

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Entomologia



Dissertação

Variabilidade de parâmetros biológicos e genéticos de *Cotesia flavipes*
(Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) no Brasil

Giovani Smaniotto

Pelotas, 2016

Giovani Smaniotto

Variabilidade de parâmetros biológicos e genéticos de *Cotesia flavipes*
(Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) no Brasil

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-
Graduação em Entomologia
do Instituto de Biologia da
Universidade Federal de
Pelotas, como requisito
parcial para a obtenção do
título de Mestre em Ciências
(área de conhecimento:
Entomologia).

Orientador: Dr. Dori Edson Nava

Co-orientadores: Dra. Ana Paula Schneid Afonso da Rosa

Dra. Gabriela Inés Diez-Rodríguez

Pelotas, 2016

Banca examinadora:

Dra. Ana Paula Schneid Afonso da Rosa (Co-orientadora)

Dra. Adrise Medeiros Nunes

Dr. Sérgio Delmar dos Anjos e Silva

Dr. Daniel Bernardi

**Dedico este trabalho a meus pais Idianila e Idir,
meu irmão Gian e a minha namorada Daiane**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde e força para completar mais este desafio em minha vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Entomologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade da realização do curso de Mestrado.

À Petrobras através do Projeto SISCANA-RS pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Dori Edson Nava pela orientação, auxílio e amizade durante os 24 meses de trabalho.

À Dra. Ana Paula Schneid Afonso e à Dra. Gabriela Inés Diez-Rodríguez pela co-orientação, colaboração e apoio.

Aos professores e pesquisadores colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela atenção e ensinamentos.

À Embrapa Clima Temperado pela permissão para a utilização de suas instalações (Laboratório de Entomologia) para realização deste trabalho.

Ao Dr. Daniel Bernardi pela ajuda nas análises estatísticas do trabalho.

À Dr. Roberta Manica Berto pela ajuda e empenho na realização do trabalho.

À professora Laila Herta Mihsfeldt da Universidade Estadual Norte do Paraná, Campus "Luiz Meneghel" - Bandeirantes, PR; Ao professor Reginaldo Barros da Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife, PE; Ao pesquisador Elio Cesar Guzzo da Embrapa Tabuleiros Costeiros - Rio Largo, AL; A Roberto Balbino de Mamanguape – PB; Ao Grupo Jolles Machado em especial a Gabriele Zanatta responsável pelo laboratório de Controle Biológico Jalles Machado de Goianésia, GO; À Biocontrol em especial ao representante comercial Leandro – Sertãozinho, SP, À Usina Santa Cruz de Américo Brasiliense - SP, em especial a Marcia Simonetti e Insetário de Pesquisa e Desenvolvimento Entomológico de Serra dos Aimorés, MG, por terem enviado material para estudo.

À minha família, em especial a minha mãe Idianila Salete Smaniotto, meu pai Idir Jose Smaniotto e meu irmão Gian Smaniotto pelo amor, carinho e apoio durante este período.

À minha namorada Daiane Paula Selevon pelo amor, carinho e compreensão durante este período.

Aos colegas e amigos do curso de Pós-Graduação em Entomologia, em especial aos colegas de turma Flavia do Sacramento, Franciele Casarin Maciel, Daiana Machado Medeiro, Robson Botta, Lauren Medina Barcelos, Manoel Daltro Nunes Garcia Junior, Helena Iris Leite e Paulino Ribeiro pela amizade e apoio.

Aos amigos de Pós-graduação Daniel Bernardi, Raul da Cunha Borges Filho, Rafael da Silva Gonçalves, Heitor Lisboa, Sandro Daniel Nörnberg, Vinicius Soares Sturza, Naymã Pinto Dias, Sabrina Ongarato, Sônia Poncio, Adrise Medeiros Nunes, Gabriela Inés Diez-Rodríguez e Fernanda Appel Müller, pelos bons momentos que passamos juntos e pelo auxílio sempre que necessário.

Aos bolsistas e estagiários do Laboratório de Entomologia da Embrapa Clima Temperado Tiago Scheunemann, Eduardo Valmorbida, Jose Cesar Lazzari, Felipe Andrezza, Karina Jobim, Cristiano Lima Cardoso, Suelen Gonçalves Rodrigues, Silvana Amaral e Ricardo Braun Marangon, pelos bons momentos que passamos.

Ao amigo e colega de Pós-graduação Raul da Cunha Borges Filho pelo auxílio e dedicação na realização deste trabalho.

Aos amigos Joanei Cechin, Andes Monge Vargas, Vinicius Zimmer e Anderson Bolzan pela amizade e companheirismo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

SMANIOTTO, Giovani. **Variabilidade de parâmetros biológicos e genéticos de *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) no Brasil.** Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

A cultura da cana-de-açúcar tem grande importância socioeconômica para o Brasil, uma vez que é fonte de matéria prima para a fabricação de açúcar e etanol. Dentre os principais problemas, destaca-se a ocorrência de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) que tem demandado medidas de controle, principalmente com o endoparasitoide *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae). Estima-se que a área de cana-de-açúcar tratada com liberação de *C. flavipes* seja de três milhões de hectares, mas há dúvidas sobre a sua eficiência. Estudos de variabilidade em populações de parasitoides são importantes, uma vez que quanto maior a variabilidade maior será a possibilidade de selecionar linhagens para serem utilizadas no manejo. Assim, a avaliação dos parâmetros biológicos de populações e o uso da biologia molecular poderão auxiliar na determinação da variabilidade das populações de parasitoides. O trabalho teve como objetivo conhecer a variabilidade de populações de *C. flavipes* em diferentes temperaturas, avaliando-se parâmetros biológicos e usando a técnica de reações em cadeia da polimerase (PCR). Para a avaliação dos parâmetros biológicos foram utilizadas cinco populações de *C. flavipes*, coletadas no Paraná (PR), Minas Gerais (MG), Alagoas (AL) e duas populações de São Paulo (SPI e SPII). As temperaturas utilizadas foram de 10, 15, 18, 20, 22, 25, 30 e 32°C, sendo a umidade relativa do ar de 70±10% e fotofase de 12 horas. Para avaliar a variabilidade com PCR, além das populações utilizadas para a determinação dos parâmetros biológicos foram acrescentadas as populações de Goiás (GO) Pernambuco (PE) da Paraíba (PB). Para tanto as amostras de *C. flavipes* foram preservadas em álcool 95% e mantidas a -20°C. O DNA genômico foi extraído do inseto segundo protocolo Dneasy Blood & Tissue (Qiagen, Valencia, CA, EUA). Os genes avaliados foram mt 16S rDNA e n28S rDNA. As análises de PCR foram realizadas em termociclador Eppendorf

Mastercycler Gradient. Determinou-se que a duração do período ovo-adulto foi inversamente proporcional à temperatura na faixa térmica de 18 a 30°C. Nas temperaturas de 10, 15 e 32°C não ocorreu desenvolvimento. A maior porcentagem de insetos emergidos ocorreu na faixa de temperatura de 25°C (valores) a 28°C, para todas as populações. Outro parâmetro que sofreu influência da temperatura foi a razão sexual. O limiar térmico inferior de desenvolvimento ou temperatura base (T_b) para o período ovo-adulto variou de 9,73 e 11,15°C, para as populações de SPII e MG, respectivamente, enquanto a constante térmica variou de 273,97 a 301,2 graus dias para as populações de SPII e MG, respectivamente. As oito populações que tiveram os genes avaliados formaram três grupos distintos. Por tanto, as populações de *C. flavipes* avaliadas apresentaram variabilidade nos parâmetros biológicos quando expostas a diferentes temperaturas, sendo comprovado também quando foi avaliado os genes das diferentes populações.

Palavras chave: Controle biológico, Temperatura, *Diatraea saccharalis*, PCR, DNA genômico.

Abstract

SMANIOTTO, Giovani. **Variability of populations *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) in Brazil: evaluation of biological parameters and genetic.** Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

The cultivation of sugarcane has great socioeconomic significance to Brazil, since it is a source of feedstock for the production of sugar and ethanol. Among the main problems, the occurrence of *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) stands out, which has required monitoring measures, particularly with endoparasitoid *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae). It is estimated that the sugarcane area treated with *C. flavipes* release is three million hectares, but doubts upon the efficiency of control have been raised. Variability studies in parasitoids population are important, since the higher the variability is, the higher the possibility of selecting parasitoids lineages adapted to adverse conditions. Thus, the evaluation of biological parameters of population and the use of molecular biology may assist in determining the variability of populations of parasitoids. The paper aimed to understand the variability of *C. flavipes* populations at different temperatures, evaluating biological parameters and using the polymerase chain reactions technique (PCR). For the evaluation of biological parameters were used five populations of *C. flavipes*, collected in Parana (PR), Minas Gerais (MG), Alagoas (AL) and two populations in São Paulo (SPI and SPII). The temperatures used were 10, 15, 18, 20, 22, 25, 30 and 32°C, and the relative humidity of $70 \pm 10\%$ and photophase of 12 hours. To assess variability in PCR, besides the populations used for the determination of biological parameters were appended populations of Goiás (GO) Pernambuco (PE) and Paraíba (PB). The samples of *C. flavipes* were preserved in 95% ethanol and kept at -20 ° C. Genomic DNA was extracted from the insect according to DNeasy Blood & Tissue protocol (Qiagen, Valencia, CA, USA). PCR analyzes

were performed in a thermo cycler Eppendorf Mastercycler Gradient. It was also provided that the length of egg-adult period duration was inversely proportional to the temperature in the range of 18 to 30 ° C. At temperatures of 10, 15 and 32°C no development occurred. The highest percentage of emerged insects occurred in the temperature range of 25 to 28°C, for all populations. The temperature also influenced the sex rate, showing that there may be differences between populations. The lower thermal threshold of development or threshold temperature (TT) to the egg-adult period ranged from 9.73 and 11,15°C for the populations of SPII and MG, respectively, while the thermal constant ranged from 273.97 to 301,2 degree days for the populations of SPII and MG, respectively. Therefore, evaluated populations of *C. flavipes* showed variability in biological parameters when exposed to different temperatures; it is also proven when it was rated the genes of different populations.

Key words: Biological control, temperature, *Diatraea saccharalis*, PCR, genomic DNA.

Sumário

1. Introdução Geral.....	14
Artigo 1. Variabilidade de populações de <i>Cotesia flavipes</i> (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) quando expostas a diferentes temperaturas.....	21
2.1. Introdução.....	24
2.2. Material e métodos.....	26
2.2.1. Criação de manutenção de <i>D. saccharalis</i>	26
2.2.2. Obtenções de linhagens de <i>Cotesia flavipes</i> e criação de manutenção.....	27
2.2.3. Bioensaios em diferentes temperaturas.....	28
2.2.4. Análise estatística.....	29
2.3. Resultados e discussão.....	29
2.4. Referências Bibliográficas.....	37
3. Artigo 2 - Diversidade genética de populações de <i>Cotesia flavipes</i> (Hymenoptera: Braconidae) no Brasil: análise combinada de dois genes.....	50
3.1 Introdução.....	54
3.2 Material e Métodos.....	55
3.3 Resultados e Discussão.....	57
3.4 Referencia Bibliográfica.....	61
4. Referencia Bibliográfica.....	68

1. Introdução Geral

A cana-de-açúcar [*Saccharum officinarum* (L.) Poaceae] é uma planta de clima tropical com grande importância socioeconômica para o Brasil, uma vez que é a principal matéria prima para a produção de açúcar e etanol. No País é considerada a terceira cultura em área de produção, após a soja (*Glycine max*)(Fabaceae) e o milho (*Zea mays*) (Poaceae). Originária do Sul da Ásia e Leste da Índia Ocidental, chegou ao Brasil pelos portugueses e espanhóis durante a época da colônia. Nestas terras, a cana-de-açúcar encontrou condições ideais para seu desenvolvimento, tornando o País líder mundial em produção (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2015).

No Brasil, o estado de São Paulo é líder na produção com aproximadamente 9 milhões de hectares, para a safra 2015/2016, o que corresponde a 51,7% da área cultivada. Os estados de Goiás (9,8%), Minas Gerais (8,9%), Mato Grosso do Sul (7,5%) e Paraná (6,8%), completam os cinco maiores produtores nacionais da cultura (CONAB, 2015).

No Rio Grande do Sul (RS) a cana-de-açúcar foi introduzida no ano de 1725 no município de Torres. Segundo estimativas, o Estado tem uma área de produção de aproximadamente 37 mil hectares (IBGE, 2010). Destes, aproximadamente 25 mil hectares são para uso na propriedade rural como fonte de alimento para bovinos, ou produção de melado, cachaça, açúcar mascavo e rapadura. Os demais 12 mil hectares presentes no RS são destinadas à produção comercial de cachaça, açúcar mascavo, melado, rapadura e álcool (SILVA et al., 2008). Estima-se que a área de cana-de-açúcar colhida no ano de 2014 foi de 26 mil ha, ou seja, 5,31% a menos que no ano de 2013 (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2015). Na safra 2015/16, 74,2 mil toneladas serão destinadas à produção de etanol, tendo um aumento de 1,1% em relação à safra 2014/15 (CONAB, 2015). O Estado possui apenas uma usina destinada à produção de álcool, instalada em 1985 no município de Porto Xavier, que produz menos de 2% do álcool consumido anualmente. Entretanto, estima-se que no RS, cerca de 1,5 milhões de hectares estão aptos para a produção desta cultura (VERISSIMO, 2012).

Assim como nos demais Estados, um dos fatores limitantes para a produção da cultura no RS é a ocorrência de pragas. Existem mais de 80 espécies de insetos que tem como fonte de alimento a cana-de-açúcar, sendo *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) a principal praga que ataca a cultura (PINTO, 2006). Das cerca de 21 espécies de *Diatraea* no continente americano, apenas *D. saccharalis* e *D. flavipennella* (Box, 1931) (Lepidoptera: Crambidae) possuem importância econômica (MENDONÇA, 1996).

De origem Neotropical, *D. saccharalis* ocorre do Sul dos Estados Unidos até a Argentina, sendo o primeiro relato em canaviais brasileiros no Estado de Santa Catarina no ano de 1841 (GUAGLIUMI, 1972/73; GALLO et al., 2002). Outros autores registraram o ataque de *D. saccharalis* a outras culturas além da cana-de-açúcar, como arroz (*Oryza sativa*) (Poaceae) de sequeiro nas regiões Norte e Centro-Oeste (FERREIRA, 1999; FERREIRA et al., 2001), milho (INGRAM; BYNUM, 1984), pastagens, sorgo (*Sorghum bicolor*) (Poaceae) (LARA et al., 1980) e trigo (*Triticum aestivum*)(Poaceae) (GALLO et al. 2002).

Diatraea saccharalis possui desenvolvimento holometabólico. Os ovos são depositados nas folhas em forma de escama de peixe, tendo um período embrionário que varia de 4 a 12 dias, de acordo com a temperatura ambiente. Cada fêmea pode colocar cerca de 300 ovos que possuem cor amarelada no início, passando a rósea até chegar a marrom-escuro, quando as cápsulas cefálicas dos embriões no interior dos ovos tornam-se visíveis (LIMA FILHO; LIMA, 2001). A fase larval é a fase que causa prejuízos às culturas. Possui seis instares e a duração pode variar de 22 a 46 dias de acordo com a temperatura ambiente (DE MELLO; PARRA, 1988). As lagartas apresentam coloração branca amarelada e cápsula cefálica marrom escura e, podem atingir até 2,5 cm de comprimento (GALLO et al., 2002). Logo após a eclosão alimentam-se na parte superior das folhas e após a primeira ecdise (segundo instar) penetram no colmo pela parte mais tenra do mesmo, abrindo galerias de baixo para cima. A fase de pupa pode ocorrer na planta ou no solo, podendo durar de 7 a 14 dias, dependendo da temperatura ambiente. Possui coloração castanha escura (DE MELLO; PARRA, 1988).

Altas populações de *D. saccharalis* podem inviabilizar a produção de cana-de-açúcar (MACEDO, 2004). A construção de galerias pelas lagartas ocasiona o dano direto provocando perda de peso dos colmos, perfilhamento e morte da gema apical (coração morto). Quando ocorre a abertura de galerias transversais no colmo pode ocorrer o tombamento da planta pelo vento, o enraizamento aéreo e as brotações que também são sintomas de ataque da broca-da-cana-de-açúcar. Já os prejuízos indiretos causados pela praga são quando fungos [*Fusarium moniliforme* J. Sheld. (1904) e/ou *Colletotrichum falcatum* Went (1893) (Sordariomycetes)] causadores da podridão vermelha usam do orifício e da galeria deixados pela lagarta para poder infestar a planta, causando perdas no rendimento de caldo (MACEDO; BOTELHO, 1988). Relatos de Benedini (2006) mostram que para cada 1% de infestação por *D. saccharalis*, em uma produtividade média de 80 ton./ha, ocorrem perdas de 640 kg de cana, o que corresponde a 30 Kg de açúcar e 25 L de álcool, aproximadamente.

A eficiência do controle químico de *D. saccharalis* depende do contato do inseticida com a lagarta, uma vez que a mesma está no interior do colmo e além disto, casos de resistência a inseticidas já foram detectados no Estados Unidos em lavouras de cana-de-açúcar (REAY-JONES et al., 2005). Por estes motivos, estudos com inimigos naturais da praga iniciaram na década de 70 com o parasitoide *Lixophaga diatraea* (Townsend) (Diptera: Tachinidae) importado de Cuba, e com os nativos *Lydella minense* Townsend, 1927, *Metagonistylum minense* Townsend, 1927 e *Paratheresia claripalpis* Wulp. 1896 (Diptera: Tachinidae).

Em vista dos resultados obtidos com estes parasitoides não serem satisfatórios, em 1974 foi introduzido de Trinidad e Tobago (América Central), *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae). *Cotesia flavipes* é um endoparasitoide, originário da Índia e do Paquistão e foi introduzido em mais de 40 países desde 1950 para controle de *Chilo partellus* (Swinhoe, 1885), *D. saccharalis*, *Chilo sacchariphagus* (Bojer, 1856), *Chilo orichalcociliellus* (Strand, 1911) (Lepidoptera: Crambidae), *Busseola fusca* (Fuller, 1901) e *Sesamia calamistis* (Hampson, 1910) (Lepidoptera: Noctuidae), em culturas como o cana-de-açúcar, milho e sorgo (POLASZEK; WALKER, 1991; OVERHOLT, 1998; OVERHOLT et al., 1994). O seu uso já foi registrado

em programas de controle biológico no Caribe, grandes partes da América do Norte e do Sul, África Oriental, nas ilhas do Oceano Índico, Madagáscar, Maurícius e Reunion, e também com redistribuição dentro da Ásia (MOHYUDDIN et al., 1981).

Cotesia flavipes possui desenvolvimento holometabólico (ovo, larva, pupa e adulto), com ciclo de vida de aproximadamente 20 dias a 25°C. As fêmeas se originam de ovos férteis e os machos a partir de partenogênese (CAMPOS-FARINHA, 1996). O número de ovos colocados pelas fêmeas varia conforme o tamanho do hospedeiro (BREWER; KING, 1981), porém, Macedo (2000) relata que fêmeas de *C. flavipes* ovipositam de 60 a 65 ovos em seu hospedeiro. O período embrionário tem duração de três a quatro dias e após a eclosão, as larvas passam por 3 instares, com uma duração de 4 a 12 dias até chegarem à fase de pupa (CAMPOS-FARINHA, 1996). A pupa é protegida por um casulo confeccionado de fios de seda, construído pelas próprias larvas, e a duração da fase é variável dependendo da temperatura. Após, emergem os adultos, que sobrevivem a uma faixa ideal de temperatura que vai de 20 e 30°C (PÁDUA, et al. 1994). A introdução de *C. flavipes* no Brasil foi realizada em dois momentos, sendo um na região Sudeste e outro na região Nordeste nos anos de 1971 e 1974, respectivamente. Em 1978, novas raças de *C. flavipes* provenientes da Índia e do Paquistão, regiões mais frias e úmidas, foram introduzidas no Estado de São Paulo (MACEDO, 1978).

Muitos estudos questionam a eficiência do controle biológico com *C. flavipes* (DINARDO-MIRANDA et al., 2014) e argumentam que a baixa eficiência poderia estar relacionada à baixa variabilidade genética, o que pode tornar o parasitoide mais suscetível a fatores bióticos como doenças e abióticos como fatores climáticos. Dentre os fatores abióticos, a temperatura pode afetar a distribuição, a colonização, a sobrevivência, a abundância e o comportamento (ANGILLETTA, 2009). A temperatura é um fator importante para muitos aspectos ecológicos e de desenvolvimento de parasitoides (WALTHER et al., 2002). Por este motivo é recomendada a liberação em horários com temperaturas mais amenas do dia (PINTO et al., 2006). Estudos realizados por Emaná (2007) utilizando como hospedeiro *C. partellus*, avaliou a fecundidade e a longevidade de *C. flavipes* em diferentes temperaturas e observou que com temperaturas mais baixas há um maior período de

desenvolvimento, embora em baixas temperaturas o número de ovos por fêmea é menor.

Quando o hospedeiro utilizado para a avaliação de parâmetros biológicos foi *D. saccharalis* observou-se a diminuição do período de ovo-larva com o aumento da temperatura, num intervalo de 20 a 30°C. Temperaturas acima de 30°C mostraram-se prejudiciais ao desenvolvimento de *C. flavipes*, uma vez que a 32°C o ciclo de vida aumenta e a 35°C não ocorre desenvolvimento. O número de descendentes também varia com o aumento de temperatura, obtendo-se mais indivíduos adultos a uma temperatura de 25°C (PÁDUA et al., 1994). Assim, estudos para avaliar a variabilidade das populações de parasitoides são importantes, uma vez que quanto maior a variabilidade maior será a chance deste parasitoide sobreviver em condições adversas, pois o comportamento da espécie é influenciado pela variabilidade intraespecífica (WAJNBERG, 2010). Estudos de caracterização biológica poderão indicar se existe ou não variabilidade genética.

Complementarmente, estudos moleculares poderão indicar com maior precisão a variabilidade existente em diferentes populações (BUSATO et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007; HIRAGI et al., 2009; FONTES et al., 2010). A descoberta de técnicas de amplificação de DNA na década de 1980 pode ser considerada uma das maiores descobertas da biologia, pois a capacidade de amplificar um gene ou região genômica de interesse abriu inúmeras possibilidades em termos de identificação de organismos, genes, genótipos e mutações populacionais (SAIKI et al. 1985, 1988; MULLIS et al. 1986). Esta amplificação é dada através da reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction - PCR), com a qual é possível fazer a amplificação de DNA a partir de pequenas quantidades de tecido, possibilitando a obtenção de DNA suficiente para sua manipulação (MULLIS et al. 1986). Assim como em diversas áreas da biologia, os estudos entomológicos e as áreas relacionadas têm se beneficiado do uso desta técnica. Técnicas de PCR foram empregadas por Muirhead (2012) para avaliar a variação genética de *C. flavipes* com populações oriundas de diferentes partes do mundo, a fim de saber as relações entre as regiões geográficas e identificar biótipos geneticamente divergentes. Esta mesma técnica foi utilizada por Roehrdanz et al. (1993) para distinguir cinco espécies de parasitoides que atacam pulgões. Traugott et al. (2006)

amplificaram o DNA de duas espécies de parasitoides pertencentes ao gênero *Cotesia* (*C. glomerata* (Linnaeus, 1758) e *C. rubecula* (Mashall,1885)), mostrando que uma pequena amostra de DNA pode ser amplificada.

A existência de diferenças geográficas, em linhagens específicas de hospedeiros e/ou de plantas preferidas por *C. flavipes*, tem sido levada em consideração, quando se analisa o comportamento desse parasitoide. A hipótese de que tais diferenças influenciam o comportamento deste parasitoide, baseia-se em pesquisas de laboratório, nas quais foi estudado o comportamento de preferência do parasitoide, de diferentes linhagens, por certas plantas (SHAMI; MOHYUDDIN, 1992). Segundo os mesmos autores, quando *C. flavipes* parasita *D. saccharalis* que se desenvolveram em áreas de milho, em poucas gerações o hábito de parasitar lagartas que se desenvolvem em cana pode mudar, e a partir daí sua preferência por parasitismo, será de lagartas que se alimenta de milho ou vice e versa. Com isso, o presente trabalho tem como objetivo determinar a variabilidade genética de populações de *C. flavipes* oriundas de diferentes regiões do Brasil, por meio da determinação de parâmetros biológicos e de análise molecular. A existência de populações com maior variabilidade genética poderá auxiliar na escolha de linhagens mais adaptadas às condições térmicas de diferentes locais de cultivo de cana-de-açúcar, como o Rio Grande do Sul e, assim aumentar as chances de sucesso de programas de controle biológico.

Artigo1: Revista Brazilian Journal of Biology

Artigo 1. Variabilidade biológica de populações de *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) quando expostas a diferentes temperaturas.

Giovani Smaniotto¹, Raul da Cunha Borges Filho², Daniel Bernardi³, Gabriela Inés Diez-Rodríguez³, Ana Paula Schneid Afonso da Rosa³ e Dori Edson Nava³

¹ Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Avenida Eliseu Maciel s/n, 96010-900, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil, E-mail: giovanismaniotto@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (FAEM), Departamento de Fitossanidade, Caixa Postal 354, CEP 96900-010, Capão do Leão, RS, Brasil. E-mail: raulborgesfilho@yahoo.com.br

³ Embrapa Clima Temperado, BR 392, KM 78, Caixa Postal 403, CEP 96010-970, Pelotas, RS. Brasil. E-mail: dbernardi2004@yahoo.com.br; gidiez@gmail.com; ana.afonso@embrapa.br; dori.edson-nava@embrapa.br

Resumo - *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) é a principal praga da cana-de-açúcar e seu controle tem sido realizado, principalmente com o endoparasitoide *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae). Embora se tenha uma área de aproximadamente 3 milhões de hectares sendo tratada com *C. flavipes* no Brasil, há questionamentos quanto a sua eficiência. O objetivo do trabalho foi conhecer a variabilidade genética de populações de *C. flavipes* em diferentes temperaturas, por meio da avaliação dos parâmetros biológicos e da determinação das exigências térmicas. Foram avaliadas cinco populações de *C. flavipes* coletadas no Paraná (PR), Minas Gerais (MG), Alagoas (AL) e duas populações de São Paulo (SPI e SPII). As temperaturas utilizadas foram de 10, 15, 18, 20, 22, 25, 30 e 32°C, sendo a umidade relativa do ar de 70±20% e fotofase de 12 horas. A duração do período ovo-adulto *C. flavipes* foi inversamente proporcional à temperatura, na faixa térmica de 18 a 30°C. Nas temperaturas de 10, 15 e 32°C não ocorreu desenvolvimento. A maior porcentagem de insetos emergidos ocorreu na faixa térmica da 25 a 28°C para

todas as populações estudadas. A temperatura também influenciou na razão sexual, sendo que a maior quantidade de fêmeas foi registrada nas temperaturas de 25 a 30°C. O limiar térmico inferior de desenvolvimento ou temperatura base (Tb) para o período de ovo-adulto variou de 9,73 a 11,15°C para as populações de SPII e MG, respectivamente, enquanto a constante térmica variou de 301,2 e 273,97 graus dias, para as populações de SPII e MG, respectivamente. Assim, demonstra-se que as diferentes populações possuem variabilidade biológica quando expostas a diferentes temperaturas.

Palavras chave: Controle biológico, Cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*

Abstract

Variability populations of *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) when exposed to different temperatures

Diatraea saccharalis (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) is the main plague of sugarcane and its control has been held, especially with the endoparasitoid *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae). Although it has an area of approximately 3 million hectares being treated with *C. flavipes* in Brazil, there are questioning about its effectiveness. The objective of this study was to experience the variability of populations of *C. flavipes* as the biological parameters when submitted to different temperatures. In this study were evaluated five populations of *C. flavipes* collected in Parana (PR), Minas Gerais (MG), Alagoas (AL) and two populations in São Paulo (SPI and SPII). The temperatures used were 10, 15, 18, 20, 22, 25, 30 and $32\pm 1^{\circ}\text{C}$, and the relative humidity of $70 \pm 20\%$ and photophase of 12 hours. The length of egg-adult period duration was inversely proportional to the temperature in the range 18 to 30°C . At temperatures of 10, 15 and 32°C no development occurred. The highest percentage of emerged insects occurred in the temperature range of 25 to 28°C for all populations. The temperature also influenced the sex rate, with the largest number of females recorded in the temperature of 25 to 30°C . The lower thermal threshold of development or threshold temperature (TT) to the egg-adult period ranged from 9.73 to $11,15^{\circ}\text{C}$ to populations SPII and MG, respectively, while the thermal constant ranged between 301.2 and 273, 97 degree days for the populations of SPII and MG, respectively. Thus, it is demonstrated that different populations have variation when exposed to different temperatures.

Key words: Biological control, cane sugar, *Diatraea saccharalis*

2.1. Introdução

A cana-de-açúcar [*Saccharum officinarum* (L.) Poaceae] é cultivada no Brasil desde a época do Brasil Colônia, quando trazida pelos portugueses e espanhóis. A matéria-prima é base para as indústrias de açúcar e álcool (etanol), gerando fonte de renda, além de empregos diretos e indiretos (Martins e Castro, 1999) no Brasil. A estimativa de área plantada para a safra 2015/16 é de aproximadamente 9 milhões hectares (Conab, 2015). No Rio Grande do Sul a área de cultivo é de aproximadamente 37 mil hectares, mas a partir do estudo de zoneamento agroecológico foi estimado que a cultura pode ocupar uma área de 1,52 milhões de hectares, concentrada principalmente nas regiões Oeste e Central do Estado (Embrapa, 2011).

Com a possível expansão do cultivo de cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul, provavelmente as pragas se tornarão um dos principais fatores de perdas, como ocorre nos demais centros produtores. Atualmente, são conhecidas 80 espécies de insetos no mundo que atacam a cultura da cana-de-açúcar e destas 50 são lepidópteros (Pinto et al., 2006). No Brasil, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) e *Diatraea flavipennella* (Box, 1931) (Lepidoptera: Crambidae) são as duas espécies que causam perdas econômicas (Planalsucar, 1982). Enquanto *D. saccharalis* tem ocorrência em todo o território nacional, *D. flavipennella* está restrita a canaviais nos estados da região Nordeste e Rio de Janeiro (Mendonça et al., 1996).

Devido ao fato das lagartas estarem abrigadas no interior do colmo e às dificuldades para a aplicação de inseticidas, o controle se torna ineficiente e prejudicial ao meio ambiente (Reay-Jones et al., 2005). Assim, na década de 1970 iniciaram-se os estudos com o controle biológico de *D. saccharalis* utilizando o parasitoide *Lixophaga diatraea* (Townsend) (Diptera: Tachinidae) importado de Cuba, e com os nativos *Lydella minense* Townsend, 1927, *Metagonistylum minense* Townsend, 1927 e *Paratheresia claripalpis* Wulp. 1896 (Diptera: Tachinidae). Em vista dos resultados obtidos com estes

parasitoides não serem satisfatórios, em 1974 foi introduzido de Trinidad e Tobago (América Central) *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) (Mendonça et al., 1977). *Cotesia flavipes* é um parasitoide larval gregário que apresenta desenvolvimento holometabólico, com ciclo de vida que pode variar de 16-25 dias, de acordo com a temperatura e idade do hospedeiro, sendo que a duração do período ovo-pupa varia de 11-18 dias (Bennett et al., 1978).

Quando as larvas completam o terceiro instar, cerca de 10 a 15 dias após a inoculação, perfuram o tegumento, saem do hospedeiro e pupam próximo deste, construindo casulos com fios de seda regurgitados pelas próprias larvas, formando um aglomerado de casulos (massa) de coloração branca (Macedo e Araújo, 2000; Pinto et al., 2006).

Sabe-se que a variabilidade genética das populações é importante para o controle biológico, porém, este conhecimento é somente teórico (Omwega e Overholt, 1996), tendo poucos trabalhos realizados em nível de campo. Segundo Wajnberg (2010) vários atributos comportamentais são influenciados pela variação genética intraespecífica. O autor ainda cita que para selecionar os inimigos naturais a fim de melhorar o desempenho do controle biológico é necessário conhecer melhor a capacidade do agente a ser utilizado, em resposta às condições que o ambiente lhe apresentará. Este fator demonstra a importância da variabilidade genética para agentes de controle biológico, uma vez que, um parasitoide utilizado é eficiente quando localiza e ataca de forma eficaz o hospedeiro, permanecendo nesta área até que a maioria dos hospedeiros seja parasitado (van Lenteren e Bigler, 2010). Esta variabilidade genética é afetada quando os parasitoides são criados em laboratório de forma massal para liberação, sendo um dos maiores obstáculos encontrado para a manutenção de qualidade da criação (Prezotti et al., 2004).

Cotesia flavipes foi introduzida no Brasil por duas vezes nas regiões Nordeste e Sudeste na década de 70 (Mendonça et al., 1977). Atualmente, há muitas dúvidas quanto a sua eficiência (Dinardo-Miranda et al., 2014) e teme-se que a falta de variabilidade possa comprometer o controle biológico de *D. saccharalis* nas regiões tradicionais de produção de cana-de-açúcar e também em novas áreas agrícolas. Neste último caso está o Rio Grande do Sul, onde pesquisas demonstram que há uma área considerável para expandir a

produção de cana-de-açúcar. Assim, a procura de linhagens adaptadas a grandes variações de temperaturas pode ser chave para a eficiência do controle biológico nas condições do Estado. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi conhecer a variabilidade genética de diferentes populações de *C. flavipes* em diferentes temperaturas por meio da avaliação de parâmetros biológicos.

2.2. Material e métodos

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Entomologia da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul. As criações de *C. flavipes* e *D. saccharalis* foram mantidas em salas climatizadas com temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

2.2.1. Criação de manutenção de *D. saccharalis*

Para a criação das lagartas de *D. saccharalis* foi utilizada a dieta artificial de Hensley & Hammond (1968), com modificações propostas por Parra e Mishfeldt (1992). Após o preparo da dieta, a mesma foi vertida em tubos cilíndricos de vidro de fundo chato (2,5 cm de diâmetro por 8,5 cm de altura) e tamponados com algodão hidrófobo. Após 24 horas do seu preparo foram inoculadas três lagartas recém eclodidas por tubo. Por ocasião da pupação, os insetos foram retirados da dieta e deixados por 15 minutos mergulhados em uma solução de hipoclorito de sódio 8%. Em seguida, as pupas foram mergulhadas em água corrente e colocadas sobre papel filtro para a retirada do excesso de umidade e, quando secas, foram acondicionadas em caixas Gerbox e levadas nas salas de criação.

Quando da emergência, aproximadamente 25 casais foram transferidos para gaiolas confeccionadas com tubos de PVC (200 mm) revestidos com papel de ofício. A parte inferior das gaiolas foi apoiada sobre uma bandeja de plástico e a parte superior foi fechada com tecido tipo *voile* a fim de evitar a fuga dos insetos. Para alimentação dos adultos foi colocado em cada gaiola um tubo de acrílico (25 ml) contendo algodão embebido em solução de mel a 10%. Por ocasião da oviposição, o papel contendo as posturas foram recortados e

mergulhados numa solução a base de cobre 1% por um período de três minutos. Posteriormente, foram passadas por água destilada para retirada do excesso de solução e deixadas para secar sobre papel filtro. Quando secas, as posturas foram acondicionadas em placas de Petri (8,5 cm de diâmetro), vedadas com plástico filme e mantidas em sala climatizada até a eclosão das lagartas. O alimento oferecido para os adultos foi substituído a cada 2 dias e o substrato contendo as posturas foi retirado diariamente.

A dieta artificial utilizada para a realimentação das lagartas após o parasitismo por *C. flavipes* foi a dieta proposta por Hensley & Hammond (1968). O procedimento de preparo da dieta foi semelhante àquele utilizado para a alimentação das lagartas. As dietas foram armazenadas em placas de Petri (15 cm de diâmetro).

2.2.2. Obtenções de linhagens de *Cotesia flavipes* e criação de manutenção

As populações de *C. flavipes* foram oriundas dos Estados de Alagoas (população AL), Paraná (população PR), Minas Gerais (população MG) e São Paulo (populações SPI e SPII) (Tabela 1).

Para a multiplicação de *C. flavipes*, as fêmeas foram acondicionadas em gaiolas de parasitismo (potes de plástico com 6,5 cm de diâmetro e 8 cm de altura), contendo um orifício na tampa, por onde as mesmas saíam individualmente e realizavam o parasitismo nas lagartas de *D. saccharalis* que eram colocadas próximas a este orifício (Macedo et al., 1983). Para tanto, após 24 horas da emergência de *C. flavipes*, lagartas de quarto instar de *D. saccharalis* foram ofertadas para o parasitismo e em seguida transferidas para placas de Petri (8,5cm de diâmetro), contendo alimentação de reposição, para que as mesmas pudessem completar o estágio larval e assim permitir o desenvolvimento. Em cada placa foram colocadas no máximo 8 lagartas e 4 pedaços (1 cm³) de dieta para realimentação. Após vinte e quatro horas da pupação, os casulos foram transferidos para as gaiolas de parasitismo, ficando neste local até a emergência.

2.2.3. Bioensaios em diferentes temperaturas

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado e os dados foram analisados num esquema fatorial 5 x 9 (populações x temperaturas). Foram utilizadas câmaras climatizadas com temperaturas de 10, 15, 18, 20, 22, 25, 28, 30, $32\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. Foram utilizadas 20 lagartas (repetição) para cada temperatura. Em cada temperatura foram avaliadas os seguintes parâmetros biológicos: as durações do período ovo-pupa, da fase de pupa e do período ovo-adulto, a viabilidade de pupas e a razão sexual das cinco populações de *C. flavipes*. A razão sexual foi determinada avaliando-se o número de fêmeas em relação ao número total de insetos (Silveira-Neto et al. 1976).

Após 24 horas da emergência de *C. flavipes*, esperava-se este período para que todas as fêmeas acasalassem, lagartas de *D. saccharalis* de quinto instar (Pádua, 1983), foram ofertadas aos parasitoides. Para tanto, lagartas foram retiradas da dieta artificial e colocadas próximas ao orifício de saída dos parasitoides das gaiolas de parasitismo para que as fêmeas realizassem o parasitismo, sendo que cada lagarta era parasitada por apenas uma fêmea. Após o parasitismo, as lagartas foram individualizadas em placas de Petri (8,5 cm de diâmetro) juntamente com um pedaço de dieta (1cm^3), identificadas e acondicionadas em bandejas de plástico e levadas para as câmaras climatizadas nas diferentes temperaturas.

Quando as larvas de *C. flavipes* iniciaram a fase de pupa, as mesmas foram transferidas para potes de plástico (gaiolas) (5 cm de diâmetro com capacidade de 100 ml) e colocadas novamente na temperatura onde ocorreu o desenvolvimento e a emergência. Assim, ao emergir foi registrado o número de adultos (machos e fêmeas) e o número de pupas que originaram adultos e as que não apresentavam sinais de emergência dos parasitoides. A separação por sexo foi baseada nas características morfológicas das antenas, sendo menores nas fêmeas (Wilkinson, 1928). Para diferenciar as pupas que deram origem a adultos foi utilizado como indicador a coloração das mesmas, ou seja, pupas em que não ocorreu a emergência apresentavam coloração mais escura em relação às pupas que deram origem a adultos. Outra característica foi a presença da abertura de saída feita pelo parasitoide no casulo.

2.2.4. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise residual studentized para confirmar a suposição de normalidade (teste de Shapiro-Wilk), utilizando o procedimento PROC UNIVARIATE em SAS® 9.1 (SAS Institute, 2000). Quando os dados não apresentaram distribuição normal em arcos, os mesmos passaram por transformação $\sqrt{x + 0,5}$ antes de serem analisados. Em seguida, todos os dados foram submetidos ao procedimento PROC GLM no SAS 9.1 (SAS Institute, 2000). Os resultados relativos à razão sexual foram analisados pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) ($P < 0,05$) (PROC FREQ, SAS Institute, 2000). As exigências térmicas do período ovo-pupa, da fase de pupa e o período ovo-adulto de *C. flavipes* foram estimadas calculando-se o limiar térmico inferior de desenvolvimento ou temperatura base (T_b) e a constante térmica (K), com base na duração média de cada período/fase, nas seis temperaturas onde ocorreu o desenvolvimento (SAS Institute, 2002-2008).

2.3. Resultados e discussão

Não se obteve desenvolvimento das populações de *C. flavipes* a 10, 15 e 32°C, embora a 32°C algumas larvas do parasitoide se desenvolveram e chegaram a sair do hospedeiro, porém não confeccionaram o casulo. Este relato também foi observado por Pádua et al. (1994) e acredita-se que temperaturas próximas de 32°C, acarreta na mortalidade do parasitoide na fase de pré-pupa. Outro motivo que tem contribuído para o não desenvolvimento do parasitoide nesta condição térmica foi a morte prematura de seu hospedeiro.

Para as demais condições térmicas, o desenvolvimento do período ovo-pupa, da fase de pupa e do período ovo-adulto de *C. flavipes* foi inversamente proporcional à temperatura no intervalo de 18 a 30°C, ou seja, quanto maior a temperatura menor o período de desenvolvimento. Este comportamento já foi observado por Cueva et al. (1980) e por Pádua et al. (1994).

Quando analisado o desenvolvimento das populações de *C. flavipes* em cada temperatura observa-se que existe uma variação na duração do período ovo-pupa, demonstrando que existe uma variabilidade, sendo esta mais acentuada na temperatura de 18°C (Tabela 2). A 18°C as populações PR, AL e MG levaram mais tempo para completar o período ovo-pupa diferindo

significativamente das populações SPI e SPII ($F = 13,60$; g.l. = 4;71; $p < 0,0001$). Para a temperatura de 20°C foram observadas diferenças significativas entre as populações PR e MG, sendo que para as demais, os valores foram intermediários ($F = 2,62$; g.l. = 4;74; $p < 0,0419$). Quanto à temperatura de 22°C, a população SPI diferiu das demais, sendo que a duração foi aproximadamente de 1 a 1,5 dias maior ($F = 18,96$; g.l. = 4;83; $p < 0,0001$). A 25°C, diferenças significativas foram observadas entre as populações de SPII e AL, sendo que as demais não diferiram de ambas ($F = 6,38$; g.l.= 4;78; $p < 0,0002$). Para a temperatura de 28°C, a duração do período ovo-pupa foi maior para a população PR, diferindo das populações SPI e AL, enquanto as populações SPII e MG tiveram durações intermediárias e não diferiram entre si ($F = 4,97$; g.l. = 4,75; $p < 0,0013$). A 30°C, os valores de duração de ordem decrescente foram observados para as populações MG, SPI, SPII, PR e AL, de maneira que diferenças significativas foram observadas, mas biologicamente elas não são importantes, devido à pequena diferença de valores entre as populações ($F = 7,19$; g.l. = 4;80; $p < 0,0001$) (Tabela 2). A faixa de temperatura de desenvolvimento do período ovo-pupa de *C. flavipes* encontrada neste trabalho (18 a 30°C) vai ao encontro com a que Pádua et al. (1994) observaram em seus trabalhos na faixa térmica de 20 a 32°C. Estes mesmos autores encontraram valores de duração semelhantes para as temperaturas de 20 e 30°C, enquanto Boiça Jr. et al. (1997) a 28°C, observaram resultados superiores que aos de 30°C registrados no presente estudo. A maior variabilidade de duração do período ovo-pupa pode ser vista para a temperatura de 18°C, aonde a duração varia de 25,4 a 28,9 dias, para as populações de SPII e PR, respectivamente, correspondendo a uma diferença de 3,5 dias. As demais temperaturas apresentam uma variação de no máximo 1,5 dias de duração. Esta variação pode estar relacionada a taxas metabólicas que as populações apresentam, uma vez que o metabolismo tem influência da temperatura do ambiente em que o inseto se desenvolve (Irlich et al. 2009).

Quando analisada a duração da fase de pupa observou-se que as temperaturas de 18 e de 20°C possibilitaram variação no desenvolvimento e assim, provavelmente deve haver uma variabilidade entre as populações. A 18°C, a população PR teve uma maior duração e diferiu das demais ($F = 13,60$;

g.l. = 4;71; $p < 0,0001$) (Tabela 3). Para 20°C a duração da população SPI apresentou diferença significativa em relação às demais populações ($F = 5,70$; g.l. = 4;67; $p < 0,0005$) (Tabela 3). Na temperatura de 22°C, a população SPI diferiu significativamente da população MG e as demais apresentaram valores intermediários ($F = 3,94$; g.l. = 4;79; $p < 0,0058$) (Tabela 3). Para a temperatura de 25°C, as populações PR e MG diferiram de SPII, mas não de SPI e de AL ($F = 6,38$; g.l. = 4;78; $p < 0,0002$) (Tabela 3). Para a duração da fase de pupa a 28°C, observou-se que a população de MG diferiu das populações de PR e SPI, sendo que estas não diferiram de SPII e AL ($F = 3,76$; g.l. = 4;71; $p < 0,0079$) (Tabela 3). Para a temperatura de 30°C, a população SPI diferiu significativamente da AL e estas por sua vez não diferiram das demais ($F = 4,0$; g.l. = 4;76; $p < 0,0054$) (Tabela 3). Analisando os dados da fase de pupa foi possível observar que com o aumento da temperatura a duração diminuiu conforme registrado por Pádua et al. (1994) e por Boiça Jr. et al. (1997). Esta diferença observada no presente estudo mostra que as populações apresentam variabilidade entre si para a fase de pupa. Esta variabilidade é mais perceptível nas temperaturas de 18 e 20°C, aonde a diferença na duração foi de 3,4 e 2,4 dias, respectivamente, entre a população com menor duração e a com maior duração. Para as demais temperaturas a duração variou de 0,6 a 1 dia.

Desta forma, em temperaturas mais baixas, as diferenças do período de desenvolvimento das populações são maiores, e assim possivelmente esta variabilidade deve ser levada em consideração na hora da escolha da população para programas de controle biológico em regiões com temperatura mais amenas.

Quando analisado o desenvolvimento do ciclo biológico (ovo-adulto) das populações em cada temperatura observa-se que existe uma variabilidade, sendo esta mais acentuada na temperatura de 18°C, aonde a variação do período chegou a 5,7 dias. A 18°C a população PR diferiu das demais populações, das quais AL, SPI e SPII não diferiram significativamente, sendo que SPI e MG foram semelhantes ($F = 27,54$; g.l. = 5;71; $p < 0,0001$). A 20°C, SPI não mostrou diferença significativamente de PR e AL, sendo estas semelhantes à SPII, que não diferiu significativamente de MG ($F = 9,27$; g.l. = 5,69; $p < 0,0001$). Para 22°C, as populações não apresentaram diferença

significativa ($F = 2,85$; g.l. = 5;79; $p > 0,0293$). Para 25°C, a população SPII diferiu significativamente das demais populações ($F = 12,8$; g.l. = 5;78; $p < 0,0001$). Para a temperatura de 28 e 30°C não foram observadas diferenças significativas entre as populações ($F = 1,15$; g.l. = 5;76; $p > 0,3383$; $F = 2,78$; g.l. = 4;80; $p > 0,5415$, respectivamente) (Tabela 4). Analisando os dados do período ovo-adulto foi possível observar que com o aumento da temperatura a duração diminuiu. Assim a temperatura tem influência sobre a fase imatura do parasitoide como é perceptível analisando separadamente os dados do período ovo-pupa e da fase de pupa. A maior diferença na duração do período ovo-adulto entre as populações foi observada nas temperaturas de 18 e 20°C, sendo que esta variação mostra que pode haver uma variabilidade das populações quando expostas a temperaturas mais baixas a partir de 22°, sendo que a partir desta condição térmica as populações apresentaram pouca ou nenhuma diferença significativa para cada condição térmica testada.

A temperatura pode influenciar na razão sexual, sendo um indicador de que a mesma é favorável ou prejudicial para machos e fêmeas. Quando analisado a razão sexual das populações de *C. flavipes* em diferentes temperaturas observou-se que não houve diferença significativa a 18°C ($\chi^2 = 243,1$; g.l. = 1;240; $p = 0,4153$) (Tabela 5). A 20°C, as populações PR e MG diferiram significativamente das demais populações ($\chi^2 = 244,5$; g.l. = 1;232; $p = 0,3374$). Quando a razão sexual foi avaliada na temperatura de 22°C, as populações PR e SPI diferiram das demais populações ($\chi^2 = 292,8$; g.l. = 1;276; $p = 0,2319$), as quais não apresentaram diferença significativa. Para a temperatura de 25°C, as populações SPI e SPII mostraram-se diferentes das demais populações, pois apresentaram uma maior proporção de fêmeas ($\chi^2 = 233,9$; g.l. = 1;280; $p = 0,4274$). A 28°C, as populações SPI, SPII e PR mostraram diferença das demais populações, as quais não diferiram entre si ($\chi^2 = 233,2$; g.l. = 1;232; $p = 0,4274$). Para 30°C a população AL apresentou diferença das demais populações as quais não apresentaram diferença significativa entre si ($\chi^2 = 246,1$; g.l. = 1;232; $p = 0,2507$) (Tabela 5). As razões sexuais observadas neste trabalho são semelhantes ou superiores as encontradas por Henriques (2007) e Pádua et al. (1994). Segundo Campos-Farinha (2000) a proporção ideal de machos e fêmeas de parasitoides para um controle biológico eficiente é de 1:1, ou seja, acima de 0,5. Outros autores

relatam que um número maior de fêmeas emergidas fará com que a eficiência do controle tenha um maior sucesso (Favero 2009; Heimpel e Lundgren 2000), uma vez que machos não realizam parasitismo (Pandey e Tripathi 2008, Zanuncio et al. 2008). Além disto, machos apresentam hábitos poligâmicos, assim um macho pode acasalar com mais de uma fêmea, não afetando a reprodução (Arakaki e Ganaha, 1986). No presente estudo, SPII e PR para 20 e 22°C, respectivamente, apresentaram uma proporção maior de machos. É de conhecimento que a temperatura afeta diferentemente machos e fêmeas da ordem Hymenoptera e assim, a razão sexual pode mudar (Denlinger e Lee 1998).

A temperatura também influenciou a viabilidade de pupas, indicando que a mesma pode ou não ser favorável à emergência dos parasitoides. Quando este parâmetro foi avaliado a 18°C, as populações de PR e MG diferiram significativamente das demais populações ($F = 3,08$; g.l. = 4;75; $p < 0.0211$) (Figura 1A). Para 20°C, a população AL diferiu das demais. Já SPI e SPII mostraram-se semelhantes, diferindo de MG e PR as quais apresentaram viabilidade superior a 80% ($F = 3,84$; g.l. = 4;70; $p < 0.0070$) (Figura 1B). Para 22°C, a população PR e SPI foram semelhantes estatisticamente e diferiram das demais populações ($F = 2,58$; g.l. = 4;80; $p < 0.0433$) (Figura 1C). Para 25°C, todas as populações apresentaram viabilidade acima de 90% exceto SPI, a qual não diferiu significativamente de MG ($F = 3,13$; g.l. = 4;78; $p < 0.0193$) (Figura 1D). Para 28°C, SPII e AL não apresentaram diferença significativa entre si, porém diferiram das demais, sendo PR e MG semelhantes, já PR apresentou diferença significativa das demais populações ($F = 3,15$; g.l. = 4;68; $p < 0.7195$) (Figura 1E). Para 30°C, as populações de PR e AL não diferiram significativamente entre si, porém AL não diferiu das demais populações ($F = 0,95$; g.l. = 4;76; $p < 0.6400$) (Figura 1F).

Analisando os dados de viabilidade de pupa foi possível observar que a faixa de temperatura de 25 a 28°C proporcionou uma maior porcentagem de emergência, quando comparada com outras temperaturas, assim podendo ser considerada ideal para a viabilidade de pupas. Porém, Pádua et al. (1994) observou que a viabilidade de pupas se manteve constante de 22 a 30°C. A 22°C foi observada uma variação na viabilidade 70 a 95%, podendo ser considerada uma temperatura que apresentou boa viabilidade, porém maior

número de machos emergidos em comparação com as demais temperaturas, fato indesejável em criação massal de parasitoide (Pádua et al., 1994) e um ciclo de desenvolvimento maior em comparação com as temperaturas de 25, 28 e 30°C.

A faixa térmica ideal de desenvolvimento de *C. flavipes* observada neste trabalho vai ao encontro com a estimada por Pádua et al. (1994), sendo de 25 a 30°C. Nesta faixa térmica, *C. flavipes* apresentou menor variabilidade entre as populações quando avaliados os parâmetros biológicos na mesma condição térmica em relação às temperaturas mais baixas. Assim, todas as populações apresentaram um menor período de desenvolvimento em todas as fases e também uma maior viabilidade de pupas e razão sexual. Estes parâmetros são importantes na criação massal de parasitoides com finalidade de liberação para controle biológico. Assim, a mesma espécie pode mostrar resultados de aspectos biológicos diferentes quando provenientes de regiões distintas (Bleicher e Parra, 1988), o que pode caracterizar uma variabilidade entre estas populações como observado neste estudo.

O limiar térmico inferior de desenvolvimento ou temperatura base (T_b) estimada para o período ovo-pupa mostrou variação entre as populações (Tabela 6). Esta variação foi de 8,41 a 10,0°C para as populações SPII e AL, respectivamente, correspondendo a uma constante térmica (K) de 218,34 e 197,62 graus-dia. Para a fase de pupa, a variação da T_b foi de 10,75 a 12,52°C, para as populações SPI e PR, respectivamente, o que correspondeu a 90,57 a 82,30 graus dia. Assim, para o período ovo-adulto a variação da T_b foi de 9,73 a 11,15°C para as populações SPII e MG, respectivamente, correspondendo a uma K de 301,2 e 273,97 graus-dia (Tabela 6).

Os valores de T_b estimados neste trabalho foram superiores aos encontrados por Pádua et al. (1994), os quais observaram para o período de ovo-pupa uma T_b de 7,2°C e para a fase de pupa de 10,0°C, enquanto a K foi de 215,3 graus-dias para o período de ovo-pupa e de 96,2 graus-dias para a fase de pupa, assemelhando-se a estimada neste trabalho.

Analisando os dados de exigências térmicas é possível verificar que as mesmas possuem diferentes valores, sendo que para o período ovo-pupa a diferença na T_b foi de 1,59°C e a K 24,1 de graus-dias, para a fase de pupa as diferenças das T_b e K são 1,77° e 9,91 graus-dias, respectivamente, e para o

período de ovo-adulto as variações na Tb foram de 1,42°C e de 27,23 graus-dias. Este fato pode ser observado para a população AL no período de ovo-pupa, para o qual apresentou uma Tb de 10,0°C e uma K de 197,62 graus-dias, porém este fato não se manteve para o período ovo-adulto, aonde a população com maior Tb e menor K foi a oriunda de MG (Tabela 6). A diferença em aspectos biológicos e nas exigências térmicas de diferentes populações de uma espécie pode ser relacionada a vários fatores além do local de origem (Trudgill e Perry, 1994; Trudgill, 1995). Gomes (1997) e Fernandes et al. (1999) relataram que diferentes linhagens do parasitoide de ovos *Trichogramma pretiosum* (Riley, 1879) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) apresentaram comportamentos biológicos diferentes quando provenientes de locais distintos, com hospedeiro e culturas diferentes os quais devem ser considerados antes da utilização para bioensaios e principalmente quando da liberação a campo.

Vários aspectos biológicos são afetados pela variação genética intraespecífica dificultando a adaptabilidade do parasitoide em um ambiente, mostrando a importância da variabilidade genética para um agente de controle biológico (Wajnberg, 2010), assim um parasitoide terá sucesso em um programa de controle biológico quando for capaz de localizar e parasitar o hospedeiro de forma eficaz (van Lenteren e Bigler, 2010). Dentro da faixa de temperatura avaliada *C. flavipes* apresentou desenvolvimento mais rápido que a fase larval de seu hospedeiro *D. saccharalis* (Tb = 11,39; GD = 446,42; Equação de regressão linear $y = -0,02553 + 0,00224x$; $R^2 = 0,96$; $F = 119,58$ *p*-valor 0,0004). Esta característica apresentada pelo parasitoide é importante para o mesmo ser utilizado em um programa de controle biológico. Assim, o parasitoide apresentaria mais gerações por ano que seu hospedeiro, fazendo com que a população da praga diminua. Caso o inseto-praga tenha um desenvolvimento mais rápido que o parasitoide utilizado para seu controle, sua população aumentaria mais rapidamente e o uso deste método de controle não iria apresentar resultados satisfatórios.

Com a variabilidade biológica observada entre as populações de *C. flavipes* esta pode ser utilizada juntamente com dados agroclimáticos para futuras liberações do parasitoide em lavouras de cana-de-açúcar no RS.

Portanto as populações de *C. flavipes* apresentam variabilidade biológica em diferentes temperaturas, sendo mais evidente nas temperaturas

18 e 20°C as quais apresentaram a maior diferença na duração (dias) do período de ovo-pupa, fase de pupa e período ovo-adulto. Com essa variabilidade genética expressada pelas populações nas diferentes temperaturas a Tb de desenvolvimento mostrou-se diferente entre as populações, assim como as K.

2.4. Referências bibliográficas

ARAKAKI, N. and GANAHA, Y. 1986. Emergence pattern and mating behavior of *Apanteles flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). *Applied Entomology and Zoology*, v. 21, n. 3, p. 382-388. DOI: <http://doi.org/10.1303/aez.21.382>

BENNETT, F.D., STREET, G. and CUREPE, T. 1978. A comparison of the reproductive strategies and certain other biological characteristics of *Apanteles* spp. and the tachinid parasites of *Diatraea saccharalis* (Fabr.). *Anais da In Proceedings. International Society Sugar Cane Technologists*, v. 16 p. 523-527.

BLEICHER, E. and PARRA, J.R.P. 1989. Espécies de *Trichogramma* parasitoides de *Alabama argillacea* I. Biologia de três populações. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF. v. 24, n. 8, p. 929-940.

BOIÇA Jr, A. L., LARA, F. M. and BELLODI, M. P. 1997. Influência de variedades de cana-de-açúcar, incorporadas em dieta artificial, no desenvolvimento de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) e no seu parasitismo por *Cotesia flavipes* (Cam.) *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Londrina, v. 26, n. 3, p. 537-542.

CAMPOS-FARINHA, A.D.C. and CHAUD-NETTO, J. 2000. Biologia reprodutiva de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). V. Avaliação do número de posturas, prole e razão sexual do parasitoide em relação ao tamanho do hospedeiro *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 249-252,

Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, [Visto em 20 de Setembro de 2015]. Disponível em www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_06_11_09_00_38_boletim_graos_junho_2015.pdf.

CUEVA, C., AYQUIPA, A., and MESCUA, B. 1980. Studies on *Apanteles flavipes* (Cameron), introduced to control *Diatraea saccharalis* (F.) in Peru. *Revista Peruana de Entomologia*, Lima, v. 23, n. 1, p. 73-76,

DENLINGER. D.L. and LEE, R.E. 1998. Physiology of cold sensitivity. In: *Temperature sensitivity in insect and application in integrated pest management*, ed. HALLMAN, G.J.; DENLINGER, D.L. Boulder, CO: Westview. p. 55–96,

DINARDO-MIRANDA, L.L., FRACASSO, J.V., COSTA, V.P.D. and LOPES, D.O.T. 2014. Dispersal of *Cotesia flavipes* in sugarcane field and implications for parasitoid releases. *Bragantia*, v. 73, n. 2, p. 163-170. <http://dx.doi.org/10.1590/brag.2014.023>

Empresa de Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. 2011.[Visto em 20 dez. 2015] Disponível em: <http://www.cnps.embrapa.br/zoneamento_cana_de_acucar/>.

FÁVERO, K. 2009. *Biologia e técnicas de criação de Trichospilus diatreaea (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae) e Diatraea saccharalis (Lepidoptera: Crambidae).* Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 63 f. Dissertação Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade

FERNANDES, M. G., BUSOLI, A. C. and DEGRANDE, P. E. 1999. Natural parasitism of *Alabama argillacea* Hüb. and *Heliothis virescens* Fab. (Lep.: Noctuidae) by *Trichogramma pretiosum* Riley (Hym.: Trichogrammatidae) on cotton in the State of Mato Grosso do Sul. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 28, n. 4, p. 695-70.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. 2002. *Entomologia agrícola*. Piracicaba: FEALQ, p. 920.

GOMES, S. M. 1997 *Comparação de três hospedeiros alternativos para criação e produção massal de Trichogramma pretiosum e T. galloi*. ESALQ: Piracicaba. 106 p. Tese de Doutorado.

HEIMPEL, G.E. and LUNDGREN, J.G. 2000. Sex ratios of commercially reared biological control agents. *Biological Control* v. 19, n. 1, p. 77-93 doi:10.1006/bcon.2000.0849

HENRIQUES, M.T.D.M. 2007. *Produção e razão sexual de Cotesia flavipes (Hymenoptera: Braconidae) em lagartas de Diatraea saccharalis (Lepidoptera: Pyralidae) com diferentes temperaturas e alimentação*. 67p. Dissertação de Mestrado ao Centro Universitário de Caratinga, Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Sustentabilidade.

HENSLEY, S. D., and HAMMOND, A. M. 1968. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. *Journal of Economic Entomology* v. 61, n. 6, p. 1742-1743, DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jee/61.6.1742>

IRLICH, U.M., TERBLANCHE, J.S., BLACKBURN, T.M. and CHOWN, S. L. 2009. Insect rate-temperature relationships: Environmental variation and the metabolic theory of ecology. *The American Naturalist*, Chicago Press. v. 174, n. 6, p. 819-835. <http://www.jstor.org/stable/10.1086/647904>

LENTEREN, J.C. and BIGLER, F. 2010. Quality control of mass reared eggs parasitoids. In: CÔNSOLI, F.L., PARRA, J.R.P. and ZUCCHI, A. *Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on Trichogramma*. New York: Springer, cap.12, p. 315-340.

MACEDO, N. and ARAÚJO, J.R. 2000. Controle biológico da broca da cana-de-açúcar, *IAA/Planalsucar*. Piracicaba, p. 24

MACEDO, N., BOTELHO, P.S.M., DEGASPARI, L.C., ALMEIDA, J.R. and MAGRINI, E.A. 1983. Controle biológico da broca da cana de açúcar. *Manual de instrução Piracicaba, MIC PLANALSUCAR*. p. 22,

MARTINS, M.B.G. and CASTRO, P.R.C. 1999. Efeito de giberelina e ethephon na anatomia de plantas de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 34, n. 10, p. 1855-1863. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X1999001000012>

MENDONÇA, A.F. 1996. Guia das principais pragas da cana-de-açúcar, In A.F. MENDONÇA ed. *Pragas da cana-de-açúcar*. Maceió, *Insetos & Cia*, p. 3-48.

MENDONÇA, A.F., RISCO, S. H. and COSTA J. M. B. 1977. Introduction and rearing of *Apanteles flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) in Brazil. *Anais da ISSCT* v1, p. 703-710.

MENDONÇA, A.F., VIVEIROS, A.J.A. and SAMPAIO FILHO, F. 1996. A broca gigante da cana-de açúcar, *Castnia licus* Drury, 1970 (Lep.: Castniidae), In: Mendonça, A.F. (ed.), *Pragas da Cana-de-açúcar*. Maceió: *Insetos & Cia*. p.133-167.

OMWEGA, C.O. and OVERHOLT, W.A. 1996. Genetic changes occurring during laboratory rearing of *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae), an imported parasitoid for the control of gramineous stem borers in Africa. *African Entomology*, v. 4, n. 2, p. 231-237. NIST-CNRS, Cote INIST: 5289, 35400006831367.0150

PÁDUA, L.E de M., PARRA, J.R.P. and HADDAD, M. L. 1994. Efeito da temperatura e umidade relativa do ar na biologia de *Cotesia flavipes* (Cameron). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Jaboticabal v. 23, n. 1, p. 105-114.

PÁDUA, L.E.M. **Biologia comparada de *Apanteles flavipes* (Cameron, 1981) (Hymenoptera: Braconidae) para determinação das exigências térmicas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas Entomologia). Escola Superior

de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo. Piracicaba, p. 53, 1983.

PANDEY, A.K. and TRIPATHI, C.O.M. 2008. Effect of temperature on the development, fecundity, progeny sex ratio and life-table of *Campoletis chloridae*, an endolarval parasitoid of the pod borer, *Helicoverpa armigera*. *BioControl*, v. 53, n. 3, p. 461-47. DOI 10.1007/s10526-007-9083-3

PARRA, J.R.P. and MISHFELDT, L.J. 1992. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer, In: ANDERSON, T.E. and LEPPLA, N.C. (eds.), *Advances in Insect Rearing for Research and Pest Management*. Westview Press, p.195-209.

PINTO, A. S., GARCIA, J. F. and BOTELHO, B. S. M. 2006. Controle Biológico da cana de açúcar. In: PINTO, A. S., NAVA, D. E., ROSSI, M. M. and MALERBO-SOUZA, D. T. (Eds). *Controle Biológico de Pragas na Prática*. p. 287.

PLANALSUCAR. 1982. Guia das principais pragas da cana-de-açúcar no Brasil. Piracicaba, SP, Brasil. p.28.

PREZOTTI, L., PARRA, J.R.P., VENCOVSKY, R., COELHO, A. S. and CRUZ, I. 2004. 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. doi:10.1016/j.biocontrol.2004.01.011

SAS Institute Inc., Cary, Carolina do Norte, USA. This session is executing on the W32_VSPRO platfor. 2002-2008 .

SILVEIRA-NETO, S.; O. NAKANO; D. BARBIN & N. A. VILLA-NOVA. 1976. **Manual de ecologia dos insetos**. Piracicaba, Agronômica Ceres, 419 p.

TRUDGILL, D. L. 1995. Why do tropical poikilothermic organisms tend to have higher threshold temperatures for development than temperate ones? *Functional Ecology*, Oxford v. 9, n. 1, p. 136-137,

TRUDGILL, D. L. and PERRY, J. N. 1994. Thermal time and ecological strategies-a unifying hypothesis. *Annals of Applied Biology*, Oxford v. 125, n. 3, p. 521-532.

VACARI, A. M., DE BORTOLI, S. A., BORBA, D. F. and MARTINS, M. I. 2012. Quality of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) reared at different host densities and the estimated cost of its commercial production. *Biological Control*, v. 63, n. 2, p. 102-106. doi:10.1016/j.biocontrol.2012.06.009

WAJNBERG, E. 2010. Genetics of the behavioral ecology of egg parasitoids. In: CÔNSOLI, F.L., PARRA, J.R.P. and ZUCCHI, A. *Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on Trichogramma*. New York: Springer, cap. 5, p. 149-166.

WILKINSON, D.S. A revision of the Indo-Australian species of the genus *Apanteles* (Hym.: Braconidae). Part I. Bulletin of Entomological Research v.19, p.79-105, 1928.

ZANUNCIO, J.C., PEREIRA, F.F., JACQUES, G.C., TAVARES, M.T. and SERRÃO, J.E. 2008. *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae), a new alternative host to rear the pupae parasitoid *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae). *The Coleopterists Bulletin*, v. 62, p. 64-66. doi: <http://dx.doi.org/10.1649/1015.1>

Tabela 1: Populações de *Cotesia flavipes* utilizadas nos experimentos com seus dados de origem.

População	Cidade	Estado	Coordenadas geográficas	Alt.	Origem
AL	Maceió	Alagoas	9°38'07"S; 36°12'16" O	7 m	Laboratório
PR	Bandeirantes	Paraná	23°06'36"S; 50°22'04" O	381 m	Campo
MG	Serra dos Aimorés	Minas Gerais	17°46'58"S; 40°14'52" O	615 m	Laboratório
SPI	Sertãozinho	São Paulo	21°08'16"S; 48°58'22" O	579 m	Laboratório
SPII	Américo Brasiliense	São Paulo	21°43'26"S; 48°06'07" O	280 m	Laboratório

Tabela 2: Duração (dias) (média \pm erro padrão) do período ovo-pupa de populações de *Cotesia flavipes* criadas em *Diatraea saccharalis* em diferentes temperaturas. Umidade relativa do ar de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h.

Populações	Temperaturas (°C) ¹								
	10	15	18	20	22	25	28	30	32
PR	*	*	28,9 \pm 0,32 Aa	18,1 \pm 0,52 Bb	15,2 \pm 0,12 Bc	13,5 \pm 0,28 ABd	12,0 \pm 0,42 Ae	10,4 \pm 0,17 BCf	*
SP I	*	*	25,5 \pm 0,30 Ba	18,3 \pm 0,16 ABb	16,5 \pm 0,12 Ac	13,1 \pm 0,15 ABd	11,0 \pm 0,17 Be	10,8 \pm 0,10 ABe	*
SP II	*	*	25,4 \pm 0,27 Ba	18,8 \pm 0,18 ABb	15,0 \pm 0,16 Bc	12,5 \pm 0,13 Bd	11,3 \pm 0,11 Abe	10,4 \pm 0,12 BCf	*
AL	*	*	27,6 \pm 1,20 Aa	19,0 \pm 0,36 ABb	15,2 \pm 0,12 Bc	13,8 \pm 0,34 Ac	10,5 \pm 0,24 Bd	10,2 \pm 0,10 Cd	*
MG	*	*	27,8 \pm 0,21 Aa	19,4 \pm 0,37 Ab	15,2 \pm 0,14 Bc	13,2 \pm 0,17 ABd	11,3 \pm 0,11 Abe	11,0 \pm 0,00 Ae	*

*Não houve desenvolvimento de *Cotesia flavipes*.

¹ Médias seguidas de letras maiúsculas, na coluna, e minúsculas nas linhas não diferem entre si, pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabela 3: Duração (dias) (media \pm erro padrão) da fase de pupa de populações de *Cotesia flavipes* criadas em *Diatraea saccharalis* e submetidas a diferentes temperaturas. Umidade relativa do ar de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h.

Populações	Temperaturas (°C) ¹								
	10	15	18	20	22	25	28	30	32
PR	*	*	18,4 \pm 0,30 Aa	10,4 \pm 0,72 Ab	7,8 \pm 0,14 ABc	6,8 \pm 0,13 Ac	5,1 \pm 0,30 Bd	4,9 \pm 0,19 ABd	*
SP I	*	*	16,5 \pm 0,52 Ba	8,8 \pm 0,26 Bb	7,2 \pm 0,17 Bc	6,5 \pm 0,13 ABc	5,0 \pm 0,16 Bd	5,0 \pm 0,11 ABd	*
SP II	*	*	16,4 \pm 0,28 Ba	10,2 \pm 0,22 ABb	7,9 \pm 0,27 Ac	6,1 \pm 0,08 Bd	5,6 \pm 0,13 ABde	5,2 \pm 0,14 Ae	*
AL	*	*	15,0 \pm 0,14 Ca	10,5 \pm 0,28 Ab	7,8 \pm 0,13 ABc	6,6 \pm 0,21 ABd	5,4 \pm 0,12 ABe	4,4 \pm 0,18 Bf	*
MG	*	*	15,6 \pm 0,25 BCa	11,2 \pm 0,36 Ab	8,2 \pm 0,13 Ac	7,0 \pm 0,13 Ad	5,9 \pm 0,29 Ae	4,5 \pm 0,14 ABf	*

*Não houve desenvolvimento de *Cotesia flavipes*.

¹ Médias seguidas de letras maiúsculas, na coluna, e minúsculas nas linhas não diferem entre si, pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabela 4: Duração (dias) (media \pm erro padrão) do período ovo-adulto de populações de *Cotesia flavipes* criadas em *Diatraea saccharalis* e submetidas a diferentes temperaturas. Umidade relativa do ar de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h.

Populações	Temperaturas (°C) ¹								
	10	15	18	20	22	25	28	30	32
PR	*	*	47,0 \pm 0,34 Aa	28,3 \pm 0,25 BCb	23,0 \pm 0,15 Ac	20,1 \pm 0,20 Ad	16,7 \pm 0,46 Ae	15,0 \pm 0,31 Af	*
SPI	*	*	42,1 \pm 0,48 BCa	27,1 \pm 0,31 Cb	23,6 \pm 0,19 Ac	19,6 \pm 0,13 Ad	15,4 \pm 0,34 Ae	15,8 \pm 0,16 Ae	*
SPII	*	*	41,8 \pm 0,37 Ca	29,0 \pm 0,24 ABb	23,0 \pm 0,22 Ac	18,6 \pm 0,18 Bd	16,9 \pm 0,19 Ae	15,3 \pm 0,32 Af	*
AL	*	*	41,3 \pm 0,61 Ca	28,0 \pm 0,89 BCb	23,4 \pm 0,14 Ac	20,4 \pm 0,43 Ad	16,0 \pm 0,28 Ae	14,6 \pm 0,14 Af	*
MG	*	*	43,4 \pm 0,21Ba	30,6 \pm 0,20 Ab	23,5 \pm 0,15 Ac	20,3 \pm 0,10 Ad	16,1 \pm 1,10 Ae	15,6 \pm 0,14 Ae	*

*Não houve desenvolvimento de *Cotesia flavipes*.

¹ Médias seguidas de letras maiúsculas, na coluna, e minúsculas nas linhas não diferem entre si, pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabela 5: Razão sexual de populações de *Cotesia flavipes* criadas em *Diatraea saccharalis* e submetidas a diferentes temperaturas. Umidade relativa do ar de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h.

Populações	Temperaturas (°C) ¹								
	10	15	18	20	22	25	28	30	32
PR	*	*	0,65 ^{ns}	0,80 ^{ns}	0,43	0,83 ^{ns}	0,64	0,75 ^{ns}	*
SP I	*	*	0,71 ^{ns}	0,64	0,56	0,52	0,58	0,70 ^{ns}	*
SP II	*	*	0,43 ^{ns**}	0,59	0,65 ^{ns}	0,64	0,62	0,71 ^{ns}	*
AL	*	*	0,65 ^{ns}	0,61	0,64 ^{ns}	0,70 ^{ns}	0,70 ^{ns}	0,63	*
MG	*	*	0,70 ^{ns}	0,73 ^{ns}	0,64 ^{ns}	0,77 ^{ns}	0,70 ^{ns}	0,71 ^{ns}	*

*Não houve desenvolvimento de *Cotesia flavipes*.

**Diferiu razão sexual na linha.

^{ns} Não significativo pelo teste do qui-quadrado (χ^2) ($P > 0,05$).

Tabela 6: Limiar térmico inferior de desenvolvimento (Tb), constante térmica (K), equação linear da velocidade de desenvolvimento (1/D) e coeficiente de determinação (R²) do período ovo-pupa, fase de pupa e período ovo-adulto de *Cotesia flavipes*.

Populações	Tb(°C)	K(GD)	Equação de regressão linear	R ²	F	p-valor
Período ovo-pupa						
PR	8,8	219,78	$y = -0,04006 + 0,00455x$	0,94	74,13	0,0001
SP I	8,49	221,72	$y = -0,03832 + 0,00451x$	0,97	165,74	0,0002
SP II	8,41	218,34	$y = -0,03853 + 0,00458x$	0,97	131,62	0,0003
AL	10	197,62	$y = -0,05063 + 0,00506x$	0,97	131,55	0,0003
MG	8,74	221,72	$y = -0,03942 + 0,00451x$	0,95	87,38	0,0007
Fase de pupa						
PR	12,52	82,30	$y = -0,11871 + 0,01215x$	0,96	117,18	0,0004
SP I	10,75	90,57	$y = -0,15215 + 0,01104x$	0,92	52,52	0,0019
SP II	10,98	94,16	$y = -0,11663 + 0,01062x$	0,95	83,78	0,0008
AL	12,42	80,25	$y = -0,15483 + 0,01246x$	0,98	199,13	0,0001
MG	12,41	85,25	$y = -0,14563 + 0,01173x$	0,97	130,24	0,0003
Período ovo-adulto						
PR	10,60	288,18	$y = -0,03681 + 0,00347x$	0,96	123,98	0,0004
SP I	9,74	299,40	$y = -0,03254 + 0,00334x$	0,95	85,44	0,0008
SP II	9,73	301,20	$y = -0,03233 + 0,00332x$	0,97	130,12	0,0003
AL	10,37	284,90	$y = -0,03642 + 0,00351x$	0,98	231,11	0,0001
MG	11,15	273,97	$y = -0,04073 + 0,00365x$	0,98	376,81	0,0001

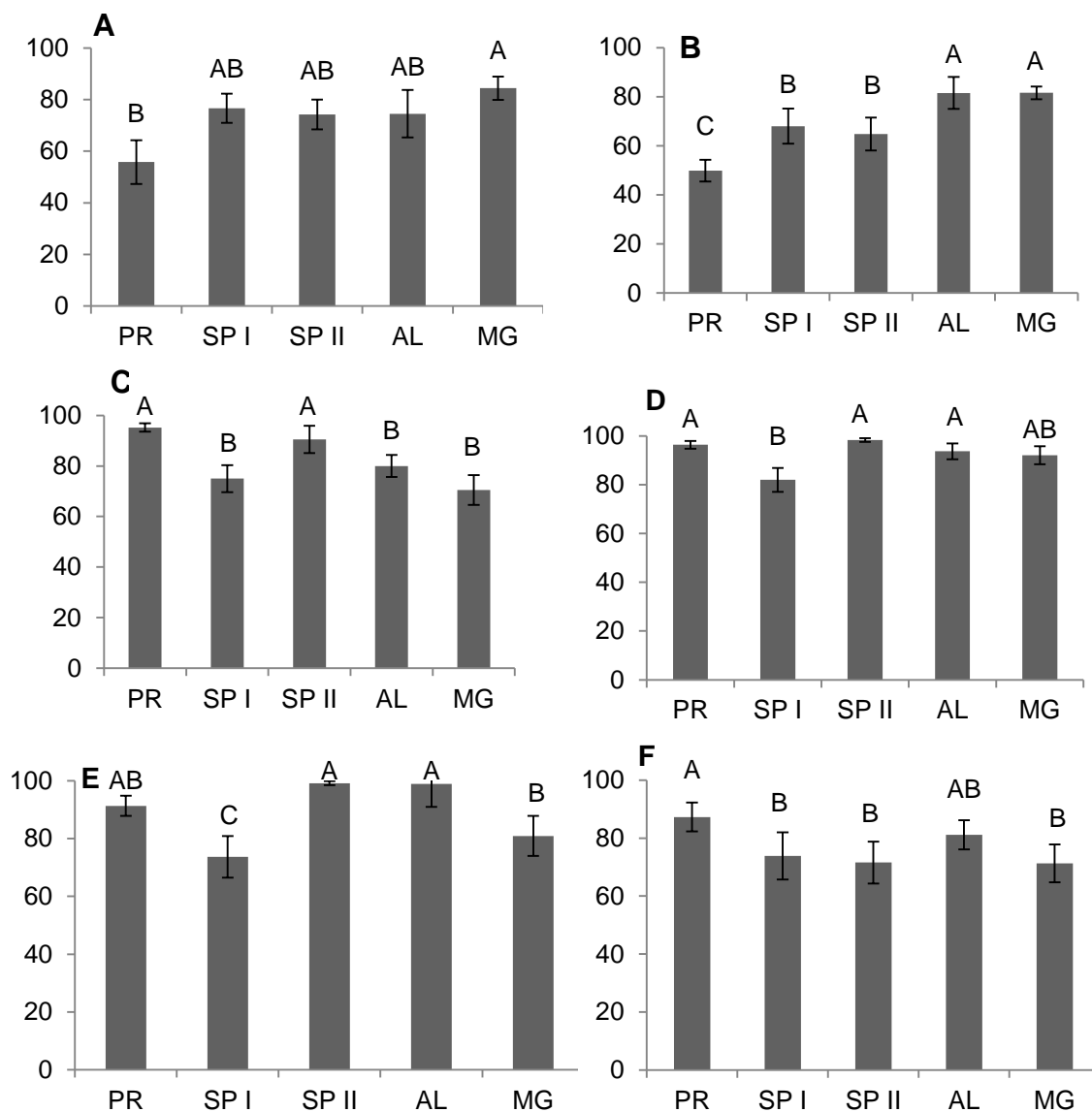


Figura 1: Viabilidade (%) de pupas de cinco populações de *Cotesia flavipes* criadas em *Diatraea saccharalis* em diferentes temperaturas (A - 18°C; B - 20°C; C - 22°C; D - 25°C; E - 28°C e F - 30°C). Umidade relativa do ar de 70 ± 10% e fotofase de 12h. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey (P ≤ 0,05).

Artigo 2 - Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB)

3. Artigo 2 - Diversidade genética de populações de *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) no Brasil

Giovani Smaniotto¹ Roberta Manica Berto² e Dori Edson Nava²

¹ Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Avenida Eliseu Maciel s/n, 96010-900, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: giovanismaniotto@hotmail.com

² Embrapa Clima Temperado, BR 392, KM 78, Caixa Postal 403, CEP 96001-970, Pelotas, RS. Brasil. E-mail: robertamanica@yahoo.com; dori.edson-nava@embrapa.br

Resumo – Espécies pertencentes ao complexo monofilético *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) são endoparasitoide gregários que são utilizados com sucesso pelo mundo para o controle de lepidópteros praga. *C. flavipes* foi introduzida em mais de 40 países para esta finalidade, no Brasil teve sua introdução no ano de 1974 no estado de Alagoas. É de conhecimento que ocorrem espécies crípticas em vespas parasitoides além de variações intraespecíficas em relação ao hospedeiro, representando uma baixa eficiência do sucesso do controle biológico. Assim, o presente trabalho teve como objetivo de identificar a diversidade genética de oito populações de *C. flavipes* de diferentes locais do Brasil utilizando para isso análise combinada de dois genes. As populações foram oriundas dos estados do Paraná, Goiás, Minas Gerais, Paraíba, Alagoas, Pernambuco e São Paulo - população 1 (SPI), população 2 (SPII). A armazenagem dos insetos foi feita em álcool 95% e preservadas a -20°C. O DNA genômico foi extraído do inseto segundo protocolo Dneasy Blood & Tissue (Qiagen, Valencia, CA, EUA). Os genes utilizados para o estudo foram mt 16S rDNA e n28S rDNA. Reações em cadeia

da polimerase (PCR) foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. As populações se dividiram em três grupos aonde o primeiro grupo é composto pelas populações de GO, PR, SPI e SPII, o segundo formado pela população de MG e o terceiro por AL, PB e PE. Assim as populações mostram diferença entre si de acordo com a sua região de origem.

Palavras chave: Controle biológico, Biologia molecular, reações em cadeia da polimerase (PCR), DNA genômico.

Abstract

Genetic diversity of populations *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) in Brazil: pooled analysis of two genes

Species belonging to the monophyly complex *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) are gregarious endoparasitoid that have been used successfully around the world for the control of lepidopteran pests. *Cotesia flavipes* has been introduced in more than 40 countries for this finality, Brazil had its introduction in the year of 1974 in the state of Alagoas. It is known that cryptic species occurs in parasitoid wasps in addition to interspecific variations in relation to the host organism, representing a low efficiency of success of biological control. Thus the present study aims to evaluate the diversity of eight populations of *C. flavipes* from different parts of Brazil using combined analysis of two genes to that end. The population were native from the states of Parana, Goias, Minas Gerais, Paraíba, Alagoas, Pernambuco and Sao Paulo - population 1 (SPI), Sao Paulo - population 2 (SPII). The storage of insects was done in 95% ethanol and preserved at -20°C. The genomic DNA was extracted from the insect according to DNeasy Blood & Tissue protocol (Qiagen, Valencia, CA, USA). The genes used for the study were mt 16S rDNA and rDNA n28S. Polymerase chain reactions (PCR) were performed in a thermal cyclor Eppendorf Mastercycler Gradient. The population were divided into three groups where the first group is composed by populations of GO, PR, SPI and SPII, the second by populations of MG and the third for AL, PB and PE. Thereby populations show differences between them according to their region of origin.

Key words: Biological control, molecular biology, polymerase chain reactions (PCR), genomic DNA.

3.1 Introdução

As espécies pertencentes ao complexo monofilético *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) são endoparasitoide gregários de brocas do colmo e foram implementadas com sucesso em programas de controle biológico pelo mundo. Esse complexo compreende quatro espécies irmãs alopátricas (Kimani-Njogu & Overholt, 1997; Muirhead et al., 2006, 2008, 2010, 2012): *Cotesia flavipes* (Cameron 1891), *Cotesia sesamiae* (Cameron, 1906) e *Cotesia chilonis* (Matsumura, 1912) as quais são morfologicamente semelhantes. Recentemente, a quarta espécie, *C. nonagriae* (Olliff, 1893) foi separada taxonomicamente de *C. flavipes* (Muirhead et al., 2008).

Cotesia flavipes foi importada para mais de 40 países desde 1950 para o controle biológico de espécies de broca do colmo de lepidópteros das famílias Crambidae, Pyralidae e Noctuidae. No Brasil é utilizada no controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera, Crambidae) e foi introduzida em 1971 por importações de Trinidad e Tobago realizadas pela Esalq/USP e COPERSUCAR. Porém, apenas em 1974 iniciou-se a criação massal e as liberações (Gallo et al., 2002). Em 1978, linhagens adicionais foram trazidas da Índia e do Paquistão (Macedo, 1978). Após essas datas não foram mais realizadas novas introduções, dessa forma, não se conhece a variação genética entre as populações do endoparasitoide no país.

A variação genética dentro e entre espécies do complexo *C. flavipes* foi investigada usando eletroforese de aloenzimas (Kimani-Njogu et al., 1998) e dados de limitadas sequências de DNA (Smith & Kambhampati, 1999;

Muirhead et al., 2006, 2012). Os estudos têm demonstrado monofiletismo do complexo, porém ocorrem variações na literatura quanto às relações dentro do complexo (Michel-Salzat & Whitfield, 2004; Muirhead et al., 2006; Smith & Kambhampati, 1999), isto deve-se a informações moleculares insuficientes, limitada amostragem de táxons, ou ambos. Recentemente, estudos preliminares sobre restrito número de amostras têm relatado alta variação intraespecífica de mt DNA entre populações geográficas de *C. flavipes* e *C. sesamiae* (Muirhead et al., 2006, 2008).

Em vespas parasitoides, a ocorrência de espécies crípticas (Kazmer et al., 1996; Molbo et al., 2003; Heraty et al., 2007) e a variação intraespecífica em relação ao hospedeiro (Alleyne & Wiedenmann, 2001; Dupas et al., 2008; Mochiah et al., 2001; Ngi-Song et al., 1995,1998) estão bem documentados e sem dúvida representam a causa subjacente para baixas taxas de sucesso em alguns programas de controle biológico. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética entre populações de *C. flavipes* oriundas de oito localidades do Brasil utilizando para isso análise combinada de dois genes.

3.2 Material e Métodos

As populações de *C. flavipes* utilizadas no presente estudo são originárias de oito localidades do Brasil: Paraná (PR), Goiás (GO), Minas Gerais (MG), Paraíba (PB), Alagoas (AL), Pernambuco (PE), São Paulo - população 1 (SPI), São Paulo - população 2 (SPII) (Tabela 1).

Todos os insetos foram armazenados em etanol a 95% e preservadas à temperatura de -20°C até a extração do DNA. O DNA genômico total foi

extraído de vespas inteiras de acordo com o protocolo fornecido pelo kit Dneasy Blood & Tissue (Qiagen, Valencia, CA, EUA). A quantificação do DNA das amostras foi feita em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, EUA).

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Hamburgo) e cada reação foi composta de 1 μ M de ambos os oligonucleotídeos iniciadores (sense e antisense), 50 μ L de GoTaqTM Green Master Mix, 2x (PromegaTM), 100 ng de DNA genômico e água isenta de nuclease até completar o volume de 100 μ L. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 3 min, 35 ciclos de 94°C durante 60 seg, anelamento a 55°C durante 60 seg, extensão a 72°C durante 60 seg e extensão final a 72°C durante 10 min. As temperaturas de anelamento foram ajustadas dependendo dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para cada gene. O mt 16S rDNA parcial foi amplificado utilizando os iniciadores 16SWb - sense (5'-CACCTGTTTATCAAAAACAT-3') (Dowton e Austin, 1994) e 16S antisense (5'-CTTATTCAACATCGAGGTC-3') (Whitfield, 1997), com temperatura de anelamento a 52°C. O fragmento amplificado de \approx 500 pb corresponde à extremidade 3' do gene. Fragmento de aproximadamente 700 pb do n28S rDNA foi amplificado com os iniciadores designados por Mardulyn e Whitfield (1999) (28S - sense: 5'-AAGAGAGAGTTCAAGAGTACGTG-3' e 28S-PM - antisense: 5'-TAGTTCACCATCTTTTCGGGTCCC-3'), com temperatura de anelamento de 62,4°C. Os produtos de PCR foram purificados usando o PureLinkTM Quick Gel Extraction e PCR Purification Combo Kit (InvitrogenTM -

USA), e sequenciados com ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Os dados brutos obtidos do sequenciador automático ABI foram inicialmente analisados no programa BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), a fim de se confirmar o gene sequenciado e a espécie. Cada sequência foi também analisada individualmente pelo Chromas Lite versão 2.1.1 (Technelysium 1998 – 2012), que fornece o “*base-calling*”, onde é possível avaliar a qualidade dos cromatogramas gerados pelo sequenciador automático, sendo considerado apenas um valor de Phred acima de 30. Os alinhamentos das sequências e a obtenção da sequência consenso foram realizados com o software de alinhamento múltiplo ClustalW (Thompson et al., 1994) e Contig Assembly Program (CAP) (Huang, 1992), dentro do pacote de programas BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9 (Hall, 1999). No BioEdit, quando necessário, foi realizada a edição manual do alinhamento dos genes sequenciados.

As análises filogenéticas foram realizadas no software MEGA versão 5.0 (Tamura et al., 2011), utilizando o método probabilístico de Máxima Verossimilhança (Saitou & Nei, 1987) implementado no programa. A consistência dos padrões de agrupamento na árvore foi avaliada através do método de bootstrap com 1000 réplicas.

3.3 Resultados e Discussão

A árvore filogenética foi apoiada por valores de *bootstrap* entre 20 a 60% que possibilitaram a confirmação dos agrupamentos a partir da análise combinada de dois genes, mt 16S rDNA e n28S rDNA. O primeiro grupo foi

composto pelas populações de GO, PR, SPI e SPII. O segundo somente por MG e o terceiro por AL, PB e PE (Figura 1)

Os primeiros indícios que haveria uma possível ocorrência de espécies crípticas e estirpes adaptadas a diferentes culturas e hospedeiros, devido à distribuição descontínua de *C. flavipes* foi feita por Mohyuddin (1971). A prova de que *C. flavipes* tem estirpes adaptadas a habitat específico foi relatado pela introdução de *C. flavipes* no Paquistão em 1962, nas culturas de cana-de-açúcar, arroz e milho. A introdução de estirpes adaptadas a cana-de-açúcar na Tailândia, Indonésia e Barbados, resultaram na criação do parasitoide da cana-de-açúcar (Mohyuddin et al., 1981; Mohyuddin, 1990; Shami e Mohyuddin, 1992). Também, há relatos de diferentes populações de *C. flavipes* variando suas preferências a partir dos excrementos produzidos pelos hospedeiros, cana-de-açúcar ou milho, e que essas preferências podem ser comutadas através de seleção artificial em cinco gerações (Shami e Mohyuddin, 1992). Vários autores têm registrado variações na ecologia e no comportamento de busca pelos hospedeiros de populações de diferentes áreas geográficas do complexo *C. flavipes*, sugerindo a existência de biótipos associados a hospedeiros e/ou plantas (Inayatullah, 1983; Mochiah et al., 2001; Mohyuddin, 1971; Mohyuddin et al., 1981; Ngi-Song et al., 1995, 1998; Polaszek e Walker, 1991; Rutledge e Wiendenmann, 1999).

Nessa pesquisa, todas as populações possuem o mesmo hospedeiro e a mesma cultura, *D. saccharalis* e cana-de-açúcar respectivamente, assim os fatores alimentação e hospedeiro não influenciaram na separação das populações sendo à altitude e a posição geográfica de cada localidade, que possivelmente criou um isolamento geográfico para cada população

diferenciando-as e/ou agrupando-as. Dentro do grupo I ocorreu uma subdivisão em dois subgrupos em que GO e PR foram mais próximos e formaram um subgrupo, e SPI e SPII formaram o outro subgrupo. O segundo grupo foi composto somente por MG e foi mais semelhante a todos os componentes do grupo I e mais distante geneticamente do grupo III (Figura 1 e Tabela 1). A presença de populações geneticamente diferentes tanto dentro do grupo I quanto entre os grupos I e II, foram influenciadas por padrão geográfico dentro do país, que coevoluiu ao longo dos anos. O terceiro grupo foi formado por dois subgrupos, o primeiro composto por PB e PE, e o segundo subgrupo, formado somente por AL.

Por apresentar importância econômica e biológica como agente de controle, muito pouco se sabe sobre a diversidade genética e filogeográfica de *C. flavipes*. A estrutura genética é provável que seja influenciada, principalmente, pelo padrão biogeográfico e também, pela história coevolutiva entre parasitoide e hospedeiro. Potting et al. (1997a), demonstraram que adultos de *C. flavipes* não tem capacidade de reconhecimento imediato de diferentes ambientes hospedeiro/planta. Indicando assim, que diferenças entre populações de *C. flavipes* não foram devidas ao comportamento de seleção do hospedeiro/planta entre as estirpes, mas pela variação geográfica na compatibilidade fisiológica parasitoide/hospedeiro e do sucesso reprodutivo (Wiedenmann e Smith, 1995; Potting et al., 1997b).

A capacidade de distinguir espécies crípticas, populações e as relações entre eles são importantes em programas de controle biológico. A descoberta de várias populações geneticamente distintas neste estudo deve facilitar a exploração para a coevolução de compatibilidade hospedeiro/parasitoide.

Portanto os resultados obtidos neste estudo poderão ajudar a escolher populações de *C. flavipes* para liberações a campo a fim de controle de *D. saccharalis* assim como servira de base para desenvolver mais estudos nesta área deficiente em informações para a espécie.

3.4 Referencia bibliográfica

ALLEYNE, M.; WIEDENMANN, R.N. Suitability of lepidoptera stemborers for parasitization by novel-association endoparasitoids. **BioControl**, v. 46, n. 1, p. 1-23, 2001.

DOWTON, M.; AUSTIN, A.D. Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: Apocritan relationships. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 21, p. 9911-9915, 1994.

DUPAS, S.; GITAU, C.; BRANCA, A.; LE RU, B.; SILVAIN, J.F. Evolution of a polydnavirus gene in relation to parasitoid–host species immune resistance. **Journal of Heredity**, v. 99, n. 5, p. 491-499, 2008.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. Entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. 1999. p. 95-98

HERATY, J.M.; WOOLLEY, J.B.; HOPPER, K.R.; HAWKS, D.L.; KIM, J.W.; BUFFINGTON, M. Molecular phylogenetic and reproductive incompatibility in a complex of cryptic species of aphid parasitoids. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 45, n. 2, p. 480-493, 2007.

HUANG, X. A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. **Genomics**, v. 14, n. 1, p. 18-25, 1992.

KAZMER, D.J.; MAIDEN, K.; RAMUALDE, N.; COUTINOT, D.; HOPPER, K.R. Reproductive compatibility, mating behavior, and random amplified polymorphic DNA variability in some *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae) derived from the Old World. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 89, n. 2, p. 212-220, 1996.

KIMANI-NJOGU, S. W.; OVERHOLT W.A. Biosystematics of the *Cotesia flavipes* species complex (Hymenoptera: Braconidae), parasitoids of the gramineous stemborers. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 17, n. 01, p. 119-130, 1997.

KIMANI-NJOGU, S.W.; OVERHOLT, W.A.; WOOLLEY, J. B.; OMWEGA, C.O. Electrophoretic and phylogenetic analyses of selected allopatric populations of the *Cotesia flavipes* complex (Hymenoptera: Braconidae), parasitoids of cereal stemborers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, n. 3, p. 285-296, 1998.

MACEDO, N. New strain of *Apanteles flavipes* was imported to increase its adaptative potential in the Southern Brazil. **Entomological News**, v. 4, p. 11-12, 1978.

MARDULYN, P.; WHITFIELD, J.B. Phylogenetic signal in the COI, 16S, and 28S genes for inferring relationships among genera of Microgastrinae (Hymenoptera; Braconidae): evidence of a high diversification rate in this group of parasitoids. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 12, n. 3, p. 282-294, 1999.

MICHEL-SALZAT, A.; WHITFIELD, J.B. Preliminary evolutionary relationships within the parasitoid wasp genus *Cotesia* (Hymenoptera: Braconidae: Microgastrinae): combined analysis of four genes. **Systematic Entomology**, v. 29, n. 3, p. 371-382, 2004.

MOCHIAH, M.B.; NGI-SONG, A.J.; OVERHOLT, W.A.; BOTCHEY, M. Host suitability of four cereal stem borers (Lepidoptera: Crambidae, Noctuidae) for different geographic populations of *Cotesia sesamiae* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) in Kenya. **Biological Control**, v. 21, n. 3, p. 285-292, 2001.

MOHYUDDIN, A. I. Biological control of *Chilo* spp. in maize, sorghum and millet. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 11, n. 4-5, p. 719-732, 1990.

MOHYUDDIN, A. I. Comparative biology and ecology of *Apanteles flavipes* (Cam.) and *A. sesamiae* Cam. as parasites of graminaceous borers. **Bulletin of Entomological Research**, v. 61, n. 01, p. 33-40, 1971.

MOHYUDDIN, A. I.; INAYATULLAH, C.; KING, E. G. Host selection and strain occurrence in *Apanteles flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) and its bearing on biological control of graminaceous stem-borers (Lepidoptera: Pyralidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 71, n. 04, p. 575-581, 1981.

MOLBO, D.; MACHADO, C.A.; SEVENSTER, J.G.; KELLER, L.; HERRE, E.A. Cryptic species of fig-pollinating wasps: implications for the evolution of the fig-wasp mutualism, sex allocation, and precision of adaptation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 10, p. 5867-5872, 2003.

MUIRHEAD, K.; AUSTIN, A.; SALLAM, M. The systematics and biology of *Cotesia nonagriæ* (Olliff) stat. rev. (Hymenoptera: Braconidae: Microgastrinae), a newly recognized member of the *Cotesia flavipes* species complex. **Zootaxa**, v. 1846, p. 35-46, 2008.

MUIRHEAD, K.A.; MURPHY, N.P.; SALLAM, M.N.; DONNELLAN, S.C.; AUSTIN, A.D. Mitochondrial DNA phylogeography of the *Cotesia flavipes* complex of parasitic wasps (Hymenoptera: Braconidae). In: **Annales de la Société Entomologique de France**. v.xx p. 309-318. 2006.

MUIRHEAD, K.A.; MURPHY, N.P.; SALLAM, N.; DONNELLAN, S.C.; AUSTIN, A.D. Phylogenetics and genetic diversity of the *Cotesia flavipes* complex of parasitoid wasps (Hymenoptera: Braconidae), biological control agents of lepidopteran stemborers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 63, n. 3, p. 904-914, 2012.

MUIRHEAD, K.A.; SALLAM, N.; AUSTIN, A.D. Life history traits and foraging behaviour of *Cotesia nonagriæ* (Olliff) (Hymenoptera: Braconidae), a newly recognised member of the *Cotesia flavipes* complex of stemborer parasitoids. **Australian Journal of Entomology**, v. 49, n. 1, p. 56-65, 2010.

NGI-SONG, A.J.; OVERHOLT, W.A.; AYERTEY, J.N. Suitability of African gramineous stemborers for development of *Cotesia flavipes* and *Cotesia sesamiae* (Hymenoptera: Braconidae). **Environmental Entomology**, v. 24, n. 4, p. 978-984, 1995.

NGI-SONG, A.J.; OVERHOLT, W.A.; STOUTHAMER, R. Suitability of *Busseola fusca* and *Sesamia calamistis* (Lepidoptera: Noctuidae) for the development of two populations of *Cotesia sesamiae* (Hymenoptera: Braconidae) in Kenya. **Biological Control**, v. 12, n. 3, p. 208-214, 1998.

POLASZEK, A.; WALKER, A.K. The *Cotesia flavipes* species-complex: parasitoids of cereal stem borers in the tropics. **Redia**, v. 74, n. 3, p. 335-341, 1991.

POTTING R.P.J.; OTTEN H.; VET L.E.M. The relation between parasitoid ecology and learning: absence of learning in the stem borer parasitoid *Cotesia flavipes*. **Animal Behaviour**. v. 53, p. 1211-1223. 1997a

POTTING, R.P.J.; VET, L.E.M.; OVERHOLT, W.A. Geographic variation in host selection behaviour and reproductive success in the stemborer parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 87, n. 5, p. 515-524, 1997b.

RUTLEDGE, C.E.; WIEDENMANN, R.N. Habitat preferences of three congeneric braconid parasitoids: implications for host-range testing in biological control. **Biological control**, v. 16, n. 2, p. 144-154, 1999.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SHAMI, S.; MOHYUDDIN, A.I. Studies on host plant preference of *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) an important parasitoid of graminaceous stalk borers. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 24, n. 4, p. 313-316, 1992.

SMITH, P.T.; KAMBHAMPATI, S. Status of the *Cotesia flavipes* species complex (Braconidae: Microgasterinae) based on mitochondrial 16S rRNA and NADH 1 dehydrogenase gene sequence. **Journal of the Kansas Entomological Society**, p. 306-314, 1999.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

THOMPSON, J.; HIGGINS, D.; GIBSON, T.; CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-80, 1994.

WHITFIELD, J.B. Molecular and morphological data suggest a single origin of the polydnviruses among braconid wasps. **Naturwissenschaften**, v. 84, n. 11, p. 502-507, 1997.

WIEDENMANN R.N.; SMITH J.W.J. Parasitization of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) by *Cotesia chilonis* and *C. flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Environmental Entomology**, v. 24, n. 4, p. 950-961, 1995.

Tabela 1: Populações de *Cotesia flavipes* utilizadas nos experimentos com seus dados de origem

População	Cidade	Estado	Coordenadas geográficas	Alt.	Origem
1AL	Maceió	Alagoas (AL)	9°38'07"S; 36°12'16" O	7 m	Laboratório
1PR	Bandeirantes	Paraná (PR)	23°06'36"S; 50°22'04" O	381 m	Campo
1MG	Serra dos Aimorés	Minas Gerais (MG)	17°46'58"S; 40°14'52" O	615 m	Laboratório
1SP	Sertãozinho	São Paulo (SP)	21°08'16"S; 48°58'22" O	579 m	Laboratório
2SP	Américo Brasiliense	São Paulo (SP)	21°43'26"S; 48°06'07" O	280 m	Laboratório
1GO	Goianésia	Goiás (GO)	15°19'03"S; 49°07'03" O	640 m	Laboratório
1PE	Recife	Pernambuco (PE)	08°03'14"S; 34°25'52" O	4 m	Laboratório
1PB	Mamanguape	Paraíba (PB)	06°50'19"S; 35°07'34" O	35 m	Laboratório

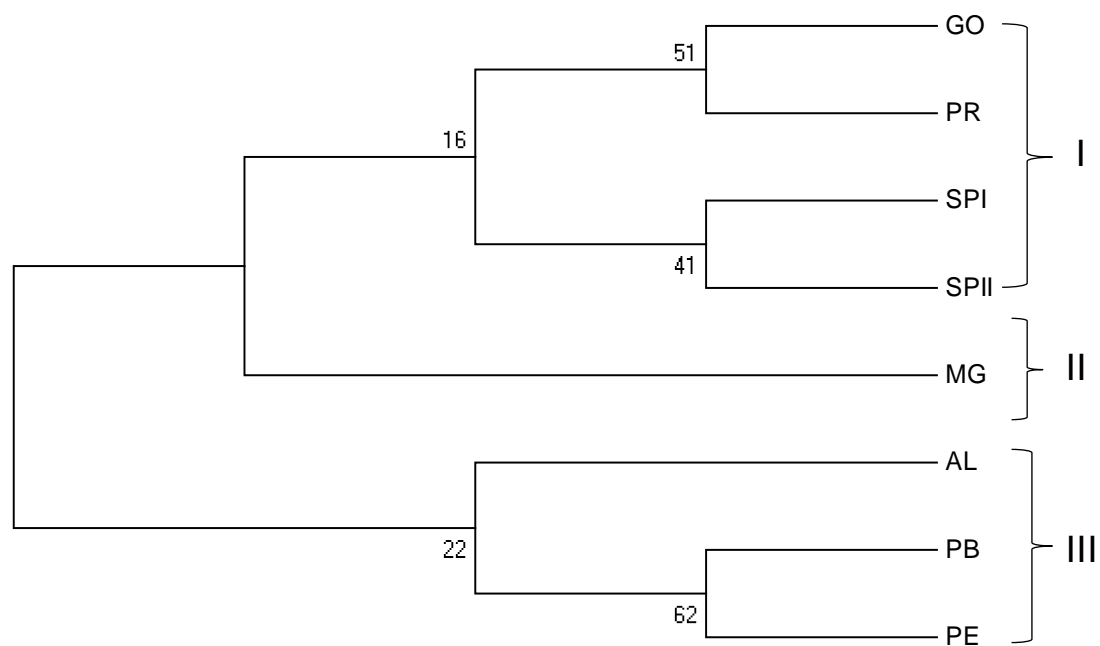


Figura 1: Árvore filogenética construída pelo método probabilístico de Máxima Verossimilhança a partir da análise dos dados combinados dos genes mt 16S rDNA e n28S rDNA para oito populações de *Cotesia flavipes*, com valores de *bootstrap* (1.000 réplicas).

Conclusão

As populações de *C. flavipes* apresentam variabilidade quanto às temperaturas testadas. A maior variabilidade observada foi nas temperaturas 18 e 20°C apresentando a maior diferença na duração (dias) do período de ovo-pupa, fase de pupa e período ovo-adulto.

Nas temperaturas de 10, 15 e 32°C não houve desenvolvimento de *C. flavipes* indicando que o limite térmico superior seja próximo a 32°C e o inferior próximo a 18°C.

A temperatura base estimada para o período ovo-adulto ficou entre 9,73 e 11,15°C para as populações de SPII e MG, respectivamente, com constante térmica de 301,2 e 273,97 graus-dias.

Quanto a viabilidade de pupa, a maior porcentagem de emergências foi obtida nas temperaturas entre 25° e 30°C.

A faixa de temperatura entre 18 e 30°C as populações apresentaram desenvolvimento, sendo 25 a 30°C uma faixa ideal de desenvolvimento.

A razão sexual apresentou-se mais uniforme nas temperaturas de 25 a 30°C.

As populações de *C. flavipes* avaliadas mostraram variabilidade nos parâmetros biológicos quando expostas a diferentes temperaturas, de maneiras que as exigências térmicas também foram variáveis.

Com as análises dos genes foi observado que existe uma variabilidade genética e que as populações se dividiram em três grupos que auxiliaram na escolha de uma população para liberação em determinada área.

4. Referencia Bibliográfica

ANGILLETTA, M.J. Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis. **Oxford: Oxford University Press**. p. 289, 2009.

BENEDINI, M.S. Controle Biológico de pragas na cana-de-açúcar. In: MARQUES, M.O.; MUTTON, M.A.; AZANIA, A.A.P.M.; TASSO JR, L.C.; NOGUEIRA, G.A.; VALE, D.W. (Eds.). Tópicos em tecnologia sucroalcooleira. **Jaboticabal, Multipress Ltda**, p. 101-120, 2006.

BREWER, F.D.; KING, E.G. Food consumption and utilization by sugarcane borers parasitized by *Apanteles flavipes*. **Journal Georgia Entomological Society** v. 16, p. 181-185, 1981.

BUSATO, G.R.; GRÜTZMACHER, A.D.; OLIVEIRA, A.C.D.; VIEIRA, E.A.; ZIMMER, P.D.; KOPP, M.M.; MAGALHÃES, T.R. Analysis of the molecular structure and diversity of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to the corn and rice crops in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina PR. v. 33, n. 6, p. 709-716, 2004.

CAMPOS-FARINHA, A.E.C. **Biologia reprodutiva de *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae)**. Rio Claro, p. 97. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 1996. CAMPOS-FARINHA, A.E.C. Biologia reprodutiva de *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). (Tese de Doutorado). **Unesp**, p. 97, 1996.

Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB
www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_06_11_09_00_38_boletim_graos_junho_2015.pdf. Acesso em 20 de Set. 2015.

DEUTSCH, C.A.; TEWKSBURY, J.J.; HUEY, R.B.; SHELDON, K.S.; GHALAMBOR, C.K.; HAAK, D.C.; MARTIN, P.R. Impacts of climate warming on terrestrial ectoderms across latitude. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 18, p. 6668-6672, 2008.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; FRACASSO, J.V.; COSTA, V.P.D.; LOPES, D.O.T. Dispersal of *Cotesia flavipes* in sugarcane field and implications for parasitoid releases. **Bragantia**, v. 73, n. 2, p. 163-170, 2014.

EMANA, G.D. Comparative studies of the influence of relative humidity and temperature on the longevity and fecundity of the parasitoid, *Cotesia flavipes*. **Journal of Insect Science**, v. 7, n. 1, p. 19, 2007.

FERREIRA, E. Pragas e seu controle. In N.R. DE A. VIEIRA, A.B. DOS SANTOS & E.P. SANT'ANA. A cultura do arroz no Brasil. **Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás**. p. 197-26, 1999.

FERREIRA, E.F.; BRESEGHELLO, F.; CASTRO, E.D.M. BARRIGOSI, J.A.F. Broca-do-colmo nos agroecossistemas de arroz do Brasil. **Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás**. p. 42 Documentos, 2001.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Cana-de-açúcar. In: **Agrianual 2015**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, p. 201-230, 2015.

FONTES, F.H.M.; COLOMBO, C.A.; LOURENÇÃO, A.L. Caracterização molecular e divergência genética de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) em diferentes culturas e locais de cultivo. **Neotropical Entomology**, Londrina. v. 39, n. 2, p. 221-226, 2010.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, p. 920, 2002,

GUAGLIUMI, P. Pragas da cana-de-açúcar: Nordeste do Brasil. Rio de Janeiro: **Instituto do Açúcar e do Alcool**. p. 622 1972/73.

HAYWARD, K.J. A broca da cana-de-açúcar. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v.22, n. 11, p. 69 - 74, 1943.

HIRAGI, C.O.; SIMÕES, K.C.C.; MARTINS, E.S.; DA SILVA, P.R.Q.; LIMA, L.H.C., SOLON DE PONTES, R.G.M. Variabilidade genética de populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera, Culicidae) utilizando marcadores RAPD. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 4, p.1- 6 2009.

INAYATULLAH, C. Host selection by *Apanteles flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae): influence of host and host plant. **Journal of Economic Entomology**, v. 76, n. 5, p. 1086-1087, 1983.

INGRAM, K. W.; BYNUM, E. K. The sugarcane borer. **Washington**: USDA, p. 17, 1984.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Banco de Dados Agregados, Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. 2010. Disponível em:
 <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1612&z=t&o=1&i=P>> e
 <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200902_4.shtm>. Acesso em: 20 set. 2015.

JIANG, N.; SÉTAMOU, M.; NGI-SONG, A.J.; OMWEGA, C.O. Performance of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) in parasitizing *Chilo partellus* (Lepidoptera: Crambidae) as affected by temperature and host stage. **Biological Control**, v. 31, n. 2, p. 155-164, 2004.

LARA, F.M.; BARBOSA, G.C.; BARBOSA, J.C. Danos acarretados por *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) na produção de sorgo granífero. **Científica**, v. 8, n. 1, 1980.

LEERDAM, M.B.; SMITH, J.W.; FUNCHT, T.W. Frass-mediated, host finding behavior of *Cotesia flavipes*, a Braconidae parasite of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Annals of the Entomological Society of America**. v. 78, p. 647-650. 1986

LIMA FILHO, M; LIMA, J.O.G. Massas de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Pyralidae) em cana-de-açúcar: número de ovos e porcentagem de parasitismo por *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em condições naturais. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 483-488, 2001.

LONG, W.H.; HENSLEY, S.D. Insect pests of sugar cane. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 17, p.149-176,1972.

MACEDO, N. Controle biológico da broca *Diatraea saccharalis* e outras pragas da cana-de-açúcar. 2004. Disponível em: <<http://www.proex.ufscar.br/textos/controlbio.doc>>.

MACEDO, N. New strain of *Apanteles flavipes* was imported to increase its adaptative potential in the Southern Brazil. **Entomology News**, v. 4, p. 11-12, 1978.

MACEDO, N.; ARAÚJO, J.R. Controle biológico da broca da cana-de-açúcar, **IAA/Planalsucar**: Piracicaba, p. 24, 2000.

MACEDO, N.; BOTELHO, P.S.M. Controle integrado da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera, Pyralidae). **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v.162, n. 2, p. 2-11, 1988.

MELLO, A.B.P.; PARRA, J.R.P. Exigências térmicas e estimativas de gerações anuais da broca da cana-de-açúcar em quatro localidades canavieiras de São Paulo. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 691-696, 1988.

MENDONÇA, A.F. Guia das principais pragas da cana-de-açúcar, In A.F. MENDONÇA (ed.), **Pragas da cana-de-açúcar**. Maceió, Insetos & Cia, p. 3-48, 1996.

MOHYUDDIN A.I.; INAYATULLAH C.; KING E.G. Host selection and strain occurrence in *Apanteles flavipes* (Camerron) (Hymenoptera: Braconidae) and

its bearing on biological control of graminaceous stem-borers (Lepidoptera: Pyralidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 7, p. 575-581, 1981.

MUIRHEAD, K.A.; MURPHY, N.P.; SALLAM, N.; DONNELLAN, S.C.; AUSTIN, A.D. Phylogenetics and genetic diversity of the *Cotesia flavipes* complex of parasitoid wasps (Hymenoptera: Braconidae), biological control agents of lepidopteran stemborers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 63, n. 3, p. 904-914, 2012.

MULLIS, K.; FALOONA, R.; SCHARF S.; SAIKI R.; HORN G.; ERLICH H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**. v. 51, p. 263–273, 1986.

OVERHOLT W.A. Biological Control, in: POLASZEK A. (ed.), **African Cereal Stem Borers: Economic Importance, Taxonomy, Natural Enemies and Control**. CAB International, Wallingford. p. 349-362 1998.

OVERHOLT, W.A.; OCHIENG, J.O.; LAMERS, P.; OGEDAH, K. Rearing and field release methods for *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of tropical gramineous stemborers. **Insect Science and its Application** v. 15, n.3, p.253-59, 1994.

PÁDUA, L.E.M.; PARRA, J.R.P.; HADDAD, M.L. Efeito da temperatura e umidade relativa do ar na biologia de *Cotesia flavipes* (Cameron). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 23, n. 1, p. 105-114, 1994.

PINTO, A.S. O controle biológico de pragas da cana-de-açúcar. In **Controle de pragas da cana-de-açúcar**. Boletim Técnico Biocontrol, In: PINTO, A.S. Ed. **Biocontrol**. Sertãozinho, v.1, p. 09-13, 2006.

PINTO, A.S.; GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.M. Controle biológico de pragas da cana-de-açúcar. In: PINTO, A.S.; NAVA, D.E.; ROSSI, M.M.; MALERBO-SOUZA, D.T. (Eds). **Controle Biológico de Pragas na Prática**. Piracicaba, p. 287, 2006.

POLASZEK A.; WALKER A.K. The *Cotesia flavipes* species-complex: parasitoids of cereal stem borers in the tropics. **Redia**. v.74 p.335-341,1991.

QUEIROZ, P.R.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.; LIMA, L.; MONNERAT, R. Identificação de populações de insetos-praga utilizando marcadores moleculares RAPD. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, 2007.

REAY-JONES, F.P.F.; AKBAR, W.; ALLISTER, C.D.; REAGAN, T.E.; OTTEA, J.A. Reduced susceptibility to tebufenozide in populations of the sugarcane

borer (Lepidoptera: Crambidae) in Louisiana. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 98, n. 3, p. 955-960, 2005

ROEHRDANZ, R.L.; REED, D.K.; BURTON, R.L. Use of polymerase chain reaction and arbitrary primers to distinguish laboratory - raised colonies of parasitic Hymenoptera. **Biological Control**. v.3, p.199–206, 1994.

SAIKI, R.; SCHARF, S.; FALOONA, R.; MULLIS.; HORN, G.; ERLICH, H.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of betaglobulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. **Science** v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** v. 239, p. 487–491, 1988.

SHAMI, S.; MOHYUDDIN, A.I. Studies on host plant preference of *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) an important parasitoid of graminaceous stalk borers. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 24, n. 4, p. 313-316, 1992.

SILVA, S. D. dos A. Ensaio de variedades de cana-de-açúcar Pelotas/RS, safra 2007/08. In: **SIMPÓSIO ESTADUAL DE AGROENERGIA; REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DE AGROENERGIA-RS**, 2008, 2. Porto Alegre. Anais. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 1 CD-ROM.

TRAUGOTT, M.; ZANGERL, P.; JUEN, A; SCHALLHART, N.; PFIFFNER, L.; Detecting key parasitoids of lepidopteran pests by multiplex PCR. **Biological Control** v. 39, p. 39–46, 2006.

VERISSIMO, M. A. A. **Desempenho agrônômico de genótipos de cana-de-açúcar no estado do Rio Grande do Sul**. 2012. Dissertação (Dissertação em Ciências área do conhecimento: Fitotecnia) - Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar da Universidade Federal de Pelotas, 2012.

WAJNBERG, E. Genetics of the behavioral ecology of egg parasitoids. In: CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, A. Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma*. **New York: Springer**, cap. 5, p. 149-166, 2010.

WALKER, D.W. Bionomics of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fab.). In. A description of the mating behavior. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, , v. 67, n. 2, p. 80-83, 1965.

WALTHER, G.; POST, E.; CONVEY, P.; MENZEL, A.; PARMESAN, C.; BEEBEE, T.J.C. Ecological responses to recent climate change. **Nature**, v. 416, n. 6879, p. 389-395, 2002.