

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

EMILY LOPES OLIVE

MULTIPLICAÇÃO SUCESSIVA DE *Tetrastichus howardi* (OLLIFF, 1893)
(HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) EM HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS

ALEGRE
2022

EMILY LOPES OLIVE

MULTIPLICAÇÃO SUCESSIVA DE *Tetrastichus howardi* (OLLIFF, 1893)
(HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) EM HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Área de concentração: Proteção sustentável de plantas.

Orientador: Dr. Hugo Bolsoni Zago

Coorientadores: Dr. Fabrício Fagundes Pereira

Dr. Gilberto dos Santos Andrade

Dra. Márcia Flores da Silva Ferreira

ALEGRE

2022

EMILY LOPES OLIVE

MULTIPLICAÇÃO DE *Tetrastichus howardi* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) EM
HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Agronomia, da Universidade Federal do Espírito Santo
(UFES), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do
título de DOUTORA EM AGRONOMIA.

Área de concentração: Proteção sustentável de plantas.

Orientador: Dr. Hugo Bolsoni Zago.

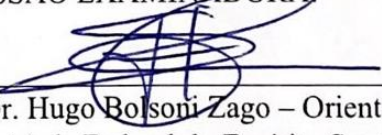
Coorientadores: Dr. Fabrício Fagundes Pereira;

Dr. Gilberto dos Santos Andrade;

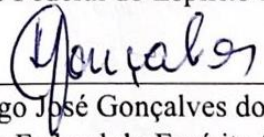
Dra. Márcia Flores da Silva Ferreira.

Aprovada em: 13 de julho de 2022

COMISSÃO EXAMINADORA



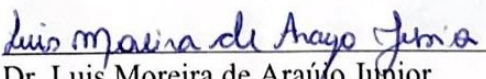
Prof. Dr. Hugo Bolsoni Zago – Orientador
Universidade Federal do Espírito Santo




Prof. Dr. Hugo José Gonçalves dos Santos Junior
Universidade Federal do Espírito Santo



Dr. Vitor Zuim



Dr. Luis Moreira de Araújo Junior



Dr. Kenner Morais Fernandes
Universidade Federal de Viçosa

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

O48m Olive, Emily Lopes, 1992-
MULTIPLICAÇÃO SUCESSIVA DE *Tetrastichus howardi*
(OLLIFF, 1893) (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) EM
HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS / Emily Lopes Olive. -2022.
73 f. : il.

Orientador: Hugo Bolsoni Zago.
Coorientadores: Gilberto dos Santos Andrade, Márcia
Flores da Silva Ferreira, Fabrício Fagundes Pereira.
Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Parasitoide. 2. Controle Biológico. 3. Comercialização. 4.
Neotropical. I. Zago, Hugo Bolsoni. II. Andrade, Gilberto dos
Santos. III. Ferreira, Márcia Flores da Silva. IV. Pereira, Fabrício
Fagundes. V. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências Agrárias e Engenharias. VI. Título.

CDU: 63

BIOGRAFIA

EMILY LOPES OLIVE, filha de Arlete Louzada Lopes Olive e Joabe Eller Olive, natural de Rolim de Moura, Rondônia, Brasil, nascida em 29 de outubro de 1992.

Cursou parte do ensino fundamental e ensino médio no Colégio Clarice Lispector, na cidade de Rolim de Moura/RO, finalizado em 2009, onde fez sua primeira caixa entomológica. Em 2010, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Rondônia (UNIR), em Rolim de Moura, Rondônia. Participou como bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), em 2013, orientada pelo Dr. Gilberto dos Santos Andrade, quando este lecionava Entomologia na UNIR, de quem recebeu os primeiros incentivos e instruções na pesquisa e teve o primeiro contato com a Entomologia Agrícola. Concluiu o estágio obrigatório de Agronomia no Laboratório de Entomologia da EMBRAPA-SOJA, em Londrina, Paraná, Brasil, junto à equipe de Controle Biológico liderada pelo Dr. Adeney de Freitas Bueno, em 2014. Recebeu o título de Engenheira Agrônoma em 2015, através do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Preferência hospedeira do parasitoide *Telenomus remus* (Hymenoptera: Platygasteridae) em ovos de *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae) e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)”.

Em fevereiro de 2015, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, na área de Entomologia no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em Manaus, Amazonas, Brasil, onde teve mais contato e desenvolveu melhor o senso de proteção e uso consciente dos recursos, o que reforçou sua consciência e atividade no Controle Biológico de Pragas. Defendeu a dissertação em março de 2017, intitulada “Efeito da distância geográfica e das variáveis aquáticas sobre a comunidade de Odonata (ninfas) de lagos na savana de Roraima, Brasil”.

Em março de 2018 iniciou o Doutorado através do Programa de Pós-graduação em Agronomia na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Alegre, Espírito Santo, Brasil, onde voltou a trabalhar com o Controle Biológico. Sempre que possível participou de Congressos, Simpósios e se envolveu com workshops em busca da troca de conhecimento e popularização da ciência no que tange a Entomologia, o que, como podem ver, desde o início sempre moveu seu coração e suas viagens. Assim, em junho de 2022 se submeteu à defesa da tese de doutorado intitulada “Aspectos biológicos, morfológicos, moleculares e metabolômicos de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) reproduzido em pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)”.

*Aos meus avós que sempre me acolheram;
Aos meus pais que sempre me incentivaram;
À minha irmã que sempre me inspirou.*
DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Cristo que nos oferece uma nova oportunidade a cada dia;

À FAPES e CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

À Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade do doutoramento no Programa de Pós-Graduação em Agronomia;

Aos meus pais, Joabe Eller Olive e Arlete Louzada Lopes Olive, que me instruíram e amaram com tudo que podiam e conheciam. Que me ensinaram que o valor das coisas não estará jamais no preço delas e que devemos ser a nossa própria melhor versão, sem jamais nos medir pela régua dos demais;

À minha amada irmã Lilian que sempre foi minha companheira, amiga e minha mais doce lembrança. Que sempre me faz chorar de orgulho ou de alegria e me socorreu quando não tinha mais forças, me ouvindo e até ajudando a conferir esta tese. Que é a pessoa mais especial da minha vida e de quem tenho o imenso prazer e honra de partilhar a genética;

Aos meus avôs Demário Lopes, *in memoriam*, e Aníbal Olive, *in memoriam*, que me fizeram pianista, amante de música, biscoitos com leite e a frase que a todo momento carrego comigo “*independentemente do momento ou situação, Deus cuida de mim*”;

Às minhas avós Nadir Louzada Lopes e Eunice Olive Eller, *in memoriam*, que são exemplos da mais forte feminilidade que já vi na minha vida e fontes de inspiração para minha caminhada firme e genuína;

Aos meus queridos tios e seus respectivos cônjuges, bem como filhos que são minha família aqui representada: Cleber, Idelette, Leomar, Ozieu, Ilkeas, Vilmar, Venosdário, Sinesio e Milquia *in memoriam*;

Ao meu orientador Dr. Hugo Bolsoni Zago, que é primeiramente um parceiro, a quem sempre tive imenso respeito e admiração. Por me constranger me chamando de puxa-saco por lhe levar lembrancinhas e por me divertir me apelidando de praga-de-rondônia (mas ainda acho que sou é algum tipo de inimigo natural). Por todo auxílio, conselhos e paciência em momentos mais complicados;

Ao meu coorientador Dr. Gilberto Andrade, meu “pai na entomologia”, o primeiro a abrir as portas desse sonho que finalmente começa a se realizar na minha vida. Meu primeiro professor em entomologia na Agronomia lá na UNIR em 2012, orientador do meu primeiro PIBIC. Por toda amizade, apoio, inspiração e suporte;

Aos meus coorientadores Dr.^a Márcia Flores, quem me inspira por seu entusiasmo e paixão pela própria área, por todo suporte em genética, sempre disposta a fazer parte da solução,

tirar dúvidas ou aumentá-las. Ao Dr. Fabrício Pereira, por possibilitar a parceria com a UFGD, por todo suporte e acesso ao principal objeto de estudo desta pesquisa, o parasitoide *Tetrastichus howardi*;

À equipe de entomologia do NUDEMAFI, por sonharmos e trabalharmos juntos por eventos de popularização da ciência como o nosso I Workshop de pragas do Caparaó, foi uma ótima experiência. Aos colegas de debate de artigos, de discussão de projetos, de cafés. Por me ampararem quando fiquei sem bolsa de estudos em 2018, por me acolherem em outros momentos de dor e aflição, por me dar forças e me lembrar da minha esperança nos momentos de desilusão e cansaço. Por toda amizade Pedro César, Laura, Lorena, Carlos Paiva, Alice, Juliane, Carol, Isac Louzada, Brenno Augusto, Nath, Bia, Luiza, Mari, Lucélia, Julielson, José Romário, Luisão, Priscila, Ousadia (Rafael), Leo Mardgan, Carlos Magno, Hugo Gonçalves, Dirceu Pratisoli, Aixelhe, Franciele, Filipe Holtz, Addressa, Lairton e Arthur;

À minha banca de avaliação da defesa de projeto, pelas contribuições e ajustes ao projeto de doutorado Dr. Luis Moreira e Prof. Hugo Gonçalves;

À minha banca de qualificação do doutorado, Dr. André Xavier, Dr. Vitor Zuim e Prof. Dr. Hugo Gonçalves, por perguntas e dicas que me fizeram encontrar muitas curiosidades importantes para o meu trabalho;

Ao Pablo Viana que foi peça imprescindível na minha escalada na genética, meu mentor, consultor, professor, revisor e amigo querido. À professora Dr.^a Greiciane Paneto Gaburro pela parceria e por me permitir utilizar o laboratório de bioquímica para muitas das extrações e análises de DNA;

À Me. Elziane, por todo auxílio nas análises bromatológicas das pupas de *Spodoptera frugiperda* e *Tenebrio molitor* e à professora Dr.^a Thaís por possibilitar as análises; à Ana Paula e a Giulia, colegas da nutrição, por todos os momentos na Bromatologia e companhia;

Aos meus amigos que ouviram minhas ansiedades, comemoraram minhas pequenas vitórias comigo, me puxaram a orelha quando necessário e me deram colo quando nem eu mesma me acolhi. Por acreditarem em mim até mais que eu mesma Pedro César, Ronaldo Willian, Yanira Limón, Milena Pinho, Lígia Maria e Regis Marlon;

Aos meus amigos que me ligam ou mandam mensagem, por rsempre me arrancarem risadas e entenderem minhas lágrimas Aline Rocha, Ezequiel (Ez), Keila Eller, Valleska Emerick e Ivo Tavares;

À Dona Lacy que tirava tempo para me convidar para um cafezinho;

À minha psicóloga Luma que levou minha depressão mais a sério que eu mesma, me socorreu a tempo e ‘segurou minha mão’ nesses últimos meses, por hoje conseguir respirar sem

pirar e por conseguir finalmente reconhecer que fiz o meu melhor com o que tinha. Saúde mental é coisa séria mesmo;

A todos que direta ou indiretamente fizeram e fazem parte da minha caminhada entomológica, que vai muito além de anatomia, biologia ou fisiologia de insetos. Paixão que nasceu na minha infância ao admirar as borboletas, lava-bundas e formigas, que hoje tem cientificidade e sei pertencerem à Lepidoptera, Odonata e Hymenoptera, respectivamente. Como o Criador é genial!

*“As pessoas geralmente escolhem os caminhos mais fáceis,
você decidiu se desafiar”*

Dr. House

*“As misericórdias do SENHOR são a causa de não sermos consumidos,
porque as suas misericórdias não têm fim;”*

Lamentações de Jeremias 3.22

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 REFERÊNCIAS.....	13
CAPÍTULO 1 - Multiplicação sucessiva de <i>Tetrastichus howardi</i> (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)	16
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1 IDENTIFICAÇÃO DE <i>T. howardi</i>	20
2.1.1 Identificação morfológica	20
2.1.2 Identificação molecular	20
2.2 EFEITOS DE SUCESSIVAS GERAÇÕES DE <i>Tetrastichus howardi</i> SOBRE PUPAS DE <i>Spodoptera frugiperda</i>	23
2.2.1 Multiplicação de <i>T. howardi</i>	23
2.2.2 Obtenção das pupas do hospedeiro alternativo de <i>T. howardi</i>.....	24
2.2.2.1 Análise nutritiva das pupas de <i>S. frugiperda</i>	24
2.2.2.2 Matéria seca das pupas de <i>S. frugiperda</i>	25
2.2.2.3 Proteína bruta das pupas de <i>S. frugiperda</i>	25
2.2.2.4 Lipídios das pupas de <i>S. frugiperda</i>	26
2.2.2.5 Fibra em Detergente Neutro das pupas de <i>S. frugiperda</i>	26
2.2.3 Condicionamento das gerações de <i>T. howardi</i>	26
2.2.4 Preparo dos espécimes de <i>T. howardi</i> para mensurações	27
2.2.5 Metabólitos observados em <i>T. howardi</i> proveniente de pupas de <i>S. frugiperda</i>	28
2.2.5.1 Amostragem de <i>T. howardi</i> para o perfil metabólico.....	28
2.2.5.2 Extração dos metabólitos de <i>T. howardi</i>	29
2.2.5.3 Derivatização dos metabólitos de <i>T. howardi</i>	29
2.2.5.4 Parâmetros de análise por GC-MS	29
2.2.5.5 Processamento de dados CG-MS	30
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
3 RESULTADOS	32
4 DISCUSSÃO.....	35
5 CONCLUSÃO.....	38
6 REFERÊNCIAS.....	39
CAPÍTULO 2 - Multiplicação sucessiva de <i>Tetrastichus howardi</i> (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de <i>Tenebrio molitor</i> (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae).....	48
1 INTRODUÇÃO.....	49
2 MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1 MULTIPLICAÇÃO DE <i>T. howardi</i>	51

2.2	MULTIPLICAÇÃO DO HOSPEDEIRO ALTERNATIVO DE <i>T. howardi</i>	51
2.3	CONDICIONAMENTO DAS GERAÇÕES DE <i>T. howardi</i>	51
2.4	PREPARO DOS ESPÉCIMES DE <i>T. howardi</i> PARA MENSURAÇÕES	52
2.4.1	Metabólitos observados em <i>T. howardi</i> proveniente de pupas de <i>T. molitor</i>	53
2.4.1.1	Amostragem de <i>T. howardi</i> para o perfil metabólico.....	53
2.2.4.2	Extração dos metabólitos de <i>T. howardi</i>	54
2.2.4.3	Derivatização dos metabólitos de <i>T. howardi</i>	54
2.2.4.4	Parâmetros de análise e processamento de dados por GC-MS.....	54
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
3	RESULTADOS	57
4	DISCUSSÃO.....	60
5	CONCLUSÃO.....	63
6	REFERÊNCIAS	64
	CONCLUSÃO GERAL	67

RESUMO GERAL

Tetrastichus howardi (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) é parasitoide de diversos insetos-praga no Brasil. Porém, é necessário garantir o controle de qualidade no processo de multiplicação sucessivas sobre os hospedeiros em condições laboratoriais. Dessa forma, foram avaliadas as características biológicas e morfológicas de *T. howardi* multiplicados em dois hospedeiros alternativos, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae). Além disso, identificamos o parasitoide via taxonomia molecular e foi determinado o perfil metabólico das número de descendentes de *T. howardi* provenientes das multiplicações sucessivas nos hospedeiros alternativos. Em *S. frugiperda* o parasitoide conseguiu manter mais alta emergência, do que em *T. molitor*, onde tendeu à diminuição da prole até a não emergência a partir da 10ª geração. A duração do ciclo tendeu aumentar em gerações mais avançadas, mas a razão sexual esteve acima de 60% nos dois hospedeiros. O comprimento da tibia e asa não variou significativamente entre as gerações, mas parasitoides de pupas de *S. frugiperda* foram maiores do que os de *T. molitor*. As sequências de DNA obtidas tiveram eficiência superior a 99%, através do *Barcode of Life Data System*. A análise através de *gas-chromatography with mass spectometry* permitiu quantificar 118 metabólitos principais de *T. howardi*. Existe potencial em utilizar pupas de *S. frugiperda* até a 19ª geração de *T. howardi* e pupas de *T. molitor* até a terceira geração sem necessitar revigorar. As sequências de DNA colaborarão para pureza das criações de laboratório, além de fornecer o banco de dados moleculares de *T. howardi* na região Neotropical. As pupas de *S. frugiperda* e *T. molitor* são adequadas para multiplicação massal de *T. howardi*. No entanto, as pupas de *T. molitor* não devem ser utilizadas por mais de três gerações sucessivas, por haver perdas na qualidade do parasitoide.

Palavras-chave: parasitoide. controle biológico. comercialização. neotropical.

GENERAL ABSTRACT

Tetrastichus howardi (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) is a parasitoid of several insect pests in Brazil. However, it is necessary to ensure quality control in the process of successive multiplication on the hosts under laboratory conditions. Thus, the biological and morphological characteristics of *T. howardi* multiplied in two alternative hosts, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) and *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae) were evaluated. In addition, we identified the parasitoid via molecular taxonomy and determined the metabolic profile of the number of *T. howardi* descendants from successive multiplications in alternative hosts. In *S. frugiperda* the parasitoid managed to maintain a higher emergence than in *T. molitor*, where it tended to decrease the number of offspring until non-emergence after the 10th generation. The cycle length tended to increase in more advanced generations, but the sex ratio was above 60% in both hosts. The length of the tibia and wing did not vary significantly between generations, but parasitoids from pupae of *S. frugiperda* were larger than those of *T. molitor*. The obtained DNA sequences had efficiency superior to 99%, through the Barcode of Life Data System. The analysis by gas-chromatography with mass spectrometry allowed the quantification of 118 main metabolites of *T. howardi*. There is potential to use *S. frugiperda* pupae up to the 19th generation of *T. howardi* and *T. molitor* pupae up to the third generation without needing to reinvigorate. The DNA sequences will contribute to the purity of laboratory creations, in addition to providing the molecular database of *T. howardi* in the neotropical region. The pupae of *S. frugiperda* and *T. molitor* are suitable for mass multiplication of *T. howardi*. However, *T. molitor* pupae should not be used for more than three successive generations, as there are losses in the quality of the parasitoid.

Keywords: parasitoid. biological control. commercialization. neotropical.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Um dos pilares mais importantes do Manejo Integrado de Pragas (MIP) é o controle biológico, através do uso de inimigos naturais que controlam a densidade de insetos considerados pragas das culturas (VAN LENTEREN, 2012; VAN LENTEREN, 2018). Em 2018, o mercado mundial de agentes de controle biológico movimentou cerca de US\$ 3 bilhões (PULIDINDI; MUKHERJEE, 2019), desde então o cultivo orgânico já ultrapassou os 70 milhões de hectares no mundo (FiBL STATISTICS, 2022). Espanha, França, Alemanha e Reino Unido que impulsionam o mercado com tecnologias para cultivos mais seguros e sustentáveis. Além de uma legislação que incentiva os produtores a preferir a produção orgânica e desenvolvem programas visando a conscientização da população por alimentos mais saudáveis e produzidos de forma sustentável (VAN LENTEREN *et al.*, 2018; PULIDINDI; MUKHERJEE, 2019; MORDOR INTELLIGENCE, 2022). O mercado de controle biológico brasileiro já movimenta anualmente mais de 528 milhões de reais (CROPLIFE, 2020). Para permitir maior cobertura de insetos-praga, nos mais diversos estágios, novas espécies de inimigos naturais precisam ser exploradas comercialmente (BUENO *et al.*, 2017; CARVALHO, 2017; PARRA; JUNIOR, 2019).

A espécie parasitoide *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) foi registrada por Silva-Torres *et al.* (2010) parasitando pupas de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) em Pernambuco, por Cruz *et al.* (2011) e Vargas *et al.* (2011) em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) em milharais em Minas Gerais e canaviais no Mato Grosso do Sul, respectivamente. É um endoparasitoide gregário, considerado generalista, coinobionte, em que as fêmeas podem se alimentar dos hospedeiros para produção de ovos (HEIMPEL; COLLIER, 1996; PRÜTZ *et al.*, 2004). Estudos relataram *T. howardi* parasitando larvas, pupas e adultos de diversas ordens de insetos, como Coleoptera e Lepidoptera (LA SALLE; POLASZEK, 2007; VARGAS *et al.*, 2011; SANQIANG *et al.*, 2021). *Tetrastichus* (Hymenoptera: Eulophidae) é o terceiro maior gênero de Tetrastichinae, majoritariamente composto por endoparasitoides coinobiontes gregários e generalistas (HANSSON; SCHIMDT, 2020). Os parasitoides do gênero *Tetrastichus* são descritos contendo mais de 500 espécies. Como geralmente não são parasitoides puramente especialistas, a coleta e identificação do hospedeiro nem sempre indica acertadamente a espécie que o parasita. Além disso, por causa do tamanho diminuto, podem ocorrer em laboratórios a confusão entre espécies e linhagens (FAVORETO *et al.*, 2020; PÉREZ-BENAVIDES *et al.*, 2020), o que é considerado

contaminação da criação (SILVA *et al.*, 2021; NOYES, 2022), pois prejudica o suprimento das exigências específicas. Bem como a liberação em campo da espécie errada pode arruinar o manejo pretendido (PREZOTTI *et al.*, 2004; FISCHBEIN *et al.*, 2016; ESPINOSA; VIRLA 2019; ESPINOSA; VAN NIEUWENHOVE; VIRLA, 2019). Por isso, utilizar a taxonomia integrativa, que considera tanto o DNA *barcoding* quanto às combinações de características morfológicas dos indivíduos permite distinguir mais eficientemente as espécies de interesse (FAVORETO *et al.*, 2020; NOYES, 2022).

Além disso, para as espécies de parasitoide consideradas generalistas, o hospedeiro pode afetar significativamente a aptidão da população (GHIMIRE; PHILLIPS, 2014). Pois a alimentação das larvas dos parasitoides é influenciada através da espécie, idade, qualidade e disponibilidade do hospedeiro (HEIMPEL; COLLIER, 1996). Em geral, a qualidade da multiplicação de parasitoides pode ser verificada através de parâmetros biológicos como o parasitismo, emergência e razão sexual, e/ou morfológicos como mensurações da tíbia posterior e/ou asa anterior dos adultos (PREZOTTI *et al.*, 2004; VACARI *et al.*, 2012; SMANIOTTO, 2016; SILVA *et al.*, 2021), consideradas variáveis confiáveis de tamanho, pois permanecem com o comprimento integral mesmo após a morte e armazenamento dos indivíduos (LA SALLE; POLASZEK, 2007). É importante ressaltar que a variação fenotípica nos traços biológicos e/ou morfológicos observados entre indivíduos ou entre populações da mesma espécie pode resultar de fatores genéticos e ambientais. Por isso é importante avaliar os parasitoides mantidos por diversas gerações em condições de laboratório com temperatura, umidade, oferta de alimento e hospedeiro constantemente favoráveis (GARIEPY *et al.*, 2015; TOUGERON *et al.*, 2017; DONELSON *et al.*, 2018; SHUWEN *et al.*, 2020).

Para averiguar a oportunidade de inserir *T. howardi* como parasitoide no mercado de controle biológico brasileiro é essencial conhecer os possíveis efeitos do processo de multiplicação massal de *T. howardi* em laboratório, e considerar as adaptações de aprendizagem do parasitoide, efeitos na biologia e morfologia a longo prazo através do condicionamento hospedeiro em condições laboratoriais (QUEIROZ *et al.*, 2017; REYNOLDS, 2017; DONELSON *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021; JUNIOR *et al.*, 2022). Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da multiplicação sucessiva de *T. howardi* sobre pupas de *S. frugiperda* sobre a porcentagem de pupas parasitadas, porcentagem de pupas com emergência de parasitoides, número de descendentes, duração do ciclo de vida ovo - adulto e razão sexual, comprimento da tíbia posterior e da asa anterior.

2 REFERÊNCIAS

BUENO, A.F.; CARVALHO, G.A.; SANTOS, A.C.; SOSA-GOMEZ, D.R.; SILVA, D.M. Pesticide selectivity to natural enemies: challenges and constraints for research and field recommendation. **Ciência Rural**, v. 47, n. 6, p. 1-10. 2017.

CARVALHO, F.P. Pesticides, environment and food safety. **Food and Energy Security**, v. 6, p. 48-60. 2017.

CROPLIFE. **Controle Biológico faz parte do futuro da Agricultura**. 2020. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/conceitos/control-biologico/>> Acessado em: mai., 2022.

CRUZ, I. *et al.* Novo registro de *Tetrastichus howardi* (Olliff) como parasitoide de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) em milho. **Scientia agricola**, v. 68, n. 2, p. 252-254. 2011.

DONELSON, J.M.; SALINAS, S.; MUNDAY, P.L.; SHAMA, L.N.S. Transgenerational plasticity and climate change experiments: where do we go from here? **Global change biology**, v. 24, p. 13-34. 2018.

ESPINOSA, M.S.; VIRLA, E.G. Egg maturation by *Gonatopus bonaerensis* (Hymenoptera: Dryinidae) When provided with two species of planthopper (Delphacidae) as hosts. **Biology Control**, v. 117, p. 123-127. 2018.

ESPINOSA, M.S.; VAN NIEUWENHOVE, G.A.; VIRLA, E.G. Host makes the difference: the effect of two planthopper host species on host-feeding and parasitismo activities of the pincer wasp *Gonatopus bonaerensis*. **BioControl.**, v. 64, p. 655-664. 2019.

FAVORETO, A.L. *et al.* *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae): First report of parasitismo in *Oxydia vesulia* (Lepidoptera: Geometridae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 1, p. 1-5. 2020.

FiBL Statistics – European and global organic farming statistics. The world of organic agriculture. **International Trade Centre**. 2022.

FISCHBEIN, D. *et al.* A comparative analysis of host-feeding and life-history traits in parasitoid wasps. **Entomologia Experiment & Appl.**, v. 159, p. 172-180. 2016.

GARIEPY, V. *et al.* Why two species of parasitoids showed promise in the laboratory but failed to control the soybean aphid under field conditions. **Biology Control**, v. 80, p. 1-7. 2015.

GHIMIRE, M.N.; PHILLIPS, T.W. Oviposition and reproductive performance of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) on six diferente pyralid host species. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 107, p. 809-817. 2014.

- HANSSON, C.; SCHMIDT, S. A revision os European species of the genus *Tetrastichus* Haliday (Hymenoptera: Eulophidae) using integrative taxonomy. **Biodiversity Data Journal**, v.8, 2020.
- HEIMPEL, G.E.; COLLIER, T.R. The evolution of host-feeding behaviour in insect parasitoids. **Biological Reviews**, v. 71, n. 3, p. 373-400. 1996.
- JUNIOR, L.M.A. *et al.* Transferibilidade de marcadores microssatélites para *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 21, p. 66-70. 2022.
- LA SALLE, J.; POLASZEK, A. Afrotropical species of the *Tetrastichus howardi* species group (Hymenoptera: Eulophidae). **African Entomology**, v. 15, p. 45-56. 2007.
- MORDOR INTELLIGENCE. **Biological control Market** – growth, trends, covid-19 impact, and forecasts (2022-2027). 2022.
- NOYES, J.S. **Universal Chalcidoidea Database**. World Wide Web electronic publication. <<http://www.nhm.ac.uk/chalcidoids>> Acessado em: mar., 2022.
- PARRA, J.R.P.; JUNIOR, A.C. Applied biological control in Brazil: From laboratory assays to field application. **Journal Insect Science**, v. 19, n. 2. 2019.
- PÉREZ-BENAVIDES, A.L. Integrative taxonomy to assess the species richness of chalcidoid parasitoids (Hymenoptera) associated to Bruchinae (Coleoptera: Chrysomelidae) from Mexico. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 91. 2020. e913492
- PREZOTTI, L. *et al.* Effect of the size of the founder population on the quality of sexual populations of *Trichogramma pretiosum*, in laboratory. **Biological Control**, v. 30, n .2, p. 174-180. 2004.
- PULIDINDI, K.; MUKHERJEE, S. Biocontrol Agents Market. **GMI – Global Market Insights**. 2020. Disponível em: <<https://www.gminsights.com/industry-analysis/biocontrol-agents-market>>
- PRÜTZ, G. Transgenic insect-resistant corn affects the fourth trophic level: Effects of *Bacillus thuringiensis* – corn on the facultative hyperparasitoid *Tetrastichus howardi*. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 9, p. 451-454. 2004.
- QUEIROZ, A.P.; BUENO, A.F.; POMARI-FERNANDES, A.; BORTOLOTTI, O.C.; MIKAMI, A.Y.; OLIVE, E.L. Influence of host preference, mating, and realease density on the parasitismo of *Telenomus remus* (Nixon) (Hymenoptera, Platygasteridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 61, p. 86-90. 2017.
- REYNOLDS, J.A. Epigenetic influences on diapause. **Advances in Insect Physiology**, v. 53, p. 115-144. 2017.
- SANQUIANG, Y. *et al.* Effects of temperature and supplementary food on the development and fecundity of the Eulophida parasitoid *Tetrastichus howardi* on *Spodoptera frugiperda*

(Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal Pest Management**, doi: doi.org/10.1080/09670874.2021.1968535. 2021.

SHUWEN, X. *et al.* Quantitative genetics of wing morphology in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*: hosts increase sibling similarity. **Heredity**, v. 125, p. 40-49. 2020.

SMANIOTTO, G. **Variabilidade de parâmetros biológicos e genéticos de *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) no Brasil.** Embrapa Clima Temperado. Dissertação. 2016.

SILVA, R.B. *et al.* Behavioral aspects of the parasite *Cotesia flavipes* produced in a laboratory on the North coas of Paraíba. **Research Development**, v. 10, n. 2, e46910212666. 2021.

SILVA-TORRES, C.S.A. *et al.* New records of natural enemies of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) in Pernambuco, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 5, p. 835-838. 2010.

TOUGERON, K. *et al.* Intraspecific maternal competition induces summer diapause in insect parasitoids. **Insect Science**, v. 25, p. 1080-1088. 2017.

VACARI, A.M.; GENOVEZ, G.S.; LAURENTIS, V.L.; BORTOLI, S.A. Fonte proteica na criação de *Diatraea saccharalis* e seu reflexo na produção e no controle de qualidade de *Cotesia flavipes*. **Bragantia**, v. 71, p. 355-361. 2012.

VAN LENTEREN, J.C. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl**, v. 57, p. 1-27. 2012.

VAN LENTEREN, J.C.; BOLCKMANS, K.; KOHL, J.; RAVENSBERG, W.J. URBANEJA, A. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**, v. 62, p. 1-25. 2018.

VARGAS, E.L. 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**, v. 26, p. 143-146, 2011.

CAPÍTULO 1

Multiplicação sucessiva de *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

RESUMO

O parasitoide *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) é importante inimigo natural de diversos insetos-praga no Brasil. Para utilização do parasitoide como parte do controle biológico, é necessário compreender os possíveis efeitos sobre a população de criações laboratoriais, mantidas em condições constantes e sobre a mesma espécie hospedeira. Assim, foram avaliados os efeitos biológicos e morfológicos das gerações ímpares até completar 33 gerações sucessivas de *T. howardi* sobre pupas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em condições constantes de laboratório. Para a biologia foram avaliadas: a porcentagem de pupas parasitadas, porcentagem de pupas com emergência de parasitoides, número de descendentes, duração do ciclo de vida ovo - adulto e razão sexual. Para dados da morfologia, foi mensurado o comprimento da tíbia posterior e da asa anterior de 13 fêmeas em cada geração analisada de *T. howardi*. O parasitismo e emergência não foram afetados, enquanto o número de descendentes diminuiu e a duração do ciclo aumentou. A razão sexual foi mantida acima de 70% de fêmeas. O comprimento da tíbia e asas diminuíram ao longo das gerações. Os resultados permitem sugerir a multiplicação de *T. howardi* sobre pupas de *S. frugiperda* até a 27ª geração, sem perdas significativas na qualidade do parasitoide.

Palavras-chave: Parasitoide. Hospedeiro alternativo. Controle biológico.

ABSTRACT

The parasitoid *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) is an important natural enemy of several insect pests in Brazil. In order to use the parasitoid as part of biological control, it is necessary to understand the possible effects on the population of laboratory creations, kept under constant conditions and on the same host species. Thus, the biological and morphological effects of odd generations up to 33 successive generations of *T. howardi* on pupae of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) were evaluated under constant laboratory conditions. For biology, the following parameters were evaluated: the percentage of parasitized pupae, percentage of pupae with parasitoid emergence, number of offspring, duration of the egg-adult life cycle and sex ratio. For morphological data, the length of the hind tibia and fore wing of 13 females in each analyzed generation of *T. howardi* was measured. Parasitism and emergence were not affected, while the number of offspring decreased, and the cycle length increased. The sex ratio was maintained above 70% of females. The length of the tibia and wings have decreased over the generations. The results allow us to suggest the multiplication of *T. howardi* on *S. frugiperda* pupae up to the 27th generation, without significant losses in the quality of the parasitoid.

Keywords: Parasitoid. Alternative host. Biological control.

1 INTRODUÇÃO

Parasitoides do gênero *Tetrastichus* (Hymenoptera: Eulophidae) compõem um grupo com potencial de uso no controle biológico, pois são relatados controlando diversas ordens de insetos como por exemplo Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera e Mantodea (LA SALLE, J.; POLASZEK, 2007; VARGAS *et al.*, 2011). Recentemente, *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) tem recebido esforços em pesquisas brasileiras por ser uma espécie que parasita larvas, pupas e adultos (VARGAS *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2016; FAVORETO *et al.*, 2020). O comportamento gregário e a capacidade de parasitar diversos organismos são desejáveis (COSTA *et al.*, 2014; FAVORETO *et al.*, 2020), por possibilitar a multiplicação massal do parasitoide em diversos hospedeiros.

No entanto, poucas espécies foram consideradas como hospedeiros alternativos para a reprodução de *T. howardi* em laboratório, por exemplo as espécies: *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae) têm sido apontadas como os melhores hospedeiros alternativos (TIAGO *et al.*, 2019; ALVARENGA, 2021), devido ao baixo custo e conveniência da manutenção, quando comparadas ao hospedeiro natural, a *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) (CRUZ *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2021).

Para o controle biológico aplicado, é primordial maximizar a produção massal desses agentes de controle biológico. A multiplicação em laboratório, pode afetar características do parasitoide, o que pode culminar em prejuízo da qualidade dos inimigos naturais (QUEIROZ *et al.*, 2017; TIAGO *et al.*, 2019). Portanto, entender como os parasitoides podem ser afetados por multiplicações sucessivas em laboratório é crucial para o estabelecimento de populações saudáveis e eficientes, uma vez que a reprodução em laboratório de parasitoides pode induzir a depressão endogâmica e/ou deriva genética. Além disso, alguns fatores também podem influenciar a população multiplicada em condições de laboratório como a temperatura e umidade, o tempo de hora-luz, a oferta de alimentação dos adultos e/ou o estágio em que o hospedeiro é ofertado aos parasitoides (PRATISSOLI *et al.*, 2005; QUEIROZ *et al.* 2017; PARRA; JUNIOR, 2019; TIAGO *et al.*, 2019). Por isso, verificar a qualidade das populações laboratoriais de inimigos naturais é indispensável e pode ser monitorada por diversos parâmetros mensuráveis, sendo que os mais utilizados consideram a biologia, morfologia e o comportamento das populações (FERREIRA *et al.*, 2016; PARRA; JUNIOR, 2019). A taxa de

parasitismo, emergência de adultos e a razão sexual da população são importantes métricas que indicam se o inimigo natural ainda pode parasitar eficientemente o hospedeiro (PEREIRA *et al.*, 2009; FAVERO *et al.*, 2014). Assim como o tamanho da tíbia posterior e das asas anteriores podem indicar a capacidade de movimentação das fêmeas, o que está ligado à possibilidade de encontrar o hospedeiro e buscar alimento, como o néctar (WALDBAUER, 1968; WÄCKERS *et al.*, 2008; TENA *et al.*, 2015). Cada um desses parâmetros, quando avaliados separadamente podem gerar ruídos que dificultam a correta interpretação da população reproduzida. Por isso, é necessário padronizar as informações de maneira que convirjam agregando informação sobre a eficiência do parasitismo de *T. howardi*, reproduzido sucessivamente sobre o mesmo hospedeiro.

Assim, o objetivo deste trabalho é: 1) avaliar a influência do condicionamento de *T. howardi* sobre pupas de *S. frugiperda* ao longo de sucessivas gerações sobre o parasitismo, emergência, número de prole e razão sexual das populações em gerações ímpares do parasitoide; 2) verificar como o comprimento da tíbia posterior e da asa anterior de fêmeas de *T. howardi* é afetado ao serem mantidas sobre pupas da mesma espécie hospedeira ao longo de sucessivas gerações.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 IDENTIFICAÇÃO DE *T. howardi*

2.1.1 Identificação morfológica

Diagnóstico de *Tetrastichus howardi*. Antena das fêmeas: escapo pálido, amarelado, com contraste com o pedicelo escuro, funículos e maça marrom escuro. Escapo ventralmente sem placa sensorial. Um anellus. Funículo com três segmentos, com cada segmento mais estreito e mais longo que o próximo (Figura 1.A). Veia submarginal com duas cerdas dorsais (Figura 1.B). Propódeo com carena distinta em forma de Y invertido, imediatamente medial ao espiráculo (Figura 1.C). Paineis do propódeo com rugosidades e reticulação.

2.1.2 Identificação molecular

Para a extração e posterior sequenciamento do DNA, todas as etapas ocorreram em ambiente climatizado a 25 ± 1 °C, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa. Todas as amostras de DNA foram homogeneizadas manualmente, invertendo o micro tubo, nenhuma foi agitada em vórtex para evitar a fragmentação do DNA. Foram usados como reagentes 1) o tampão de lise CTAB [composto por 100 mM de Tris HCl, 20 mM de EDTA, 2% de CTAB p/v e 1,2 M NaCl], combinado com 5 mL de TrisHCl 1M (pH 8), 2 mL de EDTA 0,5 M, 1 g de pó CTAB e 3,5 g de NaCl, completando até 50 mL com água ultrapura; 2) o tampão CTAB diluído [composto por 100mM de Tris HCl, 20 mM de EDTA, 2% de CTAB p/v e 1,2 M NaCl] combinado com 5 mL de TrisHCl 1 M (pH 8), 2 mL de EDTA 0,5 M e 1 g de pó CTAB, completando até 50 mL com água ultrapura.

Cada amostra consistiu por uma única fêmea de *T. howardi*, macerada diretamente no microtubo tipo eppendorf de 2 mL, sem reagentes, com o auxílio de bastão de vidro. Então, foram adicionados 500 µL de tampão de lise CTAB, em cada amostra. Em seguida, foram adicionados 30 µL de Proteinase K, em cada amostra, para permanecer todas por seis horas de incubação a 60 °C e 150 rpm. Posteriormente, os microtubos foram resfriados à temperatura de 25 °C e adicionados 500 µL de clorofórmio, invertendo cada tubo até a completa homogeneização e consequente centrifugação à 25 °C por 15 min a 3000 g. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL e foram adicionados 2 volumes de tampão CTAB diluído.

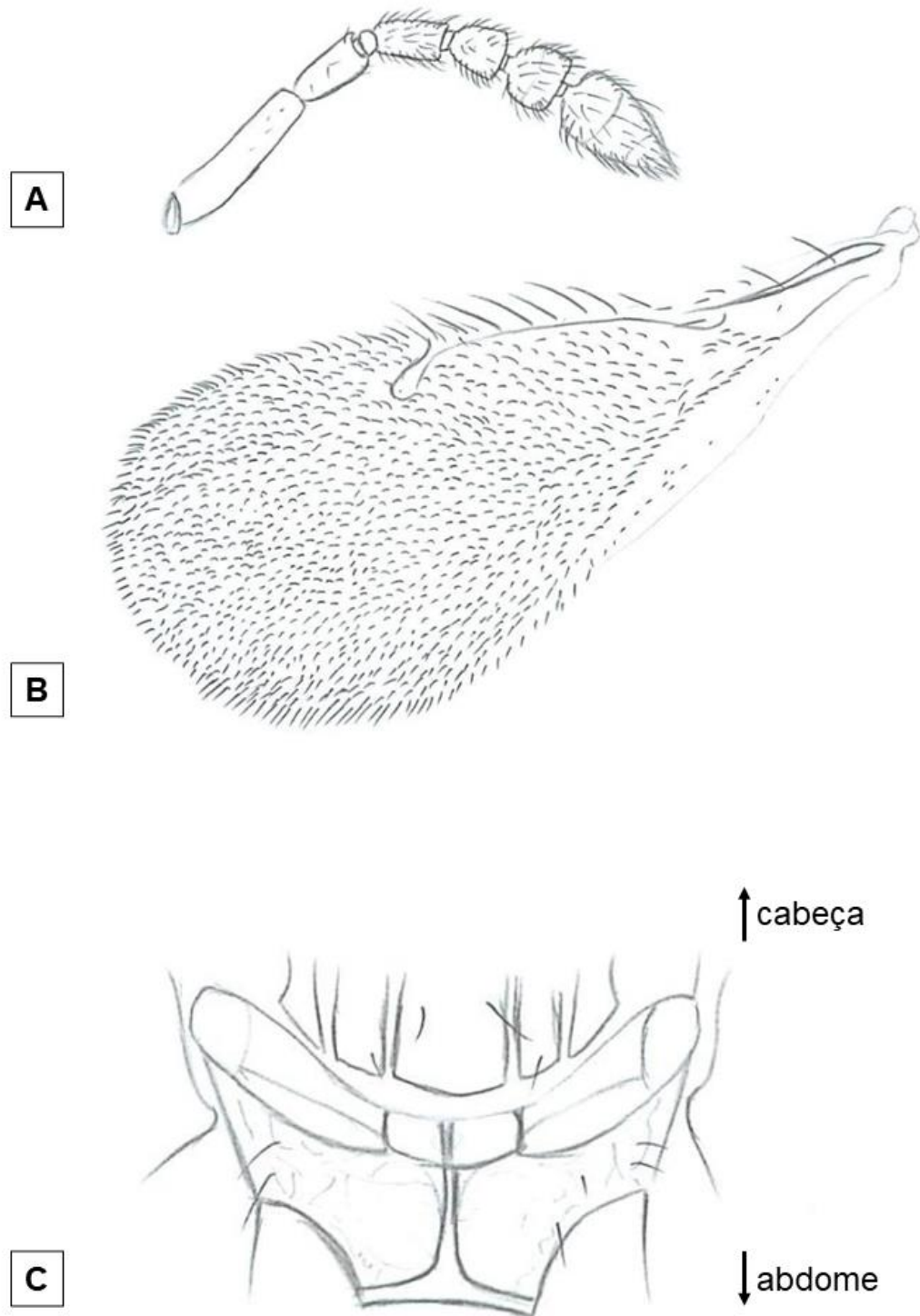


Figura 1. Estruturas ilustradas de uma fêmea de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em vista dorsal. A) Antena; B) Asa anterior; C) propódeo.

As amostras foram novamente homogeneizadas invertendo os microtubos manualmente e devolvidas à incubadora por 30 min a 60 °C, a 150 rpm, quando passou a ser perceptível a

formação de cristais flutuando nos microtubos. As amostras foram agitadas a 16000 g por 3 minutos à 25 °C para precipitação do DNA e descartado o sobrenadante. Para remover o CTAB, foi adicionado 1 mL de etanol 80% e mantido em descanso por 15 minutos a 25 °C. As amostras foram invertidas manualmente diversas vezes para que o etanol pudesse envolver completamente o DNA. As amostras foram novamente agitadas a 16000 g por 3 minutos à 25 °C para precipitação do DNA e descartado o sobrenadante. Foi realizada a lavagem final com mais 1 mL de etanol 80% por microtubo por 3 minutos a 16000 g na centrífuga com descarte do sobrenadante. Para extrair qualquer resquício de etanol, os microtubos foram dispostos de cabeça para baixo em cima de papel toalha com as tampas abertas. Os pellets de DNA foram ressuspensos com 100 µL de água ultrapura; no mesmo momento da adição da água em cada microtubo a própria pipeta foi usada para trazer o pellet para cima e para baixo e dissolver completamente o DNA. Todas as amostras foram armazenadas em freezer a - 20 °C.

As amostras extraídas foram diluídas quando a concentração de DNA foi maior que 100 ng/µL. Cada tubo conteve 24 µL do mix de PCR + 1 µL de DNA diluído. O mix para 12 amostras consistiu em: 50 µL de Buffer de PCR, 15 µL de MgCl₂, 10 µL de *primer* F, 10 µL de dNTPs, 2 µL de Taq polimerase e 382 µL de água ultrapura. Todos os tubos de PCR, contendo cada amostra, foi acondicionado no termociclador com o programa “COI Universal”.

Para a eletroforese, utilizamos gel de agarose a 1,5% e coramos as amostras com T4 + *gel red*. Foi utilizado 3 µL de corante para cada 4 µL de produto de PCR. As amostras foram pipetadas nos pocinhos do gel de agarose em sequência, da esquerda para a direita, pulando o primeiro pocinho, onde foi pipetado o marcador de 50pb. A corrida da eletroforese foi permitida por 40 min em corrente elétrica a 100 V. Imediatamente no final da corrida do gel, utilizamos o fotodocumentador para observamos as imagens obtidas através do gel de agarose com as amostras coradas. As imagens foram obtidas através do espectrofotômetro NanoPhotometer e do software Image Lab 4.0. O *primer* utilizado foi o LCO-1490F (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG).

Para o mix de EXO/SAP utilizamos: 2,5 µL de EXO e 2,5 µL de SAP e 15 µL de água ultrapura. A EXO/SAP são enzimas que digerem o excesso de primers e degradam o excesso de nucleotídeos provenientes da PCR, respectivamente. Sem esse procedimento de remoção de substâncias indesejadas que não foram incorporadas, o sequenciamento pode ser prejudicado. Foi utilizado 1 µL do mix de EXO/SAP e 10 µL de DNA de cada amostra e levadas ao termociclador por pelo menos 45 min.

Para o mix de sequenciamento foi utilizado 6 µL de BigDye, 74 µL de SafeMoney, 40 µL de primer diluído e 60 µL de água ultrapura. Para a diluição do primer, foi usado 6,4 de

cada primer (F ou R) + 33,6 µL de água ultrapura. Em cada tubo de PCR foram colocados 9 µL e 1 µL de PCR purificado. Todos os tubos foram levados ao termociclador por aproximadamente 3h30, com o protocolo de reação para sequenciamento.

Para a precipitação das reações de sequenciamento, foi pipetado 1 µL de EDTA 125 MM em cada amostra. Foi adicionado 1 µL de acetato de sódio 3M + 32 µL de etanol 95% e agitamos manualmente. As amostras foram mantidas no escuro a 25 °C, por 15 min. Então foram centrifugadas a 2340 RCF por 30 min e o sobrenadante foi removido por inversão imediatamente ao final da centrifugação, não superando 5 min para todas as remoções. Foi pipetado 35 µL de etanol a 70% em cada amostra e centrifugadas a 2340 RCF por mais 15 min. Todas as amostras foram novamente invertidas sobre papel toalha e secas em termociclador com as tampas abertas a 55 °C até todo o etanol evaporar completamente. As amostras foram acondicionadas em envelope de papel alumínio, devidamente identificadas para posterior sequenciamento.

2.2 EFEITOS DE SUCESSIVAS GERAÇÕES DE *T. howardi* SOBRE PUPAS DE *S. frugiperda*

2.2.1 Multiplicação de *T. howardi*

A população de *T. howardi* foi cedida pelo Laboratório de Controle Biológico de Insetos – LECOBIO da Universidade Federal de Grande Dourados – UFGD, onde fora mantida desde 2009 sobre pupas de *D. saccharalis*. Os adultos de *T. howardi* foram mantidos em tubos de vidro (8,5 cm de comprimento x 2,5 cm de diâmetro) vedados com plástico filme e alimentados com gotículas de mel puro. Para a multiplicação do parasitoide, 10 fêmeas previamente acasaladas do parasitoide foram coletadas através da inversão do tubo em que emergiram e um novo tubo limpo foi posicionado em cima delas, foi permitido subirem fêmeas até termos todas as 10. As fêmeas foram mantidas em tubos similares a mencionado anteriormente contendo pupas de *S. frugiperda* de até 48h de idade por um período de 48h para permitir o parasitismo. O sexo dos adultos de *T. howardi* geralmente é determinado de acordo com características morfológicas da antena e é possível observar a olho nu, as fêmeas apresentam funículo com três segmentos das antenas pigmentados e nos machos, o funículo é formado por quatro segmentos e apenas a clava é pigmentada (LA SALLE; POLASZEK, 2007) (Figura 2).



Figura 2. Antenas de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae): A) fêmea; B) macho.

2.2.2 Obtenção das pupas do hospedeiro alternativo de *T. howardi*

As pupas de *S. frugiperda* utilizadas neste experimento foram provenientes da criação estabelecida no Núcleo de Desenvolvimento em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças - NUDEMAFI, no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES CCAE.

A criação de *S. frugiperda* foi mantida à 25 ± 2 °C, umidade relativa do ar de 60% e fotofase de 14 horas. Os adultos foram mantidos em gaiolas tipo PVC cobertas interiormente com papel sulfite branco para oviposição, alimentados através de algodão embebido com mel a 10%. As lagartas com 10 dias de idade foram individualizadas em recipientes de acrílico e alimentadas com dieta artificial à base de feijão conforme Cruz (2000), porém sem adição de solução inibidora. Após atingirem a fase pupal foram recolhidas para os experimentos e/ou manutenção em laboratório.

2.2.2.1 Análise nutritiva das pupas de *S. frugiperda*

Para analisar a influência nutritiva das pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) sobre *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) é necessário determinar o teor das substâncias presentes nas pupas do hospedeiro. As pupas utilizadas nas análises foram pré-secas em estufa de circulação forçada de ar a 55 °C por 24h, para a análise de matéria seca.

Posteriormente, as pupas foram finamente moídas e utilizadas para as seguintes análises: matéria seca; proteína bruta; lipídios; Fibra em Detergente Neutro (NDS).

2.2.2.2 Matéria seca das pupas de *S. frugiperda*

Foram utilizados cadinhos específicos para aquecimento, que foram pesados e registrados, e então foram adicionados 1,5 g de cada amostra, sendo três amostras. Todos os recipientes foram mantidos em estufa com circulação forçada de ar a 55 °C por 24 h. Posteriormente, para que a temperatura dos recipientes equilibrasse à do meio ambiente, foram retirados da estufa e colocados em dessecador por quatro horas (AOAC, 1990; MERTENS, 1993). Então os pesos foram novamente registrados. Esse material é chamado de amostra pré-seca, que posteriormente foi moída e acondicionada em frascos de vidro devidamente etiquetados, essas são as amostras que foram utilizadas nas análises subsequentes (APÊNDICE C).

2.2.2.3 Proteína bruta das pupas de *S. frugiperda*

As pupas pré-secas e moídas *S. frugiperda* passaram por digestão com ácido sulfúrico (H_2SO_4) em tubos abertos, aonde o Nitrogênio das amostras foi convertido em amônia (NH_3) e ao final do processo em amônio (NH_4^+). Foram utilizadas três amostras, contendo 400 mg cada. Em cada amostra foi adicionado 10 mL de H_2SO_4 , e 2 g da mistura digestora (uma parte de sulfato de sódio, Na_2SO_4 para dez partes de sulfato de cobre pentahidratado, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$). A digestão foi realizada por ebulição lenta que consiste em começar a ebulição no microdigestor Kjeldahl em temperatura moderada (50 °C) e aumentar 50 °C a cada 30 min até atingir 350 °C. Ao final do processo, as amostras foram mantidas à 350 °C por 5h para total digestão do material orgânico. Quando o material orgânico foi totalmente digerido, a solução passou de uma cor escura, quase preta, para um verde claro, indicativo de que a digestão ocorreu corretamente. Então foi adicionado 40 mL de água destilada e os tubos foram mantidos em ambiente para esfriar. O tubo digestor contendo cada amostra digerida foi transferido para o conjunto de destilação, onde foram adicionados 20 mL de hidróxido de sódio NaOH. Enquanto isso, foram preparados seis Erlenmeyer, cada um contendo 250 mL, 50 mL de água destilada e 50 mL de ácido bórico a 4% e o indicador misto (0,132 g de vermelho-de-metila em 70 mL de álcool etílico, 0,066 g de verde-de-bromocresol em 70 mL de álcool etílico em um balão volumétrico de 200 mL, e completo e homogeneizado com álcool etílico). Posteriormente, para receber toda a amônia dos tubos de digestão de cada amostra, cada Erlenmeyer foi encaixado no destilador de nitrogênio SL – 74. Logo após, foi titulado ácido clorídrico (HCl 0,1 N) até a viragem do indicador misto de verde para rosa (APÊNDICE D) (SILVA; QUEIROZ, 2002).

2.2.2.4 Lipídios das pupas de *S. frugiperda*

Foram utilizadas três amostras de 1,5 g cada uma, em saquinhos filtrantes, vedados. Os béqueres utilizados foram pesados vazios e contendo a amostra. Foram adicionados 40 mL de éter em cada béquer e foram mantidos a 0,5 cm de distância entre si e os aquecedores. Essa extração durou cerca de quatro horas, em temperatura máxima (5 a 6 gotas de condensação por segundo). Ao final, foi permitido que o éter escoasse pelos dedais de vidro por cerca de 30 min. Posteriormente, o éter foi destilado, sem que chegasse à ebulição, pois poderia oxidar os lipídios. A evaporação do éter foi finalizada em capela operacional com fluxo forçado. Todas as seis amostras devidamente evaporadas, então foram mantidas por 30 min em estufa de secagem por convecção a 105 °C e posteriormente colocadas em um dessecador para esfriarem (AOAC, 1990). A diferença entre esse último peso do béquer contendo a amostra digerida e ao béquer vazio correspondente, são os dados dos lipídios que foram extraídos.

2.2.2.5 Fibra em Detergente Neutro das pupas de *S. frugiperda*

Em seis béqueres de 600 mL foram colocadas seis amostras, contendo cerca de 1g cada. Foram adicionados 100 mL da solução de detergente neutro em temperatura ambiente (APÊNDICE B). Foram acrescentados 50 µL de amilase e todos os béqueres foram postos no digestor. Após a ebulição por cinco minutos, as amostras foram mantidas em refluxo por 60 min. Todas as amostras foram imediatamente filtradas à vácuo em cadinho filtrante, previamente seco a 105 °C por duas horas, com duas lavagens do béquer com água quente (90 a 100 °C) para garantir a coleta de todas as partículas das amostras. Posteriormente, os cadinhos foram lavados mais duas vezes com acetona (30 a 40 mL), com molho de 20 min em cada lavagem. A filtração foi realizada à vácuo até esgotar. Todos os cadinhos com as amostras foram secos em estufa por oito horas a 100 °C, esfriados em dessecador e novamente pesados (APÊNDICE E), com registro dos valores.

2.2.3 Condicionamento das gerações de *T. howardi*

As pupas foram acondicionadas individualmente com 10 fêmeas de *T. howardi* em tubos de vidro (8,5 cm de comprimento x 2,5 cm de diâmetro) vedados com plástico filme e como fonte alimentar para o parasitoide foram adicionadas gotículas de mel puro nas laterais do tubo. Foram analisadas as gerações ímpares de *T. howardi* (F1, F3, F5, F7, F9, F11, F13, F15, F17, F19, F21, F23, F25, F27, F29, F31 e F33).

Os aspectos biológicos avaliados foram: a porcentagem de pupas parasitadas; [(número de pupas com emergência de parasitoides + pupas sem emergência de adultos) / (número total de pupas) × 100]; porcentagem de pupas com emergência de parasitoides [(número de pupas com emergência de adultos dos parasitoides) / (número de pupas parasitadas) × 100]; número de filhos (número de parasitoides emergidos por pupa); duração do ciclo de vida (ovo - adulto) (dias); e razão sexual (RS= número de fêmeas / número de adultos) de *T. howardi*. O sexo dos adultos de *T. howardi* geralmente é determinado de acordo com características morfológicas da antena, sendo que as fêmeas apresentam funículo com três segmentos das antenas pigmentados e nos machos, o funículo é formado por quatro segmentos e apenas a clava é pigmentada (LA SALLE; POLASZEK, 2007). O parasitismo é possível ser observado através do enrijecimento e escurecimento da pupa, quando colocada em um foco de luz é possível observar as larvas do parasitoide através do tegumento do hospedeiro (Figura 3). Para coleta dos dados biológicos, foram analisadas 25 pupas em cada geração, sendo 25 repetições, totalizando 425 pupas analisadas. Os aspectos morfológicos observados foram o comprimento da tibia posterior e o comprimento da asa anterior. Pois são os caracteres morfológicos não tão suscetíveis à interferência de montagem de lâminas ou ressecamento/expansão do tegumento. Para análise das medidas morfológicas foram considerados 13 repetições, que consistiram em 13 indivíduos ao acaso em cada geração, totalizando 221 fêmeas adultas de *T. howardi* proveniente de *S. frugiperda*. Para evitar o ressecamento causado pela morte natural, os adultos foram conservados em tubos contendo álcool 70%.



Figura 3. Pupa de *Spodoptera frugiperda* parasitada por *Tetrastichus howardi*.

2.2.4 Preparo dos espécimes de *T. howardi* para mensurações

Para visualização das estruturas, os espécimes foram clarificados com hidróxido de potássio (KOH) 10% por 12 horas e montados utilizando Líquido de Hoyer. As asas de cada indivíduo foram estendidas para mensurar desde a base da veia submarginal até a margem distal, as tíbias foram mensuradas desde a junção da tíbia com o fêmur até a junção da tíbia com o tarso (Figura 4) (SOUZA *et al.*, 2018). A aquisição das imagens e mensurações foram realizadas através do estereomicroscópio Leica DM 750 com sistema fotográfico ICC50E, com o software Las Ez versão 3.2.0.

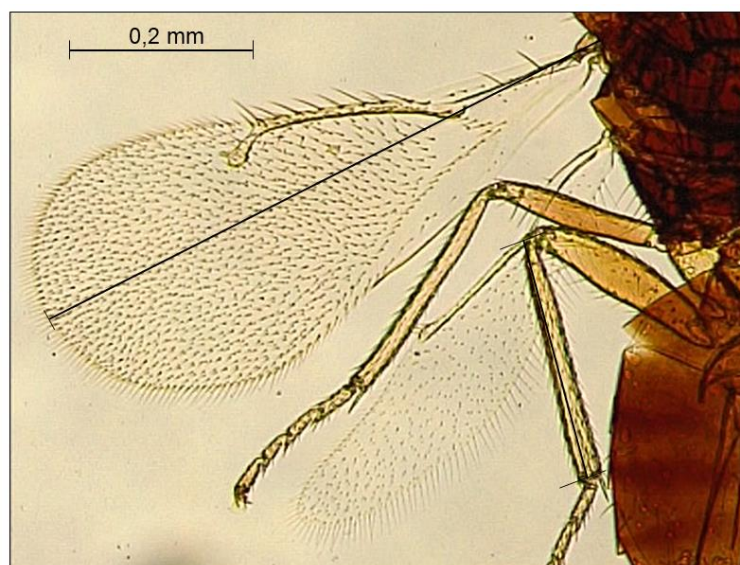


Figura 4. Mensuração da asa e tíbia posterior das fêmeas de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae).

2.2.5 Metabólitos observados em *T. howardi* proveniente de pupas de *S. frugiperda*

2.2.5.1 Amostragem de *T. howardi* para o perfil metabólico

Para a obtenção do perfil metabólico, uma população de *T. howardi*, foi coletada, composta por indivíduos provenientes de pupas de *S. frugiperda* imediatamente após a emergência, sem qualquer tipo de alimentação.

Para sacrificar os organismos e pausar os processos metabólicos, bem como impedir a degradação metabólica iniciada imediatamente à morte dos indivíduos, as amostras de *T. howardi* foram acondicionadas em microtubos tipo eppendorf de 2 mL, e inseridas em garrafa térmica contendo nitrogênio líquido. As amostras foram compostas por indivíduos de cada geração de *T. howardi* proveniente respectivamente de pupas de *S. frugiperda*.

2.2.5.2 Extração dos metabólitos de *T. howardi*

A extração de metabólitos foi adaptada do protocolo de Lisec *et al.* (2006). Cerca de 200 mg das amostras previamente coletadas e armazenadas em refrigerador à -80 °C foram maceradas na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um fino pó, e então transferidas para microtubos do tipo eppendorf de 2 mL contendo 1400 µL de metanol 99,9% (pré-resfriado a -20 °C) e 60 µL de solução ribitol à 0,2 mg mL⁻¹. Posteriormente, a mistura foi incubada em um termo agitador a 1000 rpm a 70 °C por 10 min e, em seguida, centrifugada a 11000 g por 10 min.

Foram transferidos aproximadamente 600 µL do sobrenadante para um novo micro tubo e adicionados 375 µL de clorofórmio (pré- resfriado a -20 °C) e 750 µL de água destilada (dH₂O, 4 °C) e agitados por 10 s. A solução foi novamente centrifugada a 2200 g por 10 min para a separação das fases. Em seguida, foram transferidos 200 µL da fase superior (fase polar) para um micro tubo de 1,5 mL. As amostras foram secas em um concentrador à vácuo e novamente armazenadas em refrigerador à -80 °C até a etapa de derivatização.

2.2.5.3 Derivatização dos metabólitos de *T. howardi*

Para o processo de derivatização, as amostras seguiram para um concentrador à vácuo a 30 °C por 30 min. Já na etapa de derivatização, foram adicionados 40 µL da solução de cloridrato de metoxiamina (20 mg mL⁻¹ em piridina) à cada amostra, seguido de agitação a 900 rpm por 2 h a 37 °C em termo agitador. Posteriormente, foram adicionados em cada amostra 70 µL de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) mais 8 µL do padrão de tempo de retenção (mistura 0,029% (v/v) dos alcanos: n-dodecano, n-pentadecano, n-nonadecano, n-docosano, n-octacosano, n-dotracontano e n-hexatriacontano dissolvidos em piridina) e foram incubadas em termo agitador a 900 rpm a 37 °C por 30 min. Dessa solução, 100 µL foram transferidos para *vials* de vidro com *insert* de 250 µL e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Além disso, para servir como controle, foi realizada a reação de derivatização em um micro tubo vazio.

2.2.5.4 Parâmetros de análise por GC-MS

A abordagem de pré-processamento de GC-MS é baseada na detecção de pico de deconvolução de espectros de massa (referente ao processamento do sinal gerado, imagem) (BRACEWELL, 2000), alinhamento do tempo de retenção em diferentes amostras e a

normalização, com objetivo de remover a variação dos dados (CUADROS-INOSTROZA *et al.*, 2009).

Cada amostra foi analisada em um cromatógrafo gasoso acoplado à um espectrômetro de massas, modelo GCMS-*QP2010 SE* (Shimadzu, Quioto - Japão). O instrumento é equipado com um amostrador automático, modelo AOC-20s (Shimadzu, Quioto - Japão). Foi utilizada a coluna cromatográfica DB-35MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm , J & W Scientific, Folsom, CA, EUA). Foi injetado 1 μl de amostra em modo *split* de razão 1:25 utilizando hélio como gás carreador com 2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de fluxo constante. Foi utilizada uma rampa de aquecimento do forno, com início em 80 $^{\circ}\text{C}$ por 2 min, e acrescentando 15 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até atingir 330 $^{\circ}\text{C}$, quando foi mantido por 6 min. Foi utilizado o modo de ionização de elétrons (EI) em 70 eV, com taxa de aquisição de 20 varreduras $\cdot\text{s}^{-1}$, com intervalo de varredura de massa entre 70 m/z à 600 m/z dos compostos. A temperatura do injetor e da linha de transferência foram fixadas em 230 $^{\circ}\text{C}$ e 250 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

2.2.5.5 *Processamento de dados CG-MS*

Para essa análise, foi utilizado o software livre R e o pacote R Target Search (CUADROS-INOSTROZA *et al.*, 2009). Foi então fornecido o arquivo de definição de amostra para processar, e uma biblioteca de referência contendo as informações do metabólito a ser buscado. Sete alcanos foram usados como compostos de padrão interno para fazer correções de RI, e o RT dos marcadores padrão foi convertido em RI usando interpolação linear (VAN DEN DOOL; DEC. KRATZ, 1963). As intensidades das massas selecionadas foram normalizadas para a mediana das triplicatas e então utilizadas para extrair outras massas com perfis de ápice correlacionados. O RI médio foi considerado para representar a posição exata onde o metabólito elui na respectiva amostra.

A biblioteca de metabólitos utilizada pode ser encontrada no material suplementar de número 5 da publicação TargetSearch, através do endereço eletrônico do trabalho realizado por Cuadros-Inostroza *et al.* (2009). O procedimento de atualização de RI de três etapas foi realizado utilizando TargetSearch :: medianRILib, TargetSearch :: sampleRI e TargetSearch :: peakFind (CUADROS-INOSTROZA *et al.*, 2009).

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para estimar os efeitos das sucessivas gerações sobre o mesmo hospedeiro nas características biológicas e morfológicas do parasitoide, utilizamos o Modelo Linear Generalizado Misto (GLMM), assumindo erros com distribuição de Poisson (MCCULLAGH; NELDER, 1989). Todas as análises foram realizadas no software livre R Core Team (2022), através dos pacotes: lme4 e vgam. Apenas os metabólitos presentes, ou ausentes para metabólitos únicos, em todas das três repetições das amostras foram aceitos para análise de acumulação diferencial, para garantir a qualidade do processamento dos dados. Foram considerados os metabólitos diferencialmente acumulados com médias das repetições de forma diferente pelo teste t de Student (p -valor $<0,05$) e um Log2 de mudança de dobra $> 0,5849625$ para metabólitos up-acumulados e $<-0,5849625$ para metabólitos down-acumulados.

Todas as concentrações relativas foram realizadas considerando a dobra entre o tratamento (aplicação de qualquer metal pesado) e o controle (ausência de metal pesado). Mapas de calor de intensidades normalizadas e valores de Log2 de mudança de dobra também foram plotados (GALILI *et al.*, 2018).

3 RESULTADOS

O tempo para obtenção das 33 gerações de *T. howardi* em pupas de *S. frugiperda* foi de 21 meses. A partir da 20ª geração de *T. howardi* foram observadas algumas pupas mumificadas, o que demonstra o parasitismo, mas sem o desenvolvimento completo dos parasitoides (Figura 5).



Figura 5. Pupas de *S. frugiperda* mumificadas através do parasitismo de *T. howardi*.

O parasitismo e a emergência não foram afetados pelas gerações de *T. howardi* sobre pupas de *S. frugiperda* coef= 0,01453, P = 0,453 (Figura 6.A e B). No entanto, o número de parasitoides emergidos decresceu ao longo das sucessivas gerações (Figura 6.C). E embora a duração do ciclo (ovo - adulto) de *T. howardi* tenha aumentado, a média da razão sexual foi mantida superior a 80% (Figura 6.D e E). Já o comprimento da tíbia posterior e da asa anterior das fêmeas de *T. howardi* diminuiu significativamente através das gerações com $\bar{x} = 0,328$, erro padrão = 0,00774 e $\bar{x} = 0,736$, erro padrão = 0,0134, respectivamente (Figura 7).

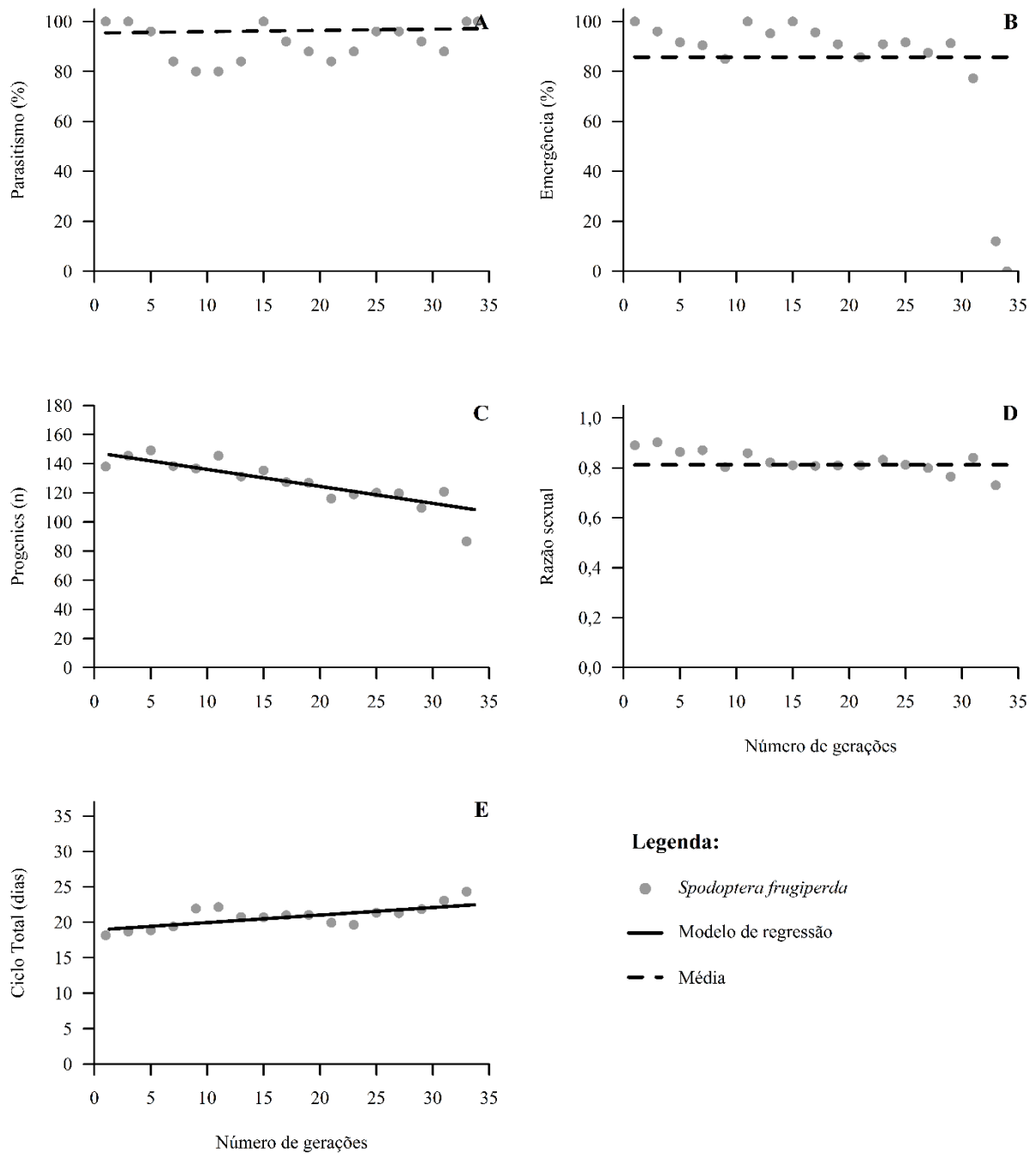


Figura 6. Resultados observados de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): A) Porcentagem de parasitismo; B) Emergência; C) Progenie (número de descendentes); D) Razão sexual; e E) Ciclo total em dias.

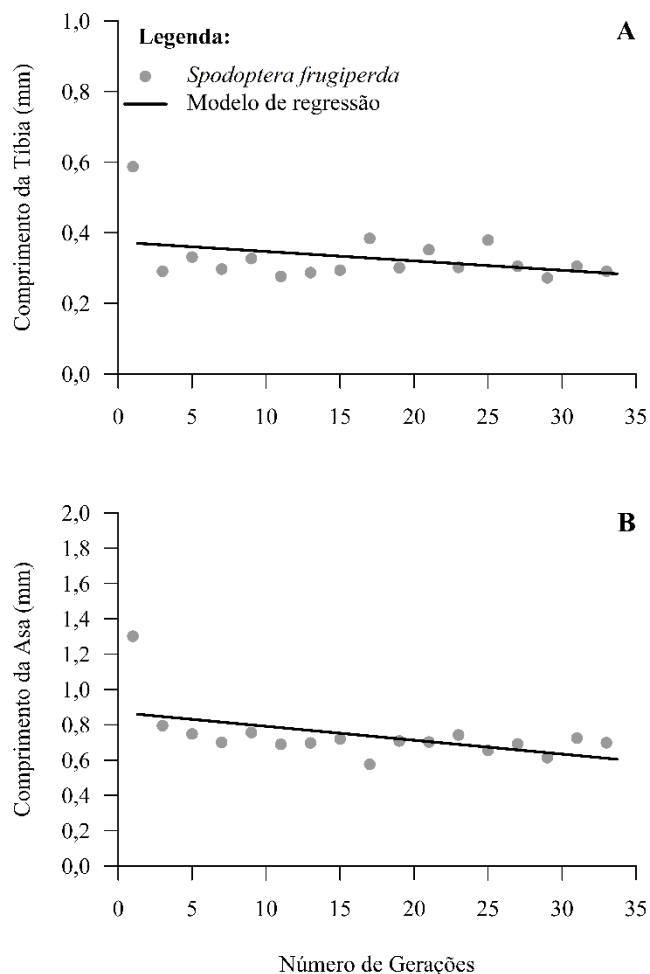


Figura 7. Resultados observados de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): A) Comprimento da tibia posterior (mm) e B) Comprimento da asa anterior (mm). Os círculos representam os valores observado em cada geração, a linha contínua é a tendência observada no experimento.

A análise GC/MS permitiu a identificação metabólitos importantes de *T. howardi* provenientes de pupas em *S. frugiperda*. Os metabólitos mais abundantes foram respectivamente o ácido ascórbico, ácido carboxílico, leucina e o ácido hidrocafeico (Tabela 1).

Tabela 1 Metabólitos detectados em *T. howardi* provenientes de pupas de *S. frugiperda*.

Tirosina (2TMS)	Histamina, N-omega-acetil- (2TMS)
Cistina (4TMS)	Citrullina (3TMS)
Ácido hipúrico (3TMS)	Ácido láctico, 3-imidazole- (3TMS)
Ácido orótico- (4TMS)	Ácido prephênico (1MEOX) (3TMS)
Ácido hidrocafeico (3TMS)	Ácido palmítico
Ácido ascórbico (4TMS)	Ácido pentanodioico, 2-methyl- (2TMS)
Indole-2-carboxylic acid, 5-hydroxy- (3TMS)	Hydantoin, 5-(4-hydroxybutyl)- (3TMS)
Ácido glucônico [-H ₂ O] (5TMS)	Ácido galacturônico (1MEOX) (5TMS) MP
Kynurenina (4TMS)	Methionina, N-formyl- (1TMS)
Phytol (1TMS) MP	Diisopropanolamina (3TMS)
Histidina, N-tau-metil- (2TMS)	Leucina

4 DISCUSSÃO

As altas porcentagens de parasitismo e emergência de adultos de *T. howardi* nas populações provenientes de pupas de *S. frugiperda* nos permite observar a plasticidade fenotípica do parasitoide. A prole consegue aprender sobre o hospedeiro ao longo das sucessivas gerações, assim como observado com *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae) (QUEIROZ *et al.* 2017). Vargas e colaboradores (2013) observaram parasitismo acima de 95% após 25 gerações de *T. howardi* multiplicado sobre pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Hopkinson *et al.* (2013) observaram que os ovários das fêmeas mal alimentadas durante a fase larval tendem a deteriorar e diminuir de 100 para menos de 70 ovos, o que prejudica o parasitismo, emergência e número de descendentes do parasitoide. O parasitismo e a emergência de parasitoides também dependem do estado nutricional das fêmeas ascendentes, ou seja, a qualidade nutricional materna (HARVEY *et al.*, 2012).

A emergência de adultos de *T. howardi* decresceu ao longo das sucessivas gerações, porém foi mantida acima de 80%, o que é satisfatório em criações laboratoriais de *T. howardi*, conforme observado por Vargas (2013) e Tiago *et al.* (2019). A porcentagem de emergência em laboratório é uma característica essencial para liberações inundativas e quanto mais elevada, maior a vantagem da criação de *T. howardi* (TIAGO *et al.*, 2019; HANSSON; SCHMIDT, 2020). Esse registro é importante, pois podemos observar que apesar de não emergirem adultos a partir da 34ª geração de *T. howardi*, o parasitismo ainda foi verificado, através da morte das pupas e a presença da massa larval dos parasitoides.

O número de descendentes nas últimas gerações de *T. howardi* foi similar entre as gerações iniciais. Quando o número de filhos é alto pode haver competição entre irmãos ocasionando efeitos negativos no desenvolvimento dos parasitoides bem como sobre o tamanho do corpo, principalmente das fêmeas (DEMOED *et al.*, 1997; MORAES *et al.*, 2004; SHUWEN *et al.*, 2020).

O número de gerações de *T. howardi* influenciou o tempo de desenvolvimento (ovo - adulto) do parasitoide. Observamos que ao longo das gerações o tempo de desenvolvimento tendeu a aumentar, de 17 dias a até 24 dias em algumas amostras das últimas gerações de *T. howardi*. Dorn e Beckage (2007) observaram que parasitoides gregários tendem a aumentar o tempo de desenvolvimento conforme o tamanho da pupa do hospedeiro, por causa do número de larvas que o organismo é capaz de sustentar e em situações em que as gerações anteriores

experimentaram ambientes de temperatura constante. Geralmente, o desenvolvimento de *Tetrastichus* sp. ovo - adulto pode durar até quatro semanas (HANSSON; SCHMIDT, 2020).

A razão sexual de *T. howardi* decresceu ligeiramente nas sucessivas gerações, mas foi mantida sempre acima de 80% até a 27ª geração, o que é relatado como valor favorável e importante para criações de parasitoide (BARBOSA *et al.*, 2015; QUEIROZ *et al.*, 2017; TIAGO *et al.*, 2019), pois favorece a liberação de fêmeas em campo, podendo influenciar na supressão das populações hospedeiras ou a estabilidade das interações hospedeiro - parasitoide que são as responsáveis por causar a mortalidade dos insetos-praga (QUEIROZ *et al.*, 2017; TIAGO *et al.*, 2019; NURKOMAR; AZHAR; BUCHORI, 2021). Gil *et al.* (2020) observaram que a razão sexual do parasitoide coinobionte *Microcharops anticarsiae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) sofre forte influência materna. Conforme as gerações do parasitoide avançaram, o tempo de desenvolvimento, bem como a razão sexual foi afetada. As diferenças na razão sexual em cada número de filhos resultante podem ser influenciadas pela qualidade do hospedeiro em que as mães se desenvolveram. Proles mais numerosas, com uma proporção sexual predominantemente feminina geralmente resultam de condições de maior qualidade nutricional e tamanho do hospedeiro (NURKOMAR; AZHAR; BUCHORI, 2021).

O comprimento da tíbia posterior e da asa anterior de *T. howardi* diminuiu ao longo das gerações. O tamanho da tíbia é uma estimativa confiável do tamanho corporal de parasitoides, pois além de ser fortemente correlacionado com o comprimento do corpo, sofre menos alterações por idade e/ou após a morte (DOYON; BOIVIN, 2005), e o comprimento da asa pode afetar a capacidade de voo (DUDLEY, 2002). Indivíduos maiores geralmente têm superioridade competitiva por alimento, cópula e oviposição, possuem maior longevidade, capacidade reprodutiva e de busca por hospedeiros, uma vez que possuem maior reserva energética (KISHANI *et al.*, 2016; ROLLIN *et al.*, 2016; RAGLAND; ARMBRUSTER; MEUTI, 2019). O tamanho do corpo do parasitoide, geralmente é reflexo da existência de reservatórios energéticos desde a fase larval (OLSON; ANDOW, 1998; BEZEMER *et al.*, 2005).

Organismos maiores estão relacionados ao tempo da postura, não à maturação dos ovos. Olson *et al.* (2001) observaram que quanto menor o indivíduo menor a sobrevivência, porque dispõem de menos reservas energéticas. Wootton (1992) demonstrou que asas mais longas proporcionam maior velocidade de voo e resistência corporal em manter o movimento. Por isso, dependendo das condições em que os insetos são expostos, geralmente ocorrem adaptações na morfologia das asas, como o aumento ou diminuição do comprimento total (SHUWEN *et al.*, 2020). Não existem muitos estudos relacionando as asas de parasitoides com a possível seleção

genética na população. No entanto, alguns trabalhos já relataram o efeito materno também para expressão fenotípica, como tamanho da asa em *Drosophila* sp. (Diptera: Drosophilidae) (DEMOED *et al.*, 1997; MORAES *et al.*, 2004).

Em casos de hospedeiros com alta imunidade, pode haver alta pressão seletiva sobre a prole de parasitoides que atua favorecendo parasitoides maiores, como alguns processos de encapsulamento e melanização do hospedeiro que tendem a diminuir a eficácia em relação ao tamanho do organismo a ser encapsulado (BRASHAW; HOLZAPFEL, 2001; POMFRET; KNELL, 2006; LACOUR *et al.*, 2014).

O sucesso do controle biológico de pragas depende da obtenção de parasitoides de qualidade. É desejável estimular artificialmente a variabilidade genética da população de parasitoides, através de diferenças de temperaturas, luminosidade e umidade relativa do ar, além de ofertar hospedeiros diferentes. É possível manter *T. howardi* sobre pupas de *S. frugiperda* por mais gerações sucessivas antes da necessidade de revigoração da população (F27).

A criação de *T. howardi* em pupas de *S. frugiperda* por 33 gerações sucessivas não afetou o parasitismo, emergência e razão sexual dos descendentes. No entanto, apesar de permanecerem em níveis adequados de qualidade de *T. howardi*, o número de descendentes diminuiu e o tempo de desenvolvimento aumentou.

5 CONCLUSÃO

Nossas observações neste trabalho servem de base para a compreensão da variação nas populações de *T. howardi* multiplicados em laboratório. Demonstramos que tanto o número de filhos, razão sexual, o comprimento da tíbia posterior e da asa anterior de fêmeas de *T. howardi* são afetados através de sucessivas gerações do parasitoides sobre pupas de *S. frugiperda*.

Através deste estudo é possível afirmar que é possível multiplicar *T. howardi* sucessivamente sobre pupas de *S. frugiperda*, sem perdas significativas da qualidade (parasitismo, emergência de adultos e razão sexual) até a 27ª geração do parasitoide.

6 REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, T.M. **Hospedeiros alternativos para a criação em massa do parasitoide *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae)**. 25p. UFV-Viçosa. (Dissertação). 2021.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. ed15. Washington D.C. 1141p. 1990.
- BARBOSA, R.H. *et al.* Parasitismo e aspectos biológicos de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae). **Ciência Rural**, v. 45, n. 2, 2015.
- BEZEMER, T.M. *et al.* Influence of adult nutrition on the relationship between body size and reproductive parameters in a parasitoid wasp. **Ecology Entomology**, v. 30, p. 571-580. 2005.
- BRACEWELL, R. **The fourier transform and its applications**. 3ed. New York. p. 24-54. 2000.
- BRASHAW, W.E.; HOLZAPFEL, C.M. Genetic shift in photoperiodic response correlated with global warming. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 14509-14511. 2001.
- COSTA, D.P. *et al.* Reprodução de *Tetrastichus howardi* em pupas de *Diatraea saccharalis* de diferentes idades. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 57, p. 67-71. 2014.
- CUADROS-INOSTROZA, Á. *et al.* TargetSearch – a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 1-12. 2009.
- CRUZ, I. Desde o começo. **Cultivar**, n. 12, p. 10–14, 2000.
- CRUZ, I. *et al.* New record of *Tetrastichus howardi* (Olliff) as a parasitoid of *Diatraea saccharalis* (Fabr.) on maize. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 2, p. 252-254. 2011.
- DEMOED, G.H.; DEJONG, G.; SCHARLOO, W. Environmental effects on body size variation in *Drosophila melanogaster* and its cellular basis. **Genetics Research**, v. 70, p. 35–43. 1997.
- DORN, S.; BECKAGE, N.E. Superparasitism in gregarious hymenopteran parasitoids: ecological, behavioural and physiological perspectives. **Physiological entomology**, v. 32, n. 3, p. 199-211. 2007.
- DOYON, J.; BOIVIN, G. The effect of development time on the fitness of female *Trichogramma evanescens*. **Journal insect science**, v. 5, p. 4-9. 2005.
- DUDLEY, R. Mechanisms and implications of animal flight maneuverability. **Integrative and Comparative Biology**, 42:135–140. 2002.

- FAVERO, K. *et al.* Life and fertility tables of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) with *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pupae. **Annals of the entomological Society of América**, v. 107, p. 621-626. 2014.
- FAVORETO, A.L. *et al.* *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae): First report of parasitismo in *Oxydia vesulia* (Lepidoptera: Geometridae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 1, p. 1-5. 2020.
- FERREIRA, N.G.P. *et al.* Multiplicar *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em la oruga de la seda afecta su biología? **Acta biológica colombiana**, v. 21, p. 189-193. 2016.
- GALILI, T. *et al.* Heatmaply: Na R package for creating interactive cluster heatmaps for online publishing. **Bioinformatics**, v. 34, n. 9, p. 1600-1602. 2018.
- GIL, O.J.A. *et al.* The sex ratio of the koinobiont parasitoid *Microcharops anticarsiae* Gupta remains female-biased on young larvae of velvetbean in the laboratory environment. **Acta scientiarum biological sciences**, v. 42, e48187. 2020.
- HANSSON, C.; SCHMIDT, S. A revision os European species of the genus *Tetrastichus* Haliday (Hymenoptera: Eulophidae) using integrative taxonomy. **Biodiversity Data Journal**, v. 8, 2020.
- HARVEY, J.A. *et al.* The effect of diferente dietary sugars and honey on longevity and fecundity in two hyperparasitoid wasps. **Journal Insect Physiological.**, v. 58, p. 816-823. 2012.
- HOPKINSON, J.E. *et al.* Honeydew as a source of nutrition for *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae): effect of adult diet on lifespan and egg load. **Australian Journal of Entomology**, v. 52, p. 14-19. 2013.
- KISHANI, F.H. *et al.* The effect of host nutritional quality on multiple components of *Trichogramma brassicae* fitness. **Bulletin of Entomological Research**, v. 106, p. 633-341. 2016.
- LA SALLE, J.; POLASZEK, A. Afrotropical species of the *Tetrastichus howardi* species group (Hymenoptera: Eulophidae). **African Entomology**, v. 15, p. 45-56. 2007.
- LACOUR, G. *et al.* When mothers anticipate: effects of the prediapause stage on embryo development time and of maternal photoperiod on eggs of a temperate and a tropical strains of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 71, p. 87-96. 2014.
- LISEC, J. *et al.* Gas chromatography mass spectrometry – based metabolite profiling in plants. **Nature protocol**, v. 1, n. 1. 2006.
- MCCULLAGH, P.; NELDER, J.A. **Generalized Linear Models**. 2nd Edition, Chapman and Hall, London. 1989.
- MERTENS, D.R. Determining dry matter in diverse types of feed. **Proceedings NFTA Forage Analysis Workshop**, p. 1993. 1993.

MORAES, E.M.; SENE, F.M. Heritability of wing morphology in a natural population of *Drosophila gouveai*. **Genetica**, v. 121, n.2, p. 119–123. 2004.

NURKOMAR, I.; AZHAR, A.; BUCHORI, D. Sex allocation and field population sex ratio of *Apanteles taragamae* Viereck (Hymenoptera: Braconidae), a larval parasitoid of the cucumber moth *Diaphania indica* Saunders (Lepidoptera: Crambidae). **Open Agriculture**, v. 6. 2021. doi.org/10.1515/opag-2021-0045

OLSON, D.M.; ANDOW, D.A. Larval crowding and adult nutrition effects on longevity and fecundity off emale *Trichogramma nubilale* Ertle and Davis (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Environmental Entomology**, v. 27, p. 508-514. 1998.

OLSON, D.A.W.N. *et al.* Effects of sugar feeding on carbohydrate and lipid metabolism in a parasitoid wasp. **Physiological Entomology**, v. 25, p. 17-26. 2001.

PARRA, J.R.P.; JUNIOR, A.C. Applied biological control in Brazil: From laboratory assays to field application. **Journal Insect Science**, v. 19, n. 2. 2019.

PEREIRA, F.F. *et al.* Progenie de *Palmistichus elaiesis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) parasitando pupas de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) de diferentes idades. **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 660-664. 2009.

POMFRET J.C.; KNELL, R.J. Immunity and the expression of a secondary sexual trait in a horned beetle. **Behavioral Ecology**, v. 17, p. 466-472. 2006.

PRATISSOLI, D. *et al.* Capacidade de dispersão de *Trichogramma* em tomateiro estaqueado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 6, p. 613-616, 2005.

QUEIROZ, A.P.; BUENO, A.F.; POMARI-FERNANDES, A.; BORTOLOTTI, O.C.; MIKAMI, A.Y.; OLIVE, E.L. Influence of host preference, mating, and release density on the parasitism of *Telenomus remus* (Nixon) (Hymenoptera, Platygasteridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 61, p. 86-90. 2017.

RAGLAND, G.J.; ARMBRUSTER, P.A.; MEUTI, M.E. Evolutionary and functional genetics of insect diapause: a call for greater integration. **Current Opinion in Insect Science**, v. 36, p. 74-81. 2019.

RODRIGUES, A. *et al.* Parasitism behavior of *Tetratichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) on larvae and pupae of sugarcane borers. **Journal of insect behavior**, v. 34, p. 71-81. 2021.

ROLLIN, O. *et al.* Weed-insect pollinator networks as bioindicators of ecological sustainability in agriculture: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 36, 8p. 2016.

SHUWEN, X. *et al.* Quantitative genetics of wing morphology in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*: hosts increase sibling similarity. **Heredity**, v. 125, p. 40-49. 2020.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos**: métodos químicos e biológicos. 3.ed. Viçosa: UFV. 235p. 2002.

SOUZA, D. *et al.* Morphometry, allometry, and fluctuating asymmetry of egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* under insecticide influence. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 166, n. 4, p. 298-303. 2018.

TIAGO, E.F. *et al.* Biological quality of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) reared with *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pupae after cold storage. **Florida Entomologist**, v. 102, n. 3, p. 571-576. 2019.

TENA, A. *et al.* Sugar provisioning maximizes the biocontrol service of parasitoids. **Journal of Applied Ecology**, v. 52, p. 795-804. 2015.

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**, v. 26, p. 143-146, 2011.

VARGAS, E.L. *et al.* Parasitism and development of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) on caterpillar and pupae *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Tese de doutorado. UFGD. 89p. 2013.

VAN DEN DOOL, H.; DEC KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, n. C, p. 463-471. 1963.

WÄCKERS, F.L. *et al.* Honeydew as a food source for natural enemies: making the best of a bad meal? **Biological Control**, v. 45, p. 176-184. 2008.

WALDBAUER, G.P. The consumption and utilization of food by insects. **Advances in Insect Physiology**, v. 5, p. 229-288. 1968.

WOOTTON, R.J. Functional morphology of insect wings. **Annual Review of Entomology**, v. 37, p. 113-140. 1992.

APÊNDICE A

Tabela 1. Determinação de proteína bruta através do método Semimicro Kjeldahl de pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (SF) secas à 55 °C por 24h em estufa de circulação forçada de ar. Fator para análise = 1,02.

Amostra	ASA - Tara (g)	Ácido clorídrico (mL)			Proteína ASA (g)	Proteína MS (%)	Teor de MS (%)	FDN (%)
		Vol. total	Branco	Vol. real				
SF1	0,3563	22,4	0,4	22	0,0194	55,11 a	9,87 a	2,15 a
SF2	0,3099	20,8	0,4	20,4	0,0182	58,75 a	9,97 a	5,72 a
SF3	0,4210	29,4	0,4	29	0,0257	61,48 a	9,83 a	6,71 a

ASA: Amostra Seca ao Ar (55 °C); MS: Matéria Seca; FDS: Fibra em Detergente Neutro; Valores entre linhas com letras iguais, não diferem no teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Determinação de lipídios de pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (SF) secas à 55 °C por 24h em estufa de circulação forçada de ar.

Amostra	Peso do saquinho (g)	Saquinho + amostra (g)	ASA (g)	Copo + lipídios depois da digestão	Teor de MS (%)	Lipídios (g)	Lipídios MS (%)	Lipídios no Material Natural (%)
SF1	0,4305	2,1458	1,7153	1,6488	9,87 a	0,497	28,99 a	2,86
SF2	0,3979	2,1409	1,743	1,6420	9,97 a	0,4989	28,62 a	2,85
SF3	0,4257	2,4385	2,0128	1,8601	9,83 a	0,5784	28,73 a	2,82

ASA: Amostra Seca ao Ar (55 °C); MS: Matéria Seca; FDS: Fibra em Detergente Neutro; Valores entre linhas com letras iguais, não diferem no teste Tukey a 5% de probabilidade.

APÊNDICE B

Para 1 L de solução de Detergente Neutro, utilizada nessa tese:

Reagentes:

1 L de água destilada

30 g de sulfato láurico de sódio

4 g de NaOH + 14,61 de EDTA ácido ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

6,81 g de borato de sódio hidratado

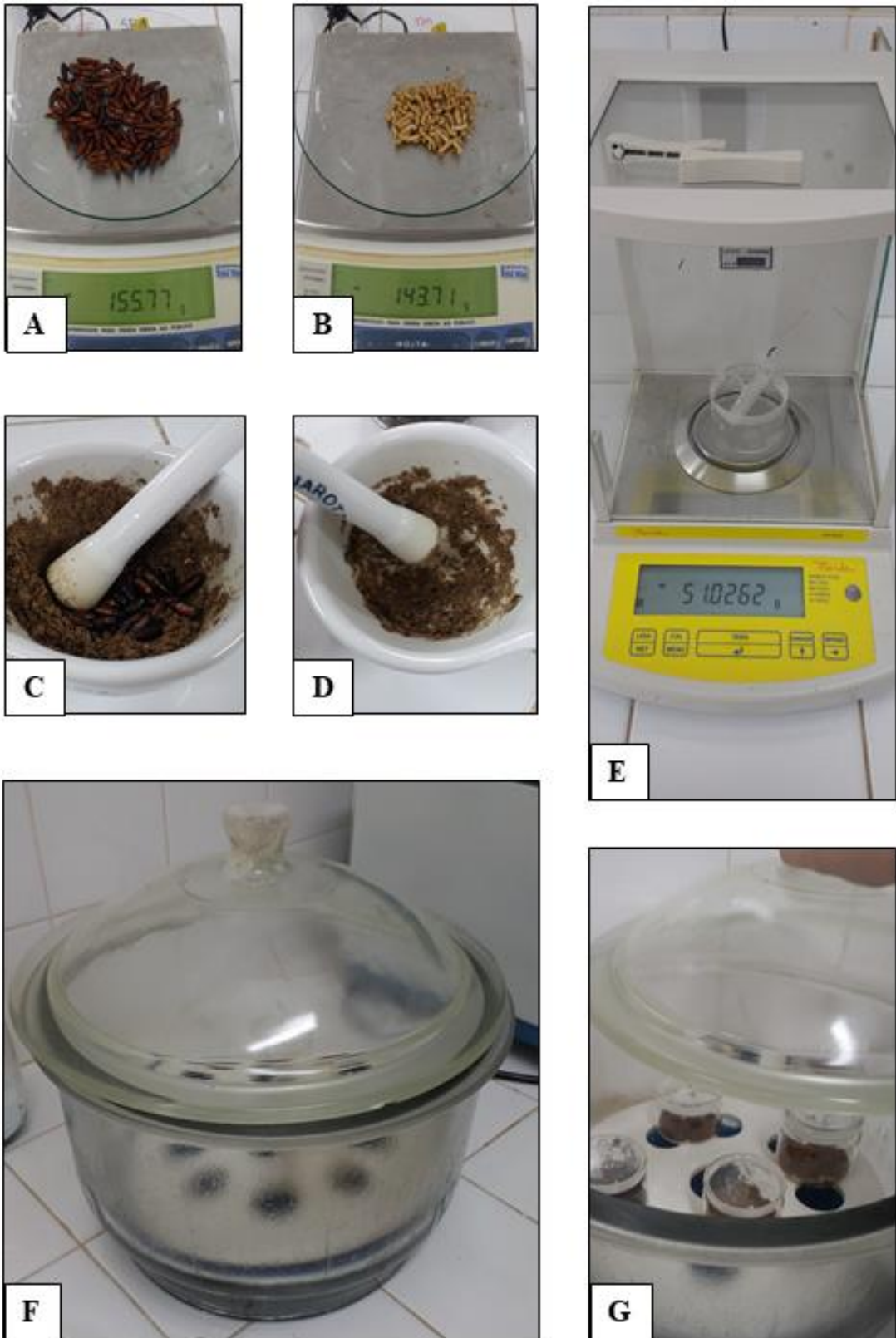
4,56 g de fosfato de ácido de sódio anidro (Na_2HPO_4)

10 mL de trietileno glicol

Preparo da solução:

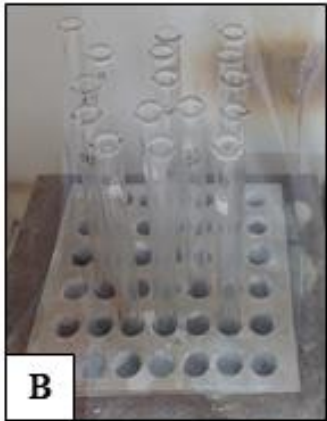
Dissolver o NaOH em 3L de água destilada e adicionar o ácido EDTA e o borato de sódio hidratado, reserve. Dissolver o fosfato de sódio anidro em 400 mL de água em placa de aquecimento com agitador. Adicionar os componentes dissolvidos em um recipiente de 20 L. Misture a solução enquanto estiver quente. Dissolva a metade do sulfato láurico de sódio em 4 L de água e repita esse processo e armazene em recipiente de 2 L através de um funil, evitando ao máximo fazer espuma. Para controlar a formação de espuma, adicione conforme a necessidade o trietileno glicol e o restante adicione no recipiente de 20 L, misturando bem. Para evitar a precipitação dos materiais, mantenha a solução acima de 20 °C. Ao final, a solução deverá conter entre 6,95 a 7,05 de pH, caso seja necessário ajustar, pode ser usado HCl ou NaOH até atingir o intervalo desejado.

APÊNDICE C



Prancha 1. Procedimento para obtenção de matéria seca das pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). A e B) Pesagem das pupas antes da secagem. C e D) maceração completa das pupas; E) Pesagem do equipamento antes de receber o material orgânico; F e G) manutenção das amostras em dessecador para esfriarem, após a secagem.

APÊNDICE D



Prancha 2. Procedimento para obtenção de proteína bruta das pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). A, B e C) digestão das amostras através do uso de ácido sulfúrico; D) conjunto de destilação onde todas as amostras foram passadas; E) titulação de ácido clorídrico (HCl 0,1 N) até a viragem do indicador misto.

APÊNDICE E



Prancha 3. Procedimento para obtenção de Fibra em Detergente Neutro (FDN) das pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). A) amostras secas e maceradas em saquinhos de TNT antes da análise; B) digestor onde as amostras foram mantidas em ebulição por cinco minutos; C) metodologia de montagem das amostras para serem levadas ao digestor; D) digestor onde as amostras foram mantidas em refluxo por 60 min.

CAPÍTULO 2

Multiplicação sucessiva de *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae)

RESUMO

O parasitoide *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) é apontado como inimigo natural para o controle biológico brasileiro. Para utilização eficiente do parasitoide, é necessário compreender as implicações das populações laboratoriais, sobre condições constantes e em hospedeiros alternativos. Assim, foram avaliados os efeitos biológicos e morfológicos das gerações ímpares de *T. howardi* até completar 9 gerações sucessivas sobre pupas de *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae) em condições constantes de laboratório. Para a biologia foram avaliadas: a porcentagem de pupas parasitadas, porcentagem de pupas com emergência de parasitoides, número de descendentes, duração do ciclo de vida ovo - adulto e razão sexual. Para dados da morfologia, foi mensurado o comprimento da tíbia posterior e da asa anterior de 13 fêmeas em cada geração analisada de *T. howardi*. O parasitismo, emergência e número de descendentes diminuíram, enquanto o número médio da razão sexual foi mantido ao longo das gerações e a duração do ciclo aumentou. A razão sexual foi mantida acima de 70% de fêmeas. O comprimento da tíbia e asas diminuíram ao longo das gerações. Os resultados permitem sugerir a multiplicação de *T. howardi* sobre pupas de *T. molitor* até a 3ª geração, sem perdas significativas na qualidade do parasitoide. *T. molitor* é uma alternativa viável para aumentar a criação de *T. howardi* em laboratório e para liberação segura do parasitoide em campo.

Palavras-chave: Parasitoide; controle biológico; hospedeiro alternativo.

1 INTRODUÇÃO

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) contém o controle biológico, como um método eficiente de controle de pragas, através do uso de inimigos naturais (VAN LENTEREN, 2012; VAN LENTEREN, 2018). Para permitir maior cobertura de insetos-praga, nos mais diversos estágios, novas espécies de inimigos naturais precisam ser exploradas comercialmente (BUENO *et al.*, 2017; CARVALHO, 2017; PARRA; JUNIOR, 2019).

A espécie parasitoide *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) foi registrada por Silva-Torres *et al.* É um endoparasitoide gregário, considerado generalista, coinobionte, em que as fêmeas podem se alimentar dos hospedeiros para produção de ovos (HEIMPEL; COLLIER, 1996; PRÜTZ *et al.*, 2004). *howardi* parasitando larvas, pupas e adultos de diversas ordens de insetos, como Coleoptera e Lepidoptera (LA SALLE; POLASZEK, 2007; VARGAS *et al.*, 2011; SANQIANG *et al.*, 2021).

Além disso, por causa do tamanho diminuto, podem ocorrer em laboratórios a confusão entre espécies e linhagens (FAVORETO *et al.*, 2020; PÉREZ-BENAVIDES *et al.*, 2020), o que é considerado contaminação da criação (SILVA *et al.*, 2021; NOYES, 2022), pois prejudica o suprimento das exigências específicas. Por isso, utilizar a taxonomia integrativa, que considera tanto o DNA barcoding quanto às combinações de características morfológicas dos indivíduos permite distinguir mais eficientemente as espécies de interesse (FAVORETO *et al.*, 2020; NOYES, 2022).

Além disso, para as espécies de parasitoide consideradas generalistas, o hospedeiro pode afetar significativamente a aptidão da população (GHIMIRE; PHILLIPS, 2014). Pois a alimentação das larvas dos parasitoides é influenciada através da espécie, idade, qualidade e disponibilidade do hospedeiro (HEIMPEL; COLLIER, 1996). Em geral, a qualidade da multiplicação de parasitoides pode ser verificada através de parâmetros biológicos como o parasitismo, emergência e razão sexual, e/ou morfológicos como mensurações da tíbia posterior e/ou asa anterior dos adultos (PREZOTTI *et al.*, 2004; VACARI *et al.*, 2012; SMANIOTTO, 2016; SILVA *et al.*, 2021), consideradas variáveis confiáveis de tamanho, pois permanecem com o comprimento integral mesmo após a morte e armazenamento dos indivíduos (LA SALLE; POLASZEK, 2007). Para a reprodução e liberação de *T. howardi* como parasitoide no mercado de controle biológico brasileiro é essencial conhecer os possíveis efeitos do processo de multiplicação massal de *T. howardi* em laboratório, e considerar as adaptações de

aprendizagem do parasitoide, efeitos na biologia e morfologia a longo prazo através do condicionamento sobre pupas de *T. molitor* em condições laboratoriais (QUEIROZ *et al.*, 2017; REYNOLDS, 2017; DONELSON *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021; JUNIOR *et al.*, 2022).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MULTIPLICAÇÃO DE *T. howardi*

A população de *T. howardi* foi cedida pelo Laboratório de Controle Biológico de Insetos – LECOBIOLOG da Universidade Federal de Grande Dourados – UFGD, onde fora mantida desde 2009 sobre pupas de *D. saccharalis*. Os adultos de *T. howardi* foram mantidos em tubos de vidro (8,5 cm de comprimento x 2,5 cm de diâmetro) vedados com plástico filme e alimentados com gotículas de mel puro. Para a multiplicação do parasitoide, 10 fêmeas previamente acasaladas do parasitoide foram coletadas através da inversão do tubo em que emergiram e um novo tubo limpo foi posicionado em cima delas, foi permitido subirem fêmeas até termos todas as 10. As fêmeas foram mantidas em tubos similares a mencionado anteriormente contendo pupas de *T. molitor* de até 48h de idade por um período de 48h para permitir o parasitismo. O sexo dos adultos de *T. howardi* geralmente é determinado de acordo com características morfológicas da antena e é possível observar a olho nu, as fêmeas apresentam funículo com três segmentos das antenas pigmentados e nos machos, o funículo é formado por quatro segmentos e apenas a clava é pigmentada (LA SALLE; POLASZEK, 2007).

2.2 MULTIPLICAÇÃO DO HOSPEDEIRO ALTERNATIVO DE *T. howardi*

As pupas de *T. molitor* utilizadas neste experimento foram provenientes da criação estabelecida no Núcleo de Desenvolvimento em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças - NUDEMAFI, no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES CCAE.

A criação de *T. molitor* foi mantida à 25 ± 2 °C, umidade relativa do ar de 60% e fotofase de 12 horas. Tanto os adultos quanto as larvas foram mantidos em recipientes plásticos tipo PVC alimentados com dieta adaptada à base de farinha e flocos de milho conforme Zamperline *et al.*, 1992. A dieta foi peneirada em graduações distintas a cada 15 dias para separação das larvas e recolhimento das pupas. As pupas então foram recolhidas para experimentos e/ou manutenção em laboratório.

2.3 CONDICIONAMENTO DAS GERAÇÕES DE *T. howardi*

As pupas foram acondicionadas individualmente com 10 fêmeas de *T. howardi* em tubos de vidro (8,5 cm de comprimento x 2,5 cm de diâmetro) vedados com plástico filme e como fonte alimentar para o parasitoide foram adicionadas gotículas de mel puro nas laterais do tubo. Foram analisadas as gerações de *T. howardi* até a nona geração (F1, F3, F5, F7 e F9). Os aspectos biológicos avaliados foram: a porcentagem de pupas parasitadas; [(número de pupas com emergência de parasitoides + pupas sem emergência de adultos) / (número total de pupas) × 100]; porcentagem de pupas com emergência de parasitoides [(número de pupas com emergência de adultos dos parasitoides) / (número de pupas parasitadas) × 100]; número de filhos (número de parasitoides emergidos por pupa); duração do ciclo de vida (ovo - adulto) (dias); e razão sexual (RS= número de fêmeas / número de adultos) de *T. howardi*. O sexo dos adultos de *T. howardi* geralmente é determinado de acordo com características morfológicas da antena, sendo que as fêmeas apresentam funículo com três segmentos das antenas pigmentados e nos machos, o funículo é formado por quatro segmentos e apenas a clava é pigmentada (LA SALLE; POLASZEK, 2007). O parasitismo é possível ser observado através do enrijecimento e escurecimento da pupa, quando colocada em um foco de luz é possível observar as larvas do parasitoide através do tegumento do hospedeiro (Figura 1). Para coleta dos dados biológicos, foram analisadas 25 pupas, sendo 25 repetições em cada geração, totalizando 125 pupas analisadas. Os aspectos morfológicos observados foram o comprimento da tíbia posterior e o comprimento da asa anterior, pois são caracteres morfológicos não tão suscetíveis à interferência de montagem de lâminas ou ressecamento/expansão do tegumento. Para análise das medidas morfológicas foram considerados 13 repetições, que consistiram em 13 indivíduos ao acaso em cada geração, totalizando 65 indivíduos provenientes de pupas de *T. molitor*. Para evitar o ressecamento causado pela morte natural, os adultos foram conservados em tubos contendo álcool 70%.



Figura 1. Pupa de *Tenebrio molitor* parasitada por *Tetrastichus howardi*.

2.4 PREPARO DOS ESPÉCIMES DE *T. HOWARDI* PARA MENSURAÇÕES

Para visualização das estruturas, os espécimes foram clarificados com hidróxido de potássio (KOH) 10% por 12 horas e montados utilizando Líquido de Hoyer. As asas de cada indivíduo foram estendidas para mensurar desde a base da veia submarginal até a margem distal, as tíbias foram mensuradas desde a junção da tíbia com o fêmur até a junção da tíbia com o tarso (Figura 2) (SOUZA *et al.*, 2018). A aquisição das imagens e mensurações foram realizadas através do estereomicroscópio Leica DM 750 com sistema fotográfico ICC50E, com o software Las Ez versão 3.2.0.

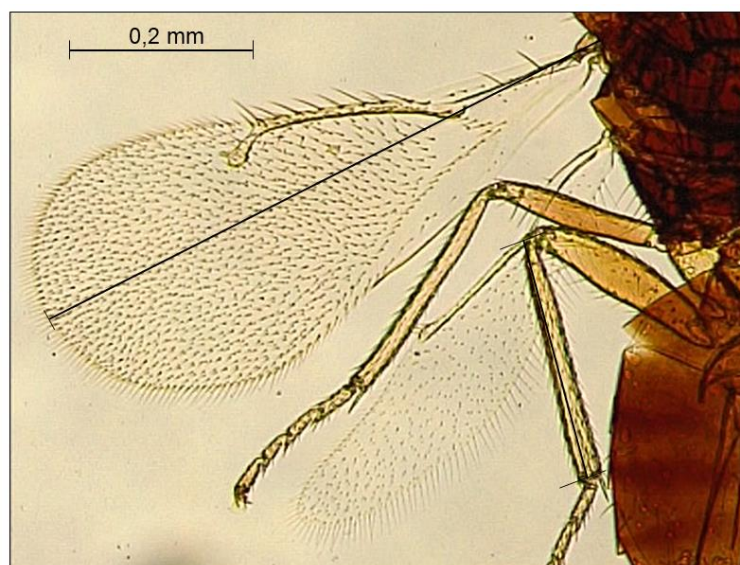


Figura 2. Mensuração da asa e tíbia posterior das fêmeas de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae).

2.4.1 Metabólitos observados em *T. howardi* proveniente de pupas de *T. molitor*

2.4.1.1 Amostragem de *T. howardi* para o perfil metabólico

Para a obtenção do perfil metabólico, uma população de *T. howardi*, foi coletada, composta por indivíduos provenientes de pupas de *T. molitor* imediatamente após a emergência, sem qualquer tipo de alimentação.

Para sacrificar os organismos e pausar os processos metabólicos, bem como impedir a degradação metabólica iniciada imediatamente à morte dos indivíduos, as amostras de *T. howardi* foram acondicionadas em microtubos tipo eppendorf de 2 mL, e inseridas em garrafa térmica contendo nitrogênio líquido. As amostras foram compostas por indivíduos de cada geração de *T. howardi* proveniente respectivamente de pupas de *T. molitor*.

2.2.4.2 Extração dos metabólitos de *T. howardi*

A extração de metabólitos de *T. howardi* foi adaptada do protocolo de Lisec *et al.* (2006). Cerca de 200 mg das amostras previamente coletadas e armazenadas em refrigerador à -80 °C foram maceradas na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um fino pó, e então transferidas para microtubos do tipo eppendorf de 2 mL contendo 1400 µL de metanol 99,9% (pré-resfriado a -20 °C) e 60 µL de solução ribitol à 0,2 mg mL⁻¹. Posteriormente, a mistura foi incubada em um termo agitador a 1000 rpm a 70 °C por 10 min e, em seguida, centrifugada a 11000 g por 10 min.

Foram transferidos aproximadamente 600 µL do sobrenadante para um novo micro tubo e adicionados 375 µL de clorofórmio (pré- resfriado a -20 °C) e 750 µL de água destilada (dH₂O, 4 °C) e agitados por 10 s. A solução foi novamente centrifugada a 2200 g por 10 min para a separação das fases. Em seguida, foram transferidos 200 µL da fase superior (fase polar) para um micro tubo de 1,5 mL. As amostras foram secas em um concentrador à vácuo e novamente armazenadas em refrigerador à -80 °C até a etapa de derivatização.

2.2.4.3 Derivatização dos metabólitos de *T. howardi*

Para o processo de derivatização, as amostras seguiram para um concentrador à vácuo a 30 °C por 30 min. Já na etapa de derivatização, foram adicionados 40 µL da solução de cloridrato de metoxiamina (20 mg mL⁻¹ em piridina) à cada amostra, seguido de agitação a 900 rpm por 2 h a 37 °C em termo agitador. Posteriormente, foram adicionados em cada amostra 70 µL de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) mais 8 µL do padrão de tempo de retenção (mistura 0,029% (v/v) dos alcanos: n-dodecano, n-pentadecano, n-nonadecano, n-docosano, n-octacosano, n-dotracontano e n-hexatriacontano dissolvidos em piridina) e foram incubadas em termo agitador a 900 rpm a 37 °C por 30 min. Dessa solução, 100 µL foram transferidos para *vials* de vidro com *insert* de 250 µL e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Além disso, para servir como controle, foi realizada a reação de derivatização em um micro tubo vazio.

2.2.4.4 Parâmetros de análise e processamento de dados por GC-MS

A abordagem de pré-processamento de GC-MS é baseada na detecção de pico de deconvolução de espectros de massa (referente ao processamento do sinal gerado, imagem) (BRACEWELL, 2000), alinhamento do tempo de retenção em diferentes amostras e a

normalização, com objetivo de remover a variação dos dados (CUADROS-INOSTROZA *et al.*, 2009).

Cada amostra foi analisada em um cromatógrafo gasoso acoplado à um espectrômetro de massas, modelo GCMS-*QP2010 SE* (Shimadzu, Quioto - Japão). O instrumento é equipado com um amostrador automático, modelo AOC-20s (Shimadzu, Quioto - Japão). Foi utilizada a coluna cromatográfica DB-35MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm , J & W Scientific, Folsom, CA, EUA). Foi injetado 1 μl de amostra em modo *split* de razão 1:25 utilizando hélio como gás carreador com 2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de fluxo constante. Foi utilizada uma rampa de aquecimento do forno, com início em 80 $^{\circ}\text{C}$ por 2 min, e acrescentando 15 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até atingir 330 $^{\circ}\text{C}$, quando foi mantido por 6 min. Foi utilizado o modo de ionização de elétrons (EI) em 70 eV, com taxa de aquisição de 20 varreduras $\cdot\text{s}^{-1}$, com intervalo de varredura de massa entre 70 m/z à 600 m/z dos compostos. A temperatura do injetor e da linha de transferência foram fixadas em 230 $^{\circ}\text{C}$ e 250 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

Para essa análise, foi utilizado o software livre R e o pacote R Target Search (CUADROS-INOSTROZA *et al.*, 2009). Foi então fornecido o arquivo de definição de amostra para processar, e uma biblioteca de referência contendo as informações do metabólito a ser buscado. Sete alcanos foram usados como compostos de padrão interno para fazer correções de RI, e o RT dos marcadores padrão foi convertido em RI usando interpolação linear (VAN DEN DOOL; DEC. KRATZ, 1963). As intensidades das massas selecionadas foram normalizadas para a mediana das triplicatas e então utilizadas para extrair outras massas com perfis de ápice correlacionados. O RI médio foi considerado para representar a posição exata onde o metabólito elui na respectiva amostra.

A biblioteca de metabólitos utilizada pode ser encontrada no material suplementar de número 5 da publicação TargetSearch, através do endereço eletrônico do trabalho realizado por Cuadros-Inostroza *et al.* (2009). O procedimento de atualização de RI de três etapas foi realizado utilizando TargetSearch :: medianRILib, TargetSearch :: sampleRI e TargetSearch :: peakFind (CUADROS-INOSTROZA *et al.*, 2009).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para estimar os efeitos das sucessivas gerações sobre o mesmo hospedeiro nas características biológicas e morfológicas do parasitoide, utilizamos o Modelo Linear Generalizado Misto (GLMM), assumindo erros com distribuição de Poisson (MCCULLAGH; NELDER, 1989). Todas as análises foram realizadas no software livre R Core Team (2022),

através dos pacotes: lme4 e vgam. Apenas os metabólitos presentes, ou ausentes para metabólitos únicos, em todas das três repetições das amostras foram aceitos para análise de acumulação diferencial, para garantir a qualidade do processamento dos dados. Foram considerados os metabólitos diferencialmente acumulados com médias das repetições de forma diferente pelo teste t de Student (p-valor $<0,05$) e um Log2 de mudança de dobra $> 0,5849625$ para metabólitos up-acumulados e $<-0,5849625$ para metabólitos down-acumulados.

3 RESULTADOS

O tempo para obtenção das nove gerações de *T. howardi* em pupas de *T. molitor* foi de 5 meses. Foram observadas pupas mumificadas, o que demonstra o parasitismo, mas sem o desenvolvimento completo dos parasitoides (Figura 3).



Figura 3. Pupas de *Tenebrio molitor* mumificadas através do parasitismo por *Tetrastichus howardi*.

O parasitismo e a emergência não foram afetados pelas gerações de *T. howardi* sobre pupas de *T. molitor* coef= 0,01453, P = 0,453. No entanto, o número de parasitoides emergidos decresceu ao longo das sucessivas gerações. E embora a duração do ciclo (ovo - adulto) de *T. howardi* tenha aumentado, a razão sexual foi mantida superior a 70% (Figura 4). Já o comprimento da tíbia posterior e da asa anterior das fêmeas de *T. howardi* diminuiu significativamente através das gerações com $\bar{x} = 0,328$, erro padrão = 0,00774 e $\bar{x} = 0,736$, erro padrão = 0,0134, respectivamente (Figura 5).

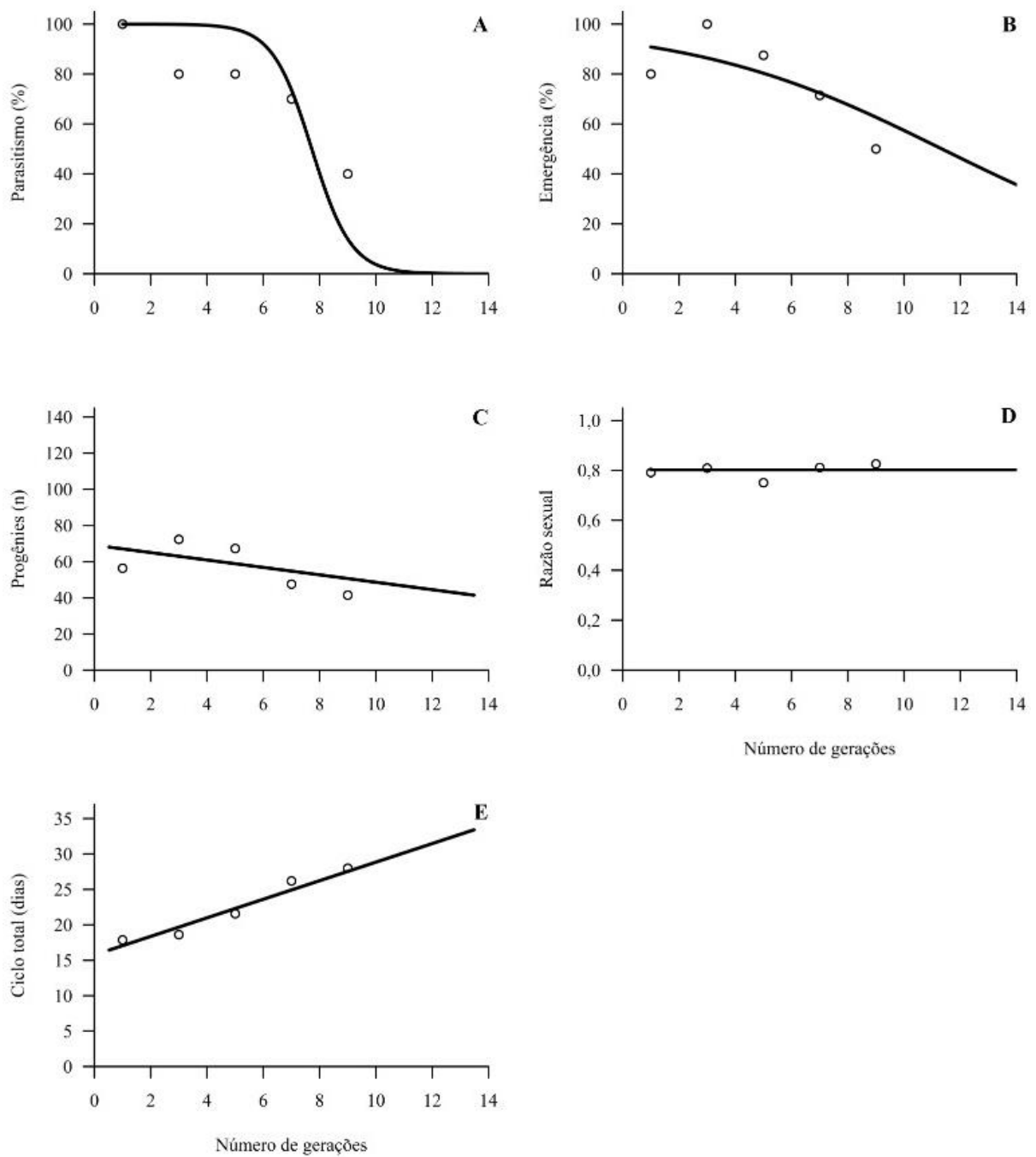


Figura 4. Resultados observados de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae): A) Porcentagem de parasitismo; B) Emergência; C) Progênie (número de descendentes); D) Razão sexual; e E) Ciclo total em dias (ovo-adulto). Os círculos representam os valores observados em cada geração, a linha contínua é a tendência observada no experimento.

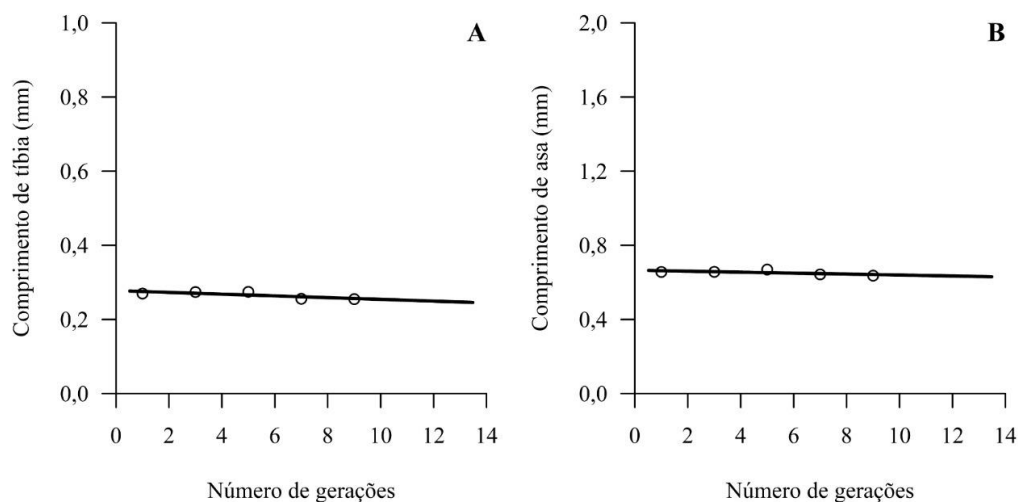


Figura 5. Resultados observados de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae): A) Comprimento da tibia posterior (mm) e B) Comprimento da asa anterior (mm). Os círculos representam os valores observados em cada geração, a linha contínua é a tendência observada no experimento.

Tabela 2 Metabólitos detectados em *T. howardi* provenientes de pupas de *T. molitor*.

Ácido tartrônico 2-(metilaminometil) - (2TMS)	Ácido benzoico, 3-hidroxi- (2TMS)
Asparagina	Ácido nicotínico, 6-hidroxi- (2TMS)
Naphthaleno, 1,8-etileno-	Ácido láctico, 3-fenil (2TMS)
Ácido fosfonoacético (3TMS)	Ácido antranílico (2TMS)
Ácido piroglutâmico (2TMS)	Arabinose (4TMS)
Ácido fenilpiruvico (1TMS)	Fenilalanina (2TMS)
Ácido perillico (1TMS)	Ácido tartárico (4TMS)
Imidazol-4-ácido acético, 1-metil- (1TMS)	Lixose (1MEOX) (4TMS) BP
Psicose (1MEOX) (5TMS) MP	Cadaverina (4TMS)
Sorbose (1MEOX) (5TMS) BP	Ácido Levulinico, 5-amino- (1MEOX) (3TMS) BP
Sedoheptulose, 2,7-anidro-, beta- (4TMS)	Ácido Iminodiacético, N-(2-hidroxi-etil)- (3TMS)
Serina, O-phospho- (4TMS)	Ácido jasmônico metil ester, 2-trans- (1MEOX)
Ácido Etanosulfônico, 2-mercapto- (2TMS)	Pantenol (3TMS)
Homoserina (4TMS)	Mannitol (6TMS)
Mannosamina, N-acetil- (4TMS)	Idose (1MEOX) (5TMS) MP
Tiramina, 3-methoxi- (3TMS)	Mannose (1MEOX) (5TMS) MP
Ácido Tetradecanoico, 3-hidroxi- (2TMS)	Frutose (1MEOX) (5TMS) MP
Glicil-prolina (3TMS)	Tagatose (5TMS)
Norbornano	Ácido Dehidroascorbico (2MEOX) MP
Ácido maleâmico (2 TMS)	Cisteína, N-acetil- (3TMS)
Ácido adípico 2-amino- (3 TMS)	Xilitol (5TMS)
Ácido barbitúrico (3TMS)	Ácido Hexanodioico, hidroxi- (3TMS)

4 DISCUSSÃO

O parasitismo e emergência de *T. howardi* decresceram nas sucessivas gerações sobre pupas de *T. molitor*. As gerações F1, F3 e F5 tiveram mais de 90% de emergência, no entanto, as gerações F7 e F9 decresceram acentuadamente. A emergência pode ser afetada principalmente em populações em que as larvas não receberam nutrientes de maneira a satisfazer os requisitos ecofisiológicos. Pois, para aumentar a expectativa de vida e encontrar alimentos, as fêmeas tendem a reabsorverem os próprios ovos como forma de obter energia (BRACKEN, 1965; JERVIS; KIDD, 1986; HEIMPEL *et al.*, 1997). Hopkinson *et al.* (2013) observaram que os ovários das fêmeas mal alimentadas durante a fase larval tendem a deteriorar e diminuir de 100 para menos de 70 ovos, o que prejudica o parasitismo, emergência e número de descendente do parasitoide.

Ao observamos a mumificação de pupas de *T. molitor* podemos considerar que o parasitoide obteve sucesso em parasitar a pupa, porém não resultou na emergência de adultos de *T. howardi*. Hospedeiros podem causar a morte da descendência de parasitoides através da defesa como nos processos de encapsulamento e melanização do organismo invasor (BRASHAW; HOLZAPFEL, 2001; POMFRET; KNELL, 2006; LACOUR *et al.*, 2014).

O número de descendentes de *T. howardi* decresceu significativamente principalmente nas gerações F7 e F9, chegando a quase 20 indivíduos por pupa.

O número de gerações de *T. howardi* aumentou o tempo de desenvolvimento (ovo - adulto) do parasitoide. Dorn e Beckage (2007) observaram que parasitoides gregários tendem a aumentar o tempo de desenvolvimento considerando o número de larvas para satisfação nutritiva.

Ao longo das sucessivas gerações o tempo de desenvolvimento tendeu a aumentar, observamos valores desde 17 dias a até 24 dias em algumas amostras das últimas gerações de *T. howardi* advindo de pupas de *T. molitor*.

A razão sexual diminuiu, porém, foi mantida acima de 60%, o que é relatado como valor favorável para criações de parasitoide (BARBOSA *et al.*, 2015; TIAGO *et al.*, 2019), pois favorece a liberação de fêmeas em campo, que são as responsáveis pelo controle biológico (QUEIROZ *et al.*, 2017; TIAGO *et al.*, 2019). Além disso, é possível recuperar *T. howardi* sucessivamente reproduzido sobre pupas de *T. molitor* já na primeira geração em outro hospedeiro como *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), o que é

vantajoso para sistemas aumentativos e em liberação de parasitoides em campo, uma vez que as primeiras gerações mantêm altas as taxas de parasitismo, emergência e razão sexual. Em proles menores, ou seja, com menor número de descendentes a tendência é diminuir também a razão sexual (NURKOMAR; AZHAR; BUCHORI, 2021). O que corrobora os dados observados ao longo das gerações observadas neste trabalho. As fêmeas propositalmente depositam menos ovos em hospedeiros de qualidade inferior e geralmente são ovos que tendem a desenvolver a prole majoritariamente masculina (JOYCE *et al.*, 2002; MURDOCH; BRIGGS; NISBET, 2003; LI *et al.*, 2017).

Reproduzir parasitoides sucessivamente sobre hospedeiros alternativos pode gerar custos de aptidão significativos para a prole, causados por deficiências herdadas e/ou carências nutritivas (ULLER; NAKAGAWA; ENGLISH, 2013; TOUGERON *et al.*, 2018; TOUGERON *et al.*, 2020). As condições ambientais podem não ter atingido os níveis necessários para permitir o sucesso adaptativo para o desenvolvimento satisfatório da população de *T. howardi* em pupas de *T. molitor* (TOUGERON *et al.*, 2017; TOUGERON, 2019). A previsão de efeitos dos insetos referentes às mudanças ambientais de curto e longo prazo implica, portanto, na compreensão dos efeitos maternos e herdáveis, em particular nas características relacionadas à aptidão e nos fenótipos que são dependentes da variabilidade da população (BRODEUR; MCNEIL, 1989; BRADSHAW *et al.*, 1997; LACOUR *et al.*, 2014; GARIEPY *et al.*, 2015; TOUGERON *et al.*, 2020).

As gerações sucessivas não tiveram efeito sobre a variação do comprimento da tibia posterior e da asa anterior de *T. howardi*. O tamanho do corpo do parasitoide, geralmente é reflexo da existência de reservatórios energéticos desde a fase larval (OLSON; ANDOW, 1998; BEZEMER *et al.*, 2005). Rivers e Denlinger (1994) relataram efeito positivo do tamanho do corpo do hospedeiro sobre o corpo de *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). É, portanto, importante perceber a contribuição dos hospedeiros para a variação entre os indivíduos.

É possível manter *T. howardi* sobre pupas de *T. molitor* até a 5ª geração, a partir da qual há a da necessidade de revigoração da população em laboratório, que pode ser realizada através da oferta de pupas de *S. frugiperda*. Os valores satisfatórios observados nas primeiras gerações das populações de *T. howardi* permitem a segurança de usar as pupas do besouro-da-farinha para aumentos significativos na população de laboratório e em liberações em campo, sem risco de introdução de espécie-praga.

A criação de *T. howardi* em pupas de *T. molitor* por 9 gerações sucessivas afetou o parasitismo, emergência, número de descendentes, o tempo de desenvolvimento e a razão

sexual, a partir da 5^a geração do parasitoide, o que nos permite desencorajar a multiplicação de *T. howardi* além da 5^a geração em pupas de *T. molitor*.

5 CONCLUSÃO

Nossas observações neste trabalho servem de base para a compreensão da variação nas populações de *T. howardi* multiplicados em laboratório. Os resultados de *T. howardi* em *T. molitor*, permitem sugerir que, ao perder a capacidade reprodutiva em poucas gerações, as pupas de *T. molitor* não devem continuar a serem ofertadas para o parasitismo de *T. howardi* em laboratório a partir da 5ª geração.

6 REFERÊNCIAS

- BARBOSA, R.H. *et al.* Parasitismo e aspectos biológicos de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae). **Ciência Rural**, v. 45, n. 2, 2015.
- BEZEMER, T.M. *et al.* Influence of adult nutrition on the relationship between body size and reproductive parameters in a parasitoid wasp. **Ecology Entomology**, v. 30, p. 571-580. 2005.
- BUENO, A.F. *et al.* Pesticide selectivity to natural enemies: challenges and constraints for research and field recommendation. **Ciência Rural**, v. 47, n. 6, p. 1-10. 2017.
- BRACKEN G.K. Effects of dietary components on fecundity of the parasitoid *Exeristes comstockii* (Cress.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). **The Canadian Entomologist**, v. 97, p. 1037-1041. 1965.
- BRADSHAW, W.E.; HOLZAPFEL, C.M. Genetic shift in photoperiodic response correlated with global warming. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 14509-14511. 2001.
- BRODEUR, J.; MCNEIL, J.N. Biotic and abiotic factors involved in diapause induction of the parasitoid, *Aphidius nigripes* (Hymenoptera: Aphidiidae) **Journal of Insect Physiology**, v. 35, p. 969-974. 1989.
- CARVALHO, F.P. Pesticides, environment and food safety. **Food and Energy Security**, v. 6, p. 48-60. 2017.
- DONELSON, J.M.; SALINAS, S.; MUNDAY, P.L.; SHAMA, L.N.S. Transgenerational plasticity and climate change experiments: where do we go from here? **Global change biology**, v. 24, p. 13-34. 2018.
- DORN, S.; BECKAGE, N.E. Superparasitism in gregarious hymenopteran parasitoids: ecological, behavioural and physiological perspectives. **Physiological entomology**, v. 32, n. 3, p. 199-211. 2007.
- FAVORETO, A.L. *et al.* *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae): First report of parasitismo in *Oxydia vesulia* (Lepidoptera: Geometridae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 1, p. 1-5. 2020.
- GARIEPY, V. *et al.* Why two species of parasitoids showed promise in the laboratory but failed to control the soybean aphid under field conditions. **Biology Control**, v. 80, p. 1-7. 2015.
- GHIMIRE, M.N; PHILLIPS, T.W. Oviposition and reproductive performance of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) on six diferente pyralid host species. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 107, p. 809-817. 2014.

- HEIMPEL G.E. *et al.* Adult feeding and lifetime reproductive success in the parasitoid *Aphytis melinus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 83, p. 305-315. 1997.
- HEIMPEL, G.E. COLLIER. Adult feeding and lifetime reproductive success in the parasitoid *Aphytis melinus*. **Entomologia Experiment & Applied**, v. 83, p. 305-315. 1996.
- HOPKINSON, J.E. *et al.* Honeydew as a source of nutrition for *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae): effect of adult diet on lifespan and egg load. **Australian Journal of Entomology**, v. 52, p. 14-19. 2013.
- JERVIS, M.A.; KIDD, N.A.C. Host-feeding strategies in hymenopteran parasitoids. **Biological Reviews**, v. 61, p. 395-434. 1986.
- JOYCE, A *et al.* The effect of host size on the sex ratio of *Syngaster lepidus*, a parasitoid of Eucalyptus longhorned borers (*Phoracantha* spp.). **Biology Control**, v. 24, p. 207–213. 2002.
- JUNIOR, L.M.A. *et al.* Transferibilidade de marcadores microssatélites para *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 21, p. 66-70. 2022.
- LA SALLE, J.; POLASZEK, A. Afrotropical species of the *Tetrastichus howardi* species group (Hymenoptera: Eulophidae). **African Entomology**, v. 15, p. 45-56. 2007.
- LACOUR, G. *et al.* When mothers anticipate: effects of the prediapause stage on embryo development time and of maternal photoperiod on eggs of a temperate and a tropical strains of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 71, p. 87-96. 2014.
- LI, X.; ZHU, L.; MENG, L.; LI, B. Brood size and sex ratio in response to host quality and wasp traits in the gregarious parasitoid *Oomyzus sokolowskii* (Hymenoptera: Eulophidae). **PeerJ**, v. 5, e2919. 2017.
- MCCULLAGH, P.; NELDER, J.A. **Generalized Linear Models**. 2nd Edition, Chapman and Hall, London. 1989.
- MURDOCH, W.; BRIGGS, C.; NISBET, R. **Consumer-resource dynamics**. Princeton, New Jersey, USA: Princeton University Press; 2003.
- NOYES, J.S. **Universal Chalcidoidea Database**. World Wide Web electronic publication. Disponível em: <http://www.nhm.ac.uk/chalcidoids> Acessado em: mar., 2022.
- NURKOMAR, I.; AZHAR, A.; BUCHORI, D. Sex allocation and field population sex ratio of *Apanteles taragamae* Viereck (Hymenoptera: Braconidae), a larval parasitoid of the cucumber moth *Diaphania indica* Saunders (Lepidoptera: Crambidae). **Open Agriculture**, v. 6. 2021. doi.org/10.1515/opag-2021-0045
- OLSON, D.M.; ANDOW, D.A. Larval crowding and adult nutrition effects on longevity and fecundity off emale *Trichogramma nubilale* Ertle and Davis (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Environmental Entomology**, v. 27, p. 508-514. 1998.

- PARRA, J.R.P.; JUNIOR, A.C. Applied biological control in Brazil: From laboratory assays to field application. **Journal Insect Science**, v. 19, n. 2. 2019.
- PÉREZ-BENAVIDES, A.L. Integrative taxonomy to assess the species richness of chalcidoid parasitoids (Hymenoptera) associated to Bruchinae (Coleoptera: Chrysomelidae) from Mexico. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 91. 2020. e913492
- POMFRET J.C.; KNELL, R.J. Immunity and the expression of a secondary sexual trait in a horned beetle. **Behavioral Ecology**, v. 17, p. 466-472. 2006.
- PREZOTTI, L. *et al.* Effect of the size of the founder population on the quality of sexual populations of *Trichogramma pretiosum*, in laboratory. **Biological Control**, v. 30, n. 2, p. 174-180. 2004.
- PRÜTZ, G. Transgenic insect-resistant corn affects the fourth trophic level: Effects of *Bacillus thuringiensis* – corn on the facultative hyperparasitoid *Tetrastichus howardi*. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 9, p. 451-454. 2004.
- QUEIROZ, A.P.; BUENO, A.F.; POMARI-FERNANDES, A.; BORTOLOTTI, O.C.; MIKAMI, A.Y.; OLIVE, E.L. Influence of host preference, mating, and release density on the parasitism of *Telenomus remus* (Nixon) (Hymenoptera, Platygasteridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 61, p. 86-90. 2017.
- REYNOLDS, J.A. Epigenetic influences on diapause. **Advances in Insect Physiology**, v. 53, p. 115-144. 2017.
- RIVERS, D.B.; DENLINGER, D.L. Redirection of metabolism in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*, following envenomation by the ectoparasitoid *Nasonia vitripennis* and correlation of metabolic effects with the diapause status of the host. **Journal Insect Physiological**, v. 40, p. 207–215. 1994.
- SANQUIANG, Y. *et al.* Effects of temperature and supplementary food on the development and fecundity of the Eulophida parasitoid *Tetrastichus howardi* on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal Pest Management**, doi: doi.org/10.1080/09670874.2021.1968535. 2021.
- SILVA, R.B. *et al.* Behavioral aspects of the parasite *Cotesia flavipes* produced in a laboratory on the North coast of Paraíba. **Research Development**, v. 10, n. 2, e46910212666. 2021.
- SMANIOTTO, G. **Variabilidade de parâmetros biológicos e genéticos de *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) no Brasil**. Embrapa Clima Temperado. Dissertação. 2016.
- SOUZA, D. *et al.* Morphometry, allometry, and fluctuating asymmetry of egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* under insecticide influence. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 166, n. 4, p. 298-303. 2018.

TIAGO, E.F. Biological quality of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) reared with *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pupae after cold storage. **Florida Entomology**, v. 102, n. 3, p. 571-576. 2019.

TIAGO, E.F. *et al.* Biological quality of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) reared with *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pupae after cold storage. **Florida Entomologist**, v. 102, n. 3, p. 571-576. 2019.

TOUGERON, K. *et al.* Intraspecific maternal competition induces summer diapause in insect parasitoids. **Insect Science**, v. 25, p. 1080-1088. 2017.

TOUGERON, K. *et al.* Disentangling plasticity from local adaptation in diapause expression in parasitoid wasps from contrasting thermal environments: a reciprocal translocation experiment. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 124, p. 756-764. 2018.

TOUGERON, K. Diapause research in insects: historical review and recent work perspectives. *Entomologia Experimentalis et applicata*, v. 167, p. 27-36. 2019.

TOUGERON, K. *et al.* How climate change affects the seasonal ecology of insect parasitoids. **Ecological Entomology**, v. 45, n. 2, p. 167-181. 2020.

ULLER, T.; NAKAGAWA, S.; ENGLISH, S. Weak evidence for anticipatory parental effects in plants and animals. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 26, p. 2161-2170. 2013.

VACARI, A.M.; GENOVEZ, G.S.; LAURENTIS, V.L.; BORTOLI, S.A. Fonte proteica na criação de *Diatraea saccharalis* e seu reflexo na produção e noncontrole de qualidade de *Cotesia flavipes*. **Bragantia**, v. 71, p. 355-361. 2012.

VAN LENTEREN, J.C. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl**, v. 57, p. 1-27. 2012.

VAN LENTEREN, J.C.; BOLCKMANS, K.; KOHL, J.; RAVENSBERG, W.J. URBANEJA, A. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**, v. 62, p. 1-25. 2018.

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**, v. 26, p. 143-146, 2011.

ZAMPERLINI, B. *et al.* Influência da alimentação de *Tenebrio molitor* L. 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) no desenvolvimento ninfal de *Podisus connexivus* Bergroth, 1891 (Hemiptera: Pentatomidae). **Revista Árvore**, v. 16, p. 224-203, 1992.

CONCLUSÃO GERAL

Tanto *S. frugiperda* quanto *T. molitor* são bons hospedeiros para *T. howardi*. As pupas de *S. frugiperda* podem ser utilizadas como hospedeiro alternativo por sucessivas gerações, sem perdas significativas na qualidade dos descendentes do parasitoide.

No entanto, as pupas de *T. molitor* não devem ser usadas por mais de 3 gerações sucessivas sem revigoramento dos parasitoides em outra espécie hospedeira, por haver perdas significativas na qualidade da descendência do parasitoide, ao longo de gerações sucessivas. As pupas de *T. molitor* podem ser usadas para liberações em campo e aumento de criações comerciais, com sucesso na qualidade dos parasitoides provenientes das três primeiras gerações.

APÊNDICE A

Tabela 1. Determinação de proteína bruta através do método Semimicro Kjeldahl de pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (TM) secas à 55 °C por 24h em estufa de circulação forçada de ar. Fator para análise = 1,02.

Amostra	ASA - Tara (g)	Ácido clorídrico (mL)			Proteína ASA (g)	Proteína MS (%)	Teor de MS (%)	FDN (%)
		Vol. total	Branco	Vol. real				
TM1	0,5204	16,1	0,4	15,7	0,0364	29,92 a	23,42 a	64,36 a
TM2	0,4509	26,1	0,4	25,7	0,0682	50,87 a	29,74 a	60,07 a
TM3	0,4807	28,0	0,4	27,6	0,0654	51,24 a	26,58 a	55,12 a

ASA: Amostra Seca ao Ar (55 °C); MS: Matéria Seca; FDS: Fibra em Detergente Neutro; Valores entre linhas com letras iguais, não diferem no teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Determinação de lipídios de pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (SF) e *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (TM) secas à 55 °C por 24h em estufa de circulação forçada de ar.

Amostra	Peso do saquinho (g)	Saquinho + amostra (g)	ASA (g)	Copo + lipídios depois da digestão	Teor de MS (%)	Lipídios (g)	Lipídios MS (%)	Lipídios no Material Natural (%)
TM1	0,4422	1,6244	1,1822	1,2694	23,42 a	0,355	30,03 a	7,03
TM2	0,4348	1,6675	1,2327	1,2921	29,74 a	0,3754	30,45 a	9,06

ASA: Amostra Seca ao Ar (55 °C); MS: Matéria Seca; FDS: Fibra em Detergente Neutro; Valores entre linhas com letras iguais, não diferem no teste Tukey a 5% de probabilidade.