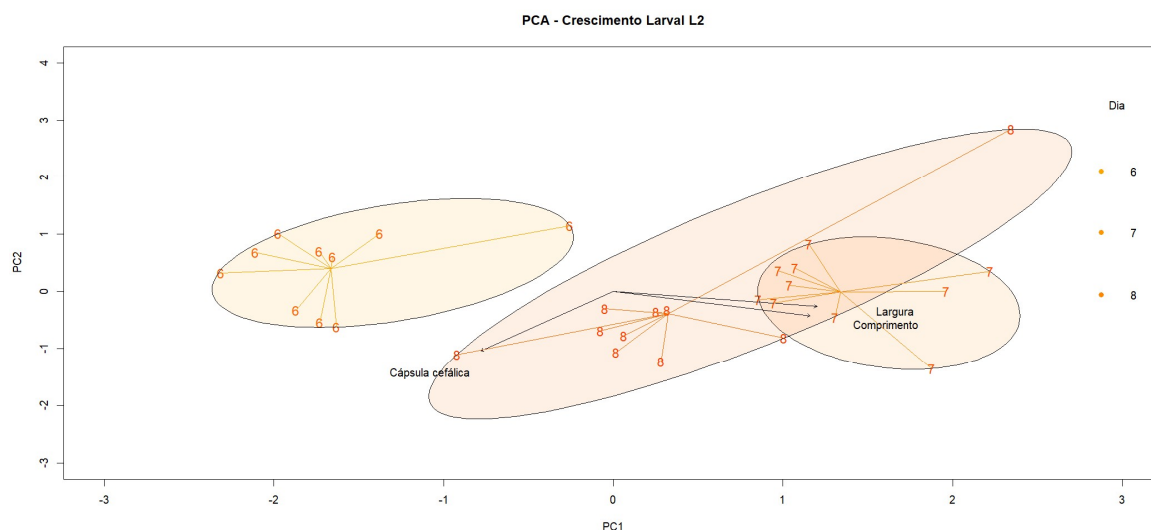


Figura 5. Número de estágios larvais de *Tetrastichus howardi* (LA) determinado pela largura da cápsula cefálica, comprimento e largura corporal pelos dias larvais, usando o método de componentes principais (PCA).

4. DISCUSSÃO

A caracterização dos estágios imaturos de *T. howardi* entre diferentes linhagens contribui para o conhecimento biológico da espécie e permite planejar liberações mais eficientes para programas de controle biológico. Além disso, identificar corretamente as fases de desenvolvimento permite selecionar o estágio mais adequado para o transporte de hospedeiros parasitados. A fase de pupa é a mais indicada, por ser mais resistente ao estresse físico e às variações ambientais (Parra, 2002).

A caracterização morfológica dos ovos recém depositados de *T. howardi* são diferentes aos da espécie *Tetrastichus giffardianus* Silvestri, 1915 (Hymenoptera: Eulophidae), estes sendo alongados, ligeiramente cilíndricos com uma área central opaca, mostrando as larvas em desenvolvimento, enquanto os ovos de *T. howardi* são esféricos e transparentes nas duas linhagens observadas (Fernandes et al., 2019). As larvas de *T. howardi* são do tipo himenopteriforme, sem a presença de um apêndice caudal cuja função é a locomoção na hemolinfa do hospedeiro, reduzindo a mobilidade das larvas e consequentemente diminuindo a competição de recursos (Harvey et al., 2013). O mesmo padrão foi observado na espécie *Aphaereta pallipes* (Say, 1836) (Hymenoptera:

Braconidae), sendo uma característica evolutiva que facilita o hábito gregário de parasitoides (Pexton & Mayhew, 2004).

Os três instares larvais de *T. howardi* foram caracterizados pelas variáveis morfológicas. Apesar de estudos anteriores sugerirem que há uma progressão clara dessas medidas ao longo dos instares (Pezzini et al., 2017; Tormos et al., 2009), os resultados obtidos neste estudo revelaram uma sobreposição entre as médias na linhagem 1. A variação no comprimento corporal pode estar associada a diversos fatores, como a quantidade de recursos internos da pupa hospedeira, desenvolvimento assíncrono entre as larvas e a fisiologia do hospedeiro. A cápsula cefálica é uma medida confiável e estável para determinação dos instares larvais (Dyar, 1890), entretanto, houve sobreposições entre as médias das linhagens de *T. howardi*. Essa ausência de padrão pode estar relacionada à competição intraespecífica, posicionamento dos ovos ou o desenvolvimento assíncrono entre os indivíduos (Fernandes et al., 2019; Shi et al., 2015).

As pré-pupas são caracterizadas pela redução do movimento e pigmentação ocular. As pupas apresentam as características dos adultos em formação, com dimorfismo sexual pouco visível, semelhante às da espécie *T. giffardianus* e *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead, 1905) (Hymenoptera: Braconidae) (Fernandes et al., 2019; Paladino et al., 2010).

O desenvolvimento de *T. howardi* é semelhante ao da espécie *Tetrastichus giffardianus* descrita por Fernandes et al., (2019). Inicia o ciclo na fase de ovo, passa por três instares larvais semelhantes, um estágio pré-pupal e um estágio de pupa até a emergência dos adultos. Entretanto, a duração em dias de cada fase possui variações, tanto entre as espécies do gênero quanto entre as linhagens DO e LA. A linhagem LA apresentou maior duração na fase pupal, característica que pode favorecer o planejamento de liberações em campo pela maior resistência a fatores externos (Parra, 2002). No registro de ocorrência da espécie *T. howardi* parasitando pupas de *D. saccharalis* no Brasil, a duração do ciclo de vida foi de $25,5 \pm 3,2$ dias, considerando as mesmas condições de temperatura, umidade relativa e fotoperíodo do presente estudo (Cruz et al., 2011). O menor período de desenvolvimento observado provavelmente se deve a diferentes linhagens do parasitoide com diferenciações de comportamentos.

5. CONCLUSÃO

As duas linhagens de *T. howardi* apresentam três instares larvais. As diferenças no desenvolvimento entre as linhagens evidenciam variações biológicas relevantes. A linhagem Ladário (LA) apresentou um menor período de desenvolvimento ovo-adulto, com maior comprimento das larvas. Em contrapartida, a linhagem Dourados (DO) teve um ciclo larval mais longo, refletindo um desenvolvimento mais lento nas mesmas condições ambientais. Essas variações entre linhagens demonstram a importância de considerar aspectos biológicos e caracterizar instares larvais, afim de otimizar as condições de criação massal e permitir o planejamento de liberações com maior eficiência.

6. REFERÊNCIAS

Araujo, W.O.D., Coelho, C.J. Análise de componentes principais (PCA). University Center of Anápolis, Anápolis, 2009.

Barbosa, M.S., Guerra, M.S., Pereira, F.F., da Silva, O. H.M., da Silva, I.F. Parasitism of *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) on *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae) pupae at different ages. **Agricultural Research in the Tropics** 52: 1, 2024. DOI: 10.1590/1983-40632022v5272978.

Barbosa, M.S., Guerra, M.S., Pereira, F.F., da Silva, O.H.M., da Silva, I.F. Parasitism of *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) on *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidae) pupae at different ages. **Agricultural Research in the Tropics** 52: 2022. DOI: 10.1590/1983-40632022v5272978.

Bittencourt, M.A., Berti Filho, E. Desenvolvimento dos estágios imaturos de *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera, Eulophidae) em pupas de Lepidoptera. *Revista Brasileira de Entomologia* 48: 65-68, 2004. DOI: 10.1590/S0085-56262004000100012.

Cruz, I., Redoan, A.C., Silva, R.B.D., Figueiredo, M.D.L.C., Penteado-Dias, A.M. New record of *Tetrastichus howardi* (Olliff) as a parasitoid of *Diatraea saccharalis* (Fabr.) on maize. **Scientia Agricola** 68: 252-254, 2011. DOI: 10.1590/S0103-90162011000200017.

D’Ercole, J., Vila, R., Dapporto, L., Pentinsaari, M., Talavera, G., Dincă, V., Hebert, P. D. Molecular evolution in introduced insect species a mitochondrial perspective. **Frontiers in Ecology and Evolution** 11: 1218690, 2023. DOI: 10.3389/fevo.2023.1218690.

Darshan, R., Hegde, J. Diversity of Hymenopteran Parasitoids in different Crop Ecosystems. **International Journal of Environment and Climate Change** 14 (3): 585-607, 2024. DOI: 10.9734/ijecc/2024/v14i34067.

Dyar, H.G. The number of molts of lepidopterous larvae. **Psyche: A Journal of Entomology** 5: 420-422, 1890. DOI: 10.1155/1890/23871,

Fernandes, E., Araujo, E., Souza, I., Souza, M., Nunes, G. Development and morphological characterization of the immature stages of *Tetrastichus giffardianus* Silvestri

(Hymenoptera: Eulophidae). **Revista Brasileira de Entomologia** 63(3): 262-267, 2019. DOI: 10.1016/j.rbe.2019.05.005.

Harvey, J.A., Poelman, E.H., Tanaka, T. Intrinsic inter-and intraspecific competition in parasitoid wasps. **Annual review of entomology** 58(1): 333-351, 2013. DOI: 10.1146/annurev-ento-120811-153622.

Kfir, R. Prospects for biological control of the stem borer *Chilo partellus* in grain crops in South Africa. **Insect Science and its Application** 21(4): 275-280, 2001. DOI: 10.1017/S1742758400008353.

Kfir, R., Gouws, J., & Moore, S. D. Biology of *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae): a facultative hyperparasitoid of stem borers. **Biocontrol Science and Technology** 3(2): 149-159, 1993. DOI: 10.1080/09583159309355271.

Neto, C. What is a lineage?. **Philosophy of Science** 86(5): 1099-1110, 2019. DOI: 10.1086/705511.

La Salle, J., Polaszek, A. Afrotropical species of the *Tetrastichus howardi* species group (Hymenoptera: Eulophidae). **African Entomology** 15(1): 45-56, 2007. DOI: 10.10520/EJC32721.

La Salle, J., Polaszek, A. Afrotropical species of the *Tetrastichus howardi* species group (Hymenoptera: Eulophidae). **African Entomology** 15: 45-56, 2007. DOI: 10.4001/1021-3589-15.1.45.

Liu, Z., Xu, B., Li, L., Sun, J. Host-size mediated trade-off in a parasitoid *Sclerodermus harmandi*. **PLoS One** 6(8): e23260, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0023260.

Paladino, L.Z.C., Papeschi, A.G., Cladera, J.L. Immature stages of development in the parasitoid wasp, *Diachasmimorpha longicaudata*. **Journal of Insect Science** 10(1): 56, 2010. DOI: 10.1673/031.010.5601.

Parra, J.R.P. Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores. **Editora Manole Ltda**, 2002.

Pereira, F.F., Pastori, P.L., Kassab, S.O., Torres, J.B., Cardoso, C.R.G., Fernandes, W.C., Oliveira, H.N., Zanuncio, J.C. Uso de eulofídeos no controle biológico de pragas. In: Controle biológico com parasitoides e predadores na agricultura Brasileira. Parra, J.R.P., Pinto, A.S., Nava, D.E., Oliveira, R.C., Diniz, A.J.F. **Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz**, Piracicaba, São Paulo, Brasil, 317-361, 2021.

Pexton, J.J., Mayhew, P.J. Competitive interactions between parasitoid larvae and the evolution of gregarious development. **Oecologia** 141: 179-190, 2004. DOI: 10.1007/s00442-004-1659-3.

Pezzini, C., Jahnke, S.M., Köhler, A. Morphological characterization of immature stages of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera, Braconidae) ectoparasitoid of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae). **Journal of Hymenoptera Research** 60: 157, 2017. DOI: 10.3897/JHR.60.20104.

Rasplus, J.Y., Blaimer, B.B., Brady, S.G., Burks, R.A., Delvare, G., Fisher, N., Gates, M., Gauthier, N., Gumovsky, A.V., Hansson, C., Heraty, J.M. A first phylogenomic hypothesis for Eulophidae (Hymenoptera, Chalcidoidea). **Journal of Natural History** 54 (9-12): 597-609, 2020. DOI: 10.1080/00222933.2020.1762941.

Rodrigues, A., Pereira, F.F., Barbosa, P.R., Silva-Torres, C.S., Torres, J.B. Parasitism behavior of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) on larvae and pupae of sugarcane borers. **Journal of Insect Behavior** 34(3): 71-81, 2021. DOI: 10.1007/s10905-021-09770-4.

Sasidharan, A., Ghosh, E., Venkatesan, R. Making a healthy choice: Tactical host selection behaviour of a parasitoid wasp. **Ecological Entomology** 49(6): 881-890, 2024. DOI: 10.1111/een.13362.

Struck, T.H., Feder, J.L., Bendiksby, M., Birkeland, S., Cerca, J., Gusarov, V. I., Dimitrov, D. Finding evolutionary processes hidden in cryptic species. **Trends in Ecology & Evolution** 33(3): 153-163, 2018. DOI: 10.1016/j.tree.2017.11.007.

Tormos, J., Beitia, F., Böckmann, E.A., Asís, J.D. The preimaginal stages and development of *Spalangia cameroni* Perkins (Hymenoptera: Pteromalidae) on *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Micron** 40(5-6): 646-658, 2009.

Tsutsui, Y., Maeto, K., Hamaguchi, K., Isaki, Y., Takami, Y., Naito, T., Miura, K. Apomictic parthenogenesis in a parasitoid wasp *Meteorus pulchricornis*, uncommon in the haplodiploid order Hymenoptera. **Bulletin of Entomological Research** 104(3): 307-313, 2014. DOI: 10.1017/S0007485314000017.

Vargas, E.L., Pereira, F.F., Tavares, M.T., Pastori, P.L. Record of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Diatraea* sp. (Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane crop in Brazil. **Entomotropica** 26 (3): 143-146, 2011.

Wang, Z.Z., Liu, Y.Q., Min, S.H., Huang, J.H., Chen, X.X. Parasitoid wasps as effective biological control agents. **Journal of Integrative Agriculture** 18(4): 705-715, 2019.

Yan, S., Su, H., Lyu, B., Lu, H., Tang, J., Zhuo, Z., Yang, F. Effects of temperature and supplementary food on the development and fecundity of the Eulophid parasitoid *Tetrastichus howardi* on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Pest Management** 70(2): 146-157, 2024. DOI: 10.1080/09670874.2021.1968535.

Zhu, Y., Lai, Q., Jiang, T., Liu, X., Wu, S., Wyckhuys, K. A., Xiong, Z., Xiao, H. Landscape composition affects parasitoid body size in species-specific manner: A case study in Asian rice systems. **Biological Control** 175: 105057, 2022. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2022.105057.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A combinação da extração de DNA de alta qualidade e do sequenciamento de genoma completo permitiu a identificação de variantes genômicas específicas para *Trichospilus diatraeae*, *Palmistichus elaeisis*, *Tetrastichus howardi* e *Trichogramma pretiosum*. A metodologia empregada estabeleceu uma ferramenta molecular precisa para a identificação dessas espécies de parasitoides, incluindo amostras mistas, fornecendo marcadores genéticos confiáveis e dados genômicos que poderão subsidiar futuras pesquisas e aprimorar a utilização desses agentes em programas de controle biológico.

Além disso, a caracterização do desenvolvimento imaturo de duas linhagens de *T. howardi* demonstrou a ocorrência de três instares larvais em ambas as linhagens, bem como diferenças biológicas relevantes relacionadas ao tempo de desenvolvimento e ao crescimento larval. A linhagem Ladário (LA) apresentou menor período de desenvolvimento ovo-adulto e maior comprimento larval, enquanto a linhagem Dourados (DO) apresentou desenvolvimento mais lento sob as mesmas condições ambientais. Essas informações ampliam o conhecimento sobre a biologia de linhagens de uma mesma espécie e fornecem subsídios para o aprimoramento de sistemas de criação massal e para o planejamento mais eficiente de liberações em programas de controle biológico.

7. ANEXOS

1. Desenvolvimento de imaturos de *Tetrastichus howardi* da linhagem DO em pupas de *Diatraea saccharalis*. Barra de escala = 0,05 mm

Dia 1



Dia 2



Dia 3



Dia 4



Dia 5



Dia 6



Dia 7



Dia 8



Dia 9



Dia 10



Dia 11



Dia 12



Dia 13



Dia 14



Dia 15



Dia 16



Dia 17



Dia 18



Dia 19



Dia 20



2. Desenvolvimento de imaturos de *Tetrastichus howardi* da linhagem LA em pupas de *Diatraea saccharalis*. Barra de escala = 0,05 mm

Dia 1



Dia 2



Dia 3



Dia 4



Dia 5



Dia 6



Dia 7



Dia 8



Dia 9



Dia 10



Dia 11



Dia 12



Dia 19



Dia 20



3. Desenvolvimento pupal de *Diatraea saccharalis* como testemunha. Barra de escala = 0,05 mm

Dia 1



Dia 2



Dia 3



Dia 4



Dia 5



Dia 6



Dia 7

