

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

PARASITISMO E DESENVOLVIMENTO DE *Tetrastichus howardi* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) EM LAGARTA E PUPA DE *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

ELIZANGELA LEITE VARGAS

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2013**

**PARASITISMO E DESENVOLVIMENTO DE *Tetrastichus howardi*
(HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) EM LAGARTA E PUPA DE
Diatraea saccharalis (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

ELIZANGELA LEITE VARGAS
Bióloga

Orientador: PROF. DR. FABRICIO FAGUNDES PEREIRA

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

Dourados
Mato Grosso do Sul
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da UFGD, Dourados, MS, Brasil

V297p Vargas, Elizangela Leite.
Parasitismo e desenvolvimento de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em lagartas e pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) / Elizangela Leite Vargas. – Dourados-MS : UFGD, 2013. 89 f.

Orientador: Prof. Dr. Fabricio Fagundes Pereira.
Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Broca-da-cana. 2. Parasitoide. 3. Controle biológico. I. Título.

CDD: 632.9

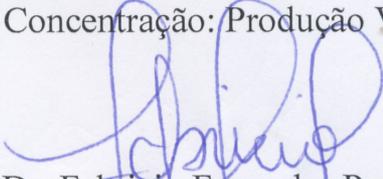
“Parasitismo e desenvolvimento de *Tetrasthicus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em lagarta e pupa de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae”

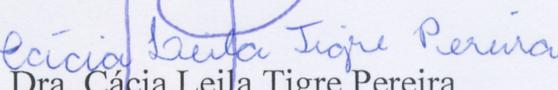
Por

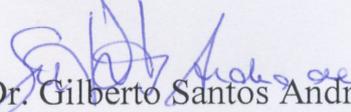
Elizangela Leite Vargas

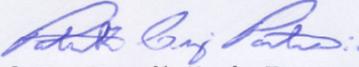
Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de DOUTORA EM AGRONOMIA.

Área de Concentração: Produção Vegetal


Prof. Dr. Fabricio Fagundes Pereira
Orientador – UFGD


Profa. Dra. Cácia Leila Tigre Pereira
Membro titular – UFGD


Prof. Dr. Gilberto Santos Andrade
Membro titular – UNIR


Prof. Dr. Patrik Luiz Pastori
Membro titular – UFC


Prof. Dr. Robson Thomaz Thuler
Membro titular – IFTM

Aprovada em: 19 de agosto de 2013

*“O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria, se aprende é com a vida e os humildes.”*

Cora Coralina

Ao meu pai Rene Dutra Vargas (in memorian)

À minha mãe Margarida Leite Vargas

Ao meu filho Gabriel Vargas Grance

Ao meu marido Flávio Gato Cucolo

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a capacidade de superação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

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

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

Ao Prof. Dr. Patrik Luiz Pastori pelo incentivo no meu ingresso no doutorado e auxílio na elaboração do projeto para a seleção.

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

Aos professores, Dra. Alessandra Mayumi Tokura, Dra. Cácia Leila Tigre Pereira e Dr. Munir Mauad, pela participação na banca de minha qualificação.

À Daniele Fabiana Glaeser, pela preciosa colaboração, pelo incentivo, pelo carinho e confiança, principalmente pela amizade ímpar.

À Vanessa Rodrigues Ferreira Calado, pela amizade verdadeira, pelo inestimável auxílio na criação dos insetos e na realização dos experimentos, pelo incentivo e pelos momentos inesquecíveis que vivenciamos no laboratório.

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

Ao Nicholas Vinícius Silva, pelo auxílio na criação dos insetos, pelo carinho, apoio, amizade e animadora companhia.

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

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

Aos estagiários, Lucas Teles de Melo, Heitor Paulo Leandro da Silva Paz e Paulo Vitor Liuti da Silva, pelo auxílio na manutenção das criações e assepsia dos materiais.

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

Ao Bruno Pontim pela valiosa colaboração, apoio e amizade.

Ao Paulo Henrique Ramos Fernandes, pelos empréstimos de materiais para a criação dos insetos, pelo apoio e amizade.

Agradeço mais uma vez, de modo geral, aos amigos Daniele, Vanessa, Fabiana, Nicholas, Bruna, Cácia, Ivan e Lucas, nós formamos um grupo muito agradável de trabalhar junto, obrigada pelas conversas, risadas, trocas de experiências e idéias, nós geramos ciência num clima aconchegador, vocês fizeram toda a diferença!

Aos colegas da Pós-graduação em Agronomia, especialmente Rogério Guerino, Hércules Arce, Sandro Cardoso e Ayrton Morceli.

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

Aos membros da banca de Tese de Doutorado, Dra. Cácia Leila Tigre Pereira, Dr. Gilberto Santos Andrade, Dr. Patrik Luiz Pastori e Dr. Robson Thomaz Thuler, pelas preciosas sugestões.

Ao amado Flávio Gato Cucolo, pelo amor, incentivo, generosidade e paciência em todos os momentos, você é o meu porto seguro.

Ao amado filho Gabriel, por estar sempre ao meu lado, superando momentos difíceis e compartilhando alegrias.

À minha mãe Margarida e minhas irmãs Marília, Alcione e Vanuza, pelo incentivo, amor e confiança.

As minhas amigas Alessandra Fequetia Freitas, Rose Moutinho Braga, Simone Estigarribia de Lima e Giani Lopes Bérغامo Missirian, pelo incentivo, carinho e confiança.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, muito obrigada!

BIOGRAFIA

Elizangela Leite Vargas, filha de Margarida Leite Vargas e Rene Dutra Vargas, nasceu na cidade de Caracol, Mato Grosso do Sul, Brasil, no dia 30 de outubro de 1977.

Estudou todo o ensino Fundamental e Médio na rede pública.

Em março de 1996, ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS, concluindo-o em janeiro de 2000.

Atuou como professora de Ciências, no Ensino Fundamental, na rede pública de ensino em Campo Grande-MS de 1999 a 2000.

Em Dourados-MS, atuou como professora de Biologia e Química, no Ensino Médio, na rede pública, de 2001 a 2006 e na rede particular de ensino no ano de 2007.

Realizou em 2006 o Curso de Pós-graduação (*Lato Sensu*) Especialização em Educação Ambiental, ministrado pelo Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN).

Em março de 2008 iniciou o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS, defendendo a dissertação em fevereiro de 2010.

Em março de 2010 iniciou o Doutorado no Programa de Pós-Graduação Agronomia – Produção vegetal da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS, defendendo a tese em agosto de 2013.

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVO.....	7
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	8
CAPÍTULO 1. Registro de <i>Tetrastichus howardi</i> (Hymenoptera: Eulophidae) parasitando <i>Diatraea</i> sp. (Lepidoptera: Crambidae) em plantio de cana-de-açúcar no Brasil.....	14
Resumo.....	15
Abstract.....	15
1. Introdução.....	15
2. Material e Métodos.....	16
3. Resultados.....	17
4. Discussão.....	17
5. Conclusão.....	18
6. Agradecimentos.....	18
7. Referências.....	18
CAPÍTULO 2. Características biológicas de <i>Tetrastichus howardi</i> (Hymenoptera: Eulophidae) mantido em pupas de <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Crambidae) por sucessivas gerações.....	21
Resumo.....	22
Abstract.....	22
1. Introdução.....	22
2. Material e Métodos.....	24
3. Resultados.....	27
4. Discussão.....	28
5. Conclusões.....	30
6. Agradecimentos.....	30

7. Referências.....	31
CAPÍTULO 3. Reprodução de <i>Tetrastichus howardi</i> (Hymenoptera: Eulophidae) em pupa de <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Crambidae): relação de diferentes densidades do parasitoide e do hospedeiro.....	
Resumo.....	37
Abstract.....	38
1. Introdução.....	39
2. Material e Métodos.....	40
3. Resultados.....	43
4. Discussão.....	45
5. Conclusões.....	50
6. Agradecimentos.....	50
7. Referências.....	50
CAPÍTULO 4 Parasitismo e desenvolvimento de <i>Tetrastichus howardi</i> (Hymenoptera: Eulophidae) em lagartas de diferentes ínstares de <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Crambidae).....	
Resumo.....	65
Abstract.....	66
1. Introdução.....	67
2. Material e Métodos.....	68
3. Resultados.....	71
4. Discussão.....	73
5. Conclusão.....	77
6. Agradecimentos.....	77
7. Referências.....	77
CONCLUSÕES GERAIS.....	86
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
ANEXO	88
APÊNDICE	89

RESUMO

VARGAS, E.L. Universidade Federal da Grande Dourados, agosto 2013. **Parasitismo e desenvolvimento de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em lagarta e pupa de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae).** Orientador: Fabricio Fagundes Pereira.

Tetrastichus howardi (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) é um endoparasitoide gregário e polífago, que foi coletado em plantio de cana-de-açúcar em Dourados-MS, parasitando pupas de *Diatraea* sp. (Lepidoptera: Crambidae) e criado no Laboratório de Entomologia/Controle Biológico da Faculdade de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Grande Dourados, em Dourados - Mato Grosso do Sul, Brasil, visando a realização de estudos sobre o seu potencial para controlar a broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). Como o sucesso dos programas de controle biológico com parasitoides depende do conhecimento da interação desses inimigos naturais com seus hospedeiros e do desenvolvimento de técnicas de criações massais desses insetos, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o parasitismo e o desenvolvimento de *T. howardi* criado em lagarta e pupa de *D. saccharalis*. Para isso, foram desenvolvidos os seguintes trabalhos: Registro de *T. howardi* parasitando *Diatraea* sp. em cultura de cana-de-açúcar no Brasil. Multiplicação de *T. howardi* por sucessivas gerações em pupas de *D. saccharalis*. Reprodução de *T. howardi* em pupa de *D. saccharalis*: relação de diferentes densidades do parasitoide e do hospedeiro. Parasitismo e desenvolvimento de *T. howardi* em lagartas de *D. saccharalis*. De maneira geral, além de parasitar pupas, *T. howardi* parasitou lagartas de *D. saccharalis* em laboratório. A multiplicação de *T. howardi* em pupas de *D. saccharalis* por 25 gerações sucessivas não compromete a qualidade biológica do parasitoide. A densidade de até 14 fêmeas de *T. howardi* por pupa de *D. saccharalis* é a mais efetiva para proporcionar aumento da progênie sem perder características biológicas essenciais numa criação de laboratório. Uma fêmea de *T. howardi* parasita até sete pupas de *D. saccharalis*. *T. howardi* é capaz de completar seu ciclo e emergir de adultos de *D. saccharalis*. Além disso, *T. howardi* parasitou lagartas de segundo, terceiro, quarto e quinto instares de *D. saccharalis*. O terceiro instar de *D. saccharalis* é o mais indicado para utilização em criações de *T. howardi*. Essas informações são importantes por contribuírem para a otimização da multiplicação de *T. howardi* em laboratório, visando o controle biológico de *D. saccharalis* com este inimigo natural em campo.

Palavras-chave: controle biológico; parasitoide; broca-da-cana; criação massal; desempenho reprodutivo.

ABSTRACT

VARGAS, E.L. Universidade Federal da Grande Dourados, august 2013. **Parasitism and development of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) on caterpillar and pupae *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)**. Advisor: Fabricio Fagundes Pereira.

Tetrastichus howardi (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) is a gregarious endoparasitoid and polyphagous, was collected in sugarcane crop in Dourados-MS parasitizing pupae of *Diatraea* sp. (Lepidoptera: Crambidae) and is being created in the Laboratório de Entomologia/Controle Biológico at Faculdade de Ciências Agrárias, of Universidade Federal da Grande Dourados in Dourados - Mato Grosso do Sul, Brasil, aimed at studies on its potential to control the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). As the success of biological control programs with parasitoids depends on knowledge of the interaction of these natural enemies with their hosts, and the development of techniques for mass rearing of these insects, the aim of this study was to evaluate the parasitism and development of *T. howardi* in caterpillar and pupae of *D. saccharalis*. For this, we developed the following work: Record of *T. howardi* parasitizing *Diatraea* sp. in sugarcane crop in Brazil. Multiplication of *T. howardi* by successive generations in pupae of *D. saccharalis*. Reproduction of *T. howardi* in pupae of *D. saccharalis*: relationship of densities different of parasitoid and host. Parasitism and development of *T. howardi* in *D. saccharalis* caterpillar. In general, in addition to parasitize pupae, *T. howardi* parasite to caterpillar of *D. saccharalis* in the laboratory. The multiplication of *T. howardi* in pupae of *D. saccharalis* for 25 successive generations did not compromised the biological quality of the parasitoid. The density of up to 14 females of *T. howardi* per pupa of *D. saccharalis* is more effective to provide increased progeny without losing biological features essential in creating laboratory. A female *T. howardi* parasite up to seven pupae of *D. saccharalis*. *T. howardi* is able to complete its life cycle and emergence of adult *D. saccharalis*. Also, *T. howardi* parasited caterpillar of second, third, fourth and fifth instars of *D. saccharalis*. The third instar of *D. saccharalis* is the most suitable for use in creations *T. howardi*. This information is important for contributing to the optimization of the multiplication of *T. howardi* in laboratory, aimed at biological control of *D. saccharalis* with this natural enemy in the field.

Keywords: biological control; parasitoid; sugarcane borer, mass rearing; reproductive performance.

INTRODUÇÃO GERAL

Programas de controle biológico têm apresentado crescimento devido ao novo direcionamento internacional de produção agropecuária, favorecendo a conservação e o uso sustentável dos recursos naturais (BARBOSA et al., 2008). Além disso, a utilização de inimigos naturais no controle de pragas tem se mostrado uma alternativa promissora devido à eficiência e aos baixos custos relativos (BARBOSA et al., 2008; VACARI et al., 2012).

O sucesso do controle biológico com parasitoides está relacionado com a qualidade na produção massal, pois inimigos naturais produzidos de forma adequada, quando liberados no campo apresentam melhor capacidade para localizar e parasitar o hospedeiro (PREZOTTI e PARRA, 2002; GANDOLFI et al., 2003; VREYSEN e ROBINSON, 2010).

A implementação dos programas de controle biológico com parasitoides dependem do conhecimento dos fatores abióticos e bióticos que envolvem a interação desses inimigos naturais com seus hospedeiros (ALTUNTAS et al., 2010; SALVADOR e CÔNSOLI, 2008).

O uso de parasitoides como ferramenta para o controle de pragas exige que os mesmos sejam multiplicados em grandes quantidades. As criações massais referem-se a produção de milhões de insetos, sendo criados de forma contínua durante todo o ano, que envolvem operações semelhantes as de uma fábrica e demandam de conhecimento básico das espécies a serem multiplicadas (PARRA e CÔNSOLI, 2009). A criação massal de parasitoides é a etapa inicial para seu uso no controle biológico aplicado e esse processo depende do seu desenvolvimento adequado, para obtenção de inimigos naturais com qualidade (PREZOTTI et al., 2002; PRATISSOLI et al., 2005).

As características biológicas dos parasitoides são afetadas pela idade, densidade, espécie de parasitoides e hospedeiros, além dos fatores abióticos como temperatura, umidade e fotoperíodo (COSTA LIMA et al., 2009; SILVA-TORRES et al., 2009; SILVA-TORRES et al., 2010; PEREIRA et al., 2011; CHICHERA et al., 2012; PASTORI et al., 2012; RODRIGUES et al., 2013). Além disso, quando uma quantidade insuficiente de parasitoides é liberada em campo, em relação à densidade populacional do hospedeiro, ocorrem baixas taxas de parasitismo (PARON et al., 1998). Nesse caso,

é preciso verificar como o inimigo natural irá responder funcional e numericamente ao aumento da densidade do hospedeiro (FARIA et al., 2000; POLANCZYK et al., 2011).

Outro aspecto que influencia a otimização das criações e o controle biológico aplicado com parasitoides é o ínstar do hospedeiro (HARVEY et al., 1994; DORN e BECKAGE, 2007; YANG e WAN, 2011). Isso acontece, porque o parasitoide fica sujeito às alterações metabólicas e às taxas de crescimento impostas pelo alimento explorado pelo hospedeiro (CÔNSOLI e VINSON, 2009). A seleção dos ínstars larvais pelos parasitoides é baseada na facilidade de localização, no comportamento, na idade e no tamanho do hospedeiro (PASCUA e PASCUA, 2004).

Neste sentido, a manipulação dos fatores mencionados pode aprimorar as técnicas de criação de parasitoides, possibilitando a produção de um grande número de indivíduos com alta capacidade reprodutiva (UÇKAN e GÜLEL, 2002; PARRA e CÔNSOLI, 2009).

Diatraea saccharalis é uma importante praga da cana-de-açúcar, devido a intensidade do ataque e consequentes perdas na produção de açúcar e álcool (SEGATO et al., 2006; DINARDO-MIRANDA et al., 2012). O controle biológico com parasitoides tem sido a forma mais utilizada para combater a broca-da-cana, pois o controle com produtos químicos é difícil, devido a fase larval do inseto se desenvolver em local protegido, dentro do caule da planta (VACARI et al., 2012).

Uma pupa de *Diatraea* sp. parasitada por *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) foi coletada em plantio de cana-de-açúcar, no município de Dourados - Mato Grosso do Sul, (VARGAS et al., 2011). A ocorrência do parasitoide no Estado, onde o cultivo da cana-de-açúcar é significativo (DINARDO-MIRANDA et al., 2012), estimulou o desenvolvimento de pesquisas visando a utilização de *T. howardi* como mais uma alternativa no controle de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae).

1. O parasitoide *Tetrastichus howardi*

A maioria das espécies de inimigos naturais utilizados no manejo de pragas pertence ao Filo Arthropoda. Dentre os artrópodes, destacam-se quatro grupos taxonômicos de inimigos naturais mais utilizados: em primeiro lugar encontra-se

Hymenoptera, seguido de Acari, Coleoptera e Hemiptera/Heteroptera (VAN LENTEREN, 2012).

Himenópteros parasitoides são importantes inimigos naturais de insetos-praga, sendo utilizado grande número de espécies no controle biológico aplicado, principalmente devido a especificidade e facilidade de criação (CHERIAN e SUBRAMANIAM, 1940; PARRA, 2002; VAN LENTEREN, 2012). Dentre os himenópteros, destacam-se aqueles pertencentes à família Eulophidae.

Eulophidae Westwood, 1829 é uma das famílias mais diversas dentro de Chalcidoidea, sendo constituída de 297 gêneros e 4472 espécies distribuídas em cinco subfamílias: Entiinae, Eulophinae, Entedoninae, Tetrastichinae e Ophelminae (NOYES, 2003). Tetrastichinae é a maior subfamília de Eulophidae, que incluem parasitoides de hospedeiros pertencentes a mais de 100 famílias de insetos de diferentes ordens (LA SALLE, 1994). Dentre as espécies deste grupo, *T. howardi* é um endoparasitoide de hábito gregário, sendo um parasitoide primário ou hiperparasitoide facultativo, que se encontra associado com um grande número de espécies de lepidópteros pragas de culturas importantes (KARINDAH et al., 2005; SULLIVAN e VÖLKL, 1999; BAITHA et al., 2004; PRASAD et al., 2007; LA SALLE e POLASZEK, 2007; CRUZ et al., 2011; VARGAS et al., 2011).

Tetrastichus howardi é uma espécie asiática, amplamente distribuída no norte da China e oeste do Paquistão (LA SALLE e POLASZEK, 2007), nas Filipinas (RAO, 1965; MOHYUDDIN, 1990) e Índia (CHERIAN e SUBRAMANIAM, 1940; RAO, 1965). Ocorre também nas Ilhas Maurício (BOUCEK, 1988) e Austrália (LA SALLE e POLASZEK, 2007).

O gênero desta espécie apresenta duas características que o identificam: uma seta dorsal na veia sub-marginal e uma carena em forma de Y invertido no propódeo. O corpo do adulto é preto ou de cor escura, com brilho metálico, mas algumas espécies podem apresentar colorações claras. *Tetrastichus howardi*, no entanto, é a única espécie deste gênero que têm duas setas dorsais na veia submarginal (BOUCEK, 1988; ZHU e HUANG, 2001; LA SALLE e POLASZEK, 2007).

Fêmeas virgens de *T. howardi* se reproduzem por partenogênese arrenótoca, quando não ocorre a cópula. No caso de reprodução sexuada a proporção é de um macho para 15,2 fêmeas (CHERIAN e SUBRAMANIAM, 1940; MOORE e KFIR, 1995a). Uma fêmea deste parasitoide deposita de quatro a 28 ovos em lagartas de *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) e aproximadamente 60

ovos em pupa de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (KARINDAH, 2005; OLIVEIRA, 2013), demonstrando que a quantidade de ovos depositada varia com o tamanho e a espécie do hospedeiro. Após a oviposição no hospedeiro, os ovos himenopteriformes, brancos, leitosos e internamente granulares apresentam tamanho entre 0,288 e 0,304 mm de comprimento e aproximadamente 0,088 mm de largura (GONZÁLEZ et al., 2003b).

As larvas se desenvolvem em três estádios larvais: L1 (24-32 horas) – Larvas esbranquiçadas, cujas peças bucais são reduzidas, sendo compostas por duas mandíbulas opostas e levemente triangulares. L2 (80-88 horas) – Larvas de cor creme, cujo corpo é ligeiramente curvado longitudinalmente e sua segmentação é observada mais claramente. As mandíbulas são mais robustas do que L1, menos arqueada e sem ápice agudo. L3 (24 a 38 horas) - semelhante ao segundo estágio larval (L2) em coloração e forma do corpo. São maiores, variando entre 2,5 e 2,9 mm. Suas mandíbulas são triangulares e totalmente retas (GONZÁLEZ et al., 2003b; GONZÁLEZ, 2004).

As pupas inicialmente apresentam cor amarelo pálido e a medida que escurecem verifica-se a presença de olhos compostos e ocelos. A coloração dos olhos varia de amarelo claro a vermelho, porém antes da emergência dos adultos, os olhos tornam-se escuros (CHERIAN e SUBRAMANIAM, 1940; GONZÁLEZ et al., 2003b). Quando os imaturos se desenvolvem a uma temperatura de 25°C, os adultos emergem do hospedeiro, aproximadamente entre 14 a 16 dias após o parasitismo (CHERIAN e SUBRAMANIAM, 1940; GONZÁLEZ, 2004).

O dimorfismo sexual em *T. howardi* é evidente, principalmente pelas antenas. As fêmeas apresentam funículo das antenas pigmentado e com três segmentos, além de escapo sem placa sensorial na margem ventral. Nos machos, o funículo contém quatro segmentos, nesse caso apenas a clava é pigmentada, e o escapo apresenta uma placa sensorial na margem ventral (LA SALLE e POLASZEK, 2007; GONZÁLEZ, 2004). Outra característica facilmente distinguível é a cor da coxa e fêmur nas pernas anteriores, que nas fêmeas são mogno e nos machos são amarelo claro (GONZÁLEZ, 2004).

As fêmeas de *T. howardi* foram capazes de discriminar pupas parasitadas de não parasitadas de *Helicoverpa armigera* (Huebner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) a partir de 48 horas do parasitismo desse hospedeiro. Porém, não demonstraram preferência por pupas de *H. armigera* e *Chilo partellus* (Swinhoe, 1885) (Lepidoptera: Pyralidae) com idades entre um a cinco dias (MOORE e KFIR, 1995b). Em condições de laboratório, *T.*

howardi se desenvolve em diversas espécies de Lepidoptera, assim como em hospedeiros de outras ordens, como Coleoptera, Diptera, Mantodea e Hymenoptera (BENNETT, 1965; MOORE e KFIR 1995a,b; KFIR et al., 1993, KFIR et al., 1997; FELIX et al., 2005; BAITHA et al., 2004; LA SALLE e POLASZEK, 2007; PRASAD et al., 2007; VARGAS et al., 2011).

Cherian e Subramaniam (1940) foram os primeiros a discutir o potencial de *T. howardi* como agente de controle biológico. As vantagens da utilização de *T. howardi* no controle de pragas estão relacionadas com o ciclo de vida mais curto que dos seus hospedeiros, elevada proporção de fêmeas em relação a machos e alta longevidade das fêmeas.

Tetrastichus howardi proveniente das Filipinas foi introduzido na África do Sul, visando o controle biológico de duas espécies de insetos-praga, *C. partellus* e *Busseola fusca* (Fuller, 1901) (Lepidoptera: Noctuidae), nas culturas de milho e sorgo (SKOROSZEWSKI e VAN HAMBURG, 1987; KFIR, 2001; RAO et al., 2001). Posteriormente, liberações neste país também foram realizadas para o controle de *H. armigera* (MOORE e KFIR 1995a).

Na América, *T. howardi* foi introduzido em quarentena em Trinidad e Tobago no ano de 1963 como um agente potencial de controle biológico de *Diatraea* spp., sendo criado em laboratório em diferentes hospedeiros, entretanto, como o mesmo também parasitou espécies de parasitoides, *Lixophaga diatraeae* (Townsend, 1916) (Diptera: Tachinidae) e *Paratheresia claripalpis* (Wulp, 1896) (Diptera: Tachinidae) estoques desse inimigo natural foram destruídas e as liberações não foram realizadas (BENNETT, 1965).

Entretanto, em 1997 foram encontradas em Cuba, pupas de *D. saccharalis* parasitadas por *T. howardi* em cultura de arroz e cana-de-açúcar (GONZÁLEZ et al., 2003a). Desta forma, FELIX et al. (2005) ao estudarem a interação dos parasitoides *T. howardi* e *L. diatraeae* em condições de campo, visando o controle de *D. saccharalis*, observaram que a associação dos parasitoides contribuiu para o aumento das taxas de parasitismo que foi de até 55%. Além disso, a competição indireta ou a interferência na utilização de certos recursos no nicho, que podem ocorrer entre *L. diatraeae* e *T. howardi*, não afetou significativamente a eficácia dos parasitoides. Pupas de *L. diatraeae* não foram parasitadas por *T. howardi*, podendo ser uma evidência de que o hiperparasitismo não é comum em campo (FELIX et al., 2005).

Embora este parasitoide seja um hiperparasitoide facultativo, na maioria das vezes desenvolve-se como parasitoide primário, sendo possível sua utilização no controle biológico. Destaca-se ainda, a facilidade de localização do hospedeiro no interior do colmo da planta (KFIR et al., 1993; POLASZEK e LA SALLE, 1995).

As liberações de *T. howardi* em Cuba, inicialmente teve como objetivo o controle biológico de *D. saccharalis* (GONZÁLEZ, 2004). Posteriormente, com a expansão das tecnologias de criação, este parasitoide passou a ser utilizado também para o controle de lepidópteros-praga em hortaliças e outras culturas (MORENO et al., 2010; KARINDAH, 2005).

No Brasil, há relatos de pupas de *D. saccharalis* parasitadas por *T. howardi* na cultura do milho (CRUZ et al., 2011) e cana-de-açúcar (VARGAS et al., 2011). Relata-se também o parasitismo de lagarta de *D. saccharalis* em condições de laboratório (VARGAS et al., 2011). O parasitoide *T. howardi* também foi encontrado parasitando *P. xylostella* no Estado de Pernambuco (SILVA-TORRES et al., 2010) e pode ser multiplicado no hospedeiro alternativo *T. molitor* (OLIVEIRA, 2013). A ocorrência do parasitoide no Brasil abre uma nova perspectiva sobre a supressão da broca-da-cana, considerando os resultados promissores já obtidos em países asiáticos (CRUZ et al., 2011).

Devido à expansão da cana-de-açúcar no Brasil, e consequente danos ocasionados pela broca-da-cana, estudos envolvendo o uso de *T. howardi* como alternativa para o controle de *D. saccharalis* nesta cultura estão sendo realizados pela equipe de pesquisa do Laboratório de Entomologia/Controle Biológico (LECOBIOL) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Estes estudos visam conhecer, de forma detalhada, as principais características biológicas de *T. howardi* e as técnicas de criação deste parasitoide em laboratório, tais como o efeito da densidade de parasitoides e de hospedeiros, a multiplicação ao longo das gerações, a influência da idade do parasitoide e do hospedeiro, a criação em hospedeiros alternativos, o efeito das condições abióticas (temperatura e umidade); assim como os métodos de liberações em campo de forma a garantir um controle biológico eficaz, caso esse parasitoide seja liberado em cultivos de cana-de-açúcar para o controle biológico da broca.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o parasitismo e o desenvolvimento de *T. howardi* criado em lagarta e pupa de *D. saccharalis*. Para isso, foram desenvolvidos os seguintes trabalhos:

1. Registro de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitando *Diatraea* sp. (Lepidoptera: Crambidae) em plantio de cana-de-açúcar no Brasil;
2. Multiplicação de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) por sucessivas gerações em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae);
3. Reprodução de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupa de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae): relação de diferentes densidades do parasitoide e do hospedeiro;
4. Parasitismo e desenvolvimento de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em lagartas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTUNTAS, H.; KILIC, A.Y.; SIVAS ZEYTINOGLU, H. The effects of parasitism by the ectoparasitoid *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) on host hemolymph proteins in the Mediterranean flour moth *Ephestia kueniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Turkish Journal of Zoology**, v. 34, p. 409-416, 2010.
- BARBOSA, L.S.; COURI, M.S.; COELHO, V.M.A. Desenvolvimento de *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae), utilizando diferentes densidades do parasitoide. **Biota Neotropica**, v. 8, p. 49-54, 2008.
- BAITHA, A.; JALALI, S.K.; RABINDRA, R.J.; VENKATESAN, T.; RAO, N.S. Parasitizing efficiency of the pupal parasitoid, *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae) on *Chilo partellus* (Swinhoe) at different exposure periods. **Journal of Biological Control**, v. 18, p. 65-68, 2004.
- BENNETT, F.D. Tests with parasites of Asian graminaceous moth-borers on *Diatraea* and allied genera in Trinidad. **Technical Bulletin of the Commonwealth Institute of Biological Control**, v. 5, p. 101- 116, 1965.
- BOUCEK, Z. **Australian Chalcidoidea (Hymenoptera): a biosystematic revision of genera of fourteen families with a reclassification of species**. United Kingdom: CAB International, 1988. 832 p.
- CHERIAN, M.C.; SUBRAMANIAM, C.K. *Tetrastichus ayyari* Rohw – a pupal parasite of some moth-borers in South India. **Agricultural Research Institute**, v. 2, p. 75-77, 1940.
- CHICHERA, R.A.; PEREIRA, F.F.; KASSAB, S.O.; BARBOSA, R.H.; PASTORI, P. L.; ROSSONI, C. Capacidade de busca de *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Interciencia**, v. 37, p. 852-856, 2012
- CÔNSOLI, F.L.; VINSON, S.B. Parasitoides (Hymenoptera). In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (Eds.). **Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p. 837-873.
- COSTA LIMA, T.C.; GEREMIAS, L.D; PARRA, J.R.P. Efeito da temperatura e umidade relativa do ar no desenvolvimento de *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromysidae) em *Vigna unguilata*. **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 727-733, 2009
- CRUZ I.; REDOAN, A.C.; SILVA, R.B.; FIGUEIREDO, M.L.C.; PENTEADO-DIAS, A.M. New record of *Tetrastichus howardi* (Olliff) as a parasitoid of *Diatraea saccharalis* (Fabr.) on maize. **Scientia Agricola**, v. 68, p. 252-254, 2011.
- DINARDO-MIRANDA, L.L; ANJOS, I.A.; COSTA, V.P.; FRACASSO, J.V. Resistance of sugarcane cultivars to *Diatraea saccharalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 1-7, 2012.

DORN, S.; BECKAGE, N. Superparasitism in gregarious hymenopteran parasitoids: ecological, behavioural and physiological perspectives. **Physiological Entomology**, v. 32, p. 199-211, 2007.

FARIA, C.A.; TORRES, J.B.; FARIAS, A.M.I. Resposta funcional de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) parasitando ovos de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae): efeito da idade do hospedeiro. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p. 85-93, 2000.

FELIX, J.; GONZÁLEZ, A.; OCA, F.N.M.; RAVELO, H.G.; BAITHA, A. Interaction of *Lixophaga diatraeae* (Townsend) and *Tetrastichus howardi* (Olliff) for management of *Diatraea saccharalis* (Fab.) in Cuba. **Sugar Tech**, v. 7, p. 5-8, 2005.

GANDOLFI, M.; MATTIACCI, L.; DORN, S. Mechanisms of behavioral alterations of parasitoids reared in artificial. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, p. 1871-1887, 2003.

GONZÁLEZ J.F.A.; OCA, F.N.M.; RAVELO, H.G. *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae) nuevo parásito pupal de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) en Cuba. **Centro Agrícola**, v. 30, p. 93, 2003a.

GONZÁLEZ, J.F.A.; OCA, F.N.M.; RAVELO, H.G. Estudios bioecológicos de *Tetrastichus howardi* Olliff. (Hymenoptera: Eulophidae), parásito pupal de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) en Cuba. (Primera parte). **Centro Agrícola**, v. 30, p. 37-41, 2003b.

GONZÁLEZ, J.F.A. **Estudios bioecológicos, reproducción artificial y liberación de *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoide pupal de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) en Cuba.** 2004. 176 f. Tese (Doctor en Ciencias Agrícolas) – Universidad Central de Las Villas, Santa Clara - Cuba.

HARVEY, J.A.; HARVEY, I.F.; THOMPSON, D.J. Flexible larval growth allows use of a range of host sizes by parasitoid wasp. **Ecology**, v. 75, p. 1420-1428, 1994.

KARINDAH, S.; SULTANTO, E.S.; SULISTYOWATI, L. Parasitoid larva-pupa *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) pada *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) di pertanaman kubis kota batu dan kabupaten malang. **Jurnal Entomologi Indonesia**, v. 2, p. 61- 68, 2005.

KFIR, R.; GOUWS, S.; MOORE, S.D. Biology of *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae): A facultative hyperparasitoid of stem borers. **Biocontrol Science and Technology**, v. 3, p. 149-159, 1993.

KFIR, R. Parasitoids of *Plutella xylostella* (Lep.: Plutellidae) in South Africa: An annotated list. **Entomophaga**, v. 42, p. 517-523, 1997.

KFIR, R. Prospects for biological control of the stem borer *Chilo partellus* in grain crops in South Africa. **Insect Science and its Application**, v. 21, p. 275-280, p. 2001.

- LA SALLE, J. North American genera of Tetrastichinae (Hymenoptera: Eulophidae). **Journal of Natural History**, v. 28, p. 109-236, 1994.
- LA SALLE, J.; POLASZEK, A. Afrotropical species of the *Tetrastichus howardi* species group (Hymenoptera: Eulophidae). **African Entomology**, v. 15, p. 45-56, 2007.
- MOHYUDDIN, A.I. Biological control of Chilo spp. in maize, sorghum and millet. **Insect Science and its Application**, v. 11, p. 721-732, 1990.
- MOORE, S.D.; KFIR, R. Aspects of the biology of the parasitoid, *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae). **Journal of African Zoology**, v. 109, p. 455-466, 1995a.
- MOORE, S.D.; KFIR, R. Host preference of the facultative hyperparasitoid *Tetrastichus howardi* (Hym.: Eulophidae). **Entomophaga**, v. 40, p. 69-76, 1995b.
- MORENO, L.V.; FIGUEROA, S.C.; PÉREZ, A.C.; MICHELANA, J.G.; GARCIA, J.L.A.; FERNÁNDEZ, A.R.; BARRIOS, M.B.; RAMÍREZ, L.A.R.; SÁNCHEZ, R.G.; SANTOS, T.C.; MOLLINEDA, M.F.; RODRIGUEZ, M.P.; CAMPBELL, I.E.; CARDONA, L.L.; PEÑA, E.C.; TORRES, T.R.; SUÁREZ, O.C. Diagnóstico de la utilización de entomófagos y entomopatógenos para el control biológico de insectos por los agricultores en Cuba. **Fitosanidad**, v. 4, p. 159-169, 2010.
- NOYES, J.S. **Universal Chalcidoidea Database**. 2003. Disponível em: <<http://www.nhm.ac.uk/entomology/chalcidoids/index.html>>. Acesso: 22 jul. 2013.
- OLIVEIRA, F.G. **Multiplicação de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) e de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)**. 2013. 53f. Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade).
- PARON, M.J.F.O.; CIOCIOLA, A.I.; CRUZ, I. Resposta de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae) a diferentes densidades de ovos do hospedeiro natural, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, p. 427-433, 1998.
- PARRA, J.R.P. Criação massal de inimigos naturais. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Eds.). **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 143- 164.
- PARRA, J.R.P.; CÔNSOLI, F.L. Criação massal e controle de qualidade de parasitoides de ovos. In: BUENO, V.H.P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: Editora UFLA, 2009. p. 169-197.
- PASCUA, M.E.; PASCUA, L.T. Ichneumonid wasp, *Eriborus argenteopilosus* Cameron (hymenoptera: Ichneumonidae) on the different larval stages of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Science**, v. 132, p. 103-108, 2004.
- PASTORI, P.L.; PEREIRA, F.F.; ZANUNCIO, J.C.; OLIVEIRA, H.N.; CALADO,

V.F.R.; SILVA, R.O. Densidade de fêmeas de *Palmistichus elaeisis* Delvare & Lasalle, 1993 (Hymenoptera: Eulophidae) para sua reprodução em pupas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, p. 525-532, 2012.

PEREIRA, F.F.; ZANUNCIO, J.C.; OLIVEIRA, H.N.; GRANCE, E.L.V.; PASTORI, P.L.; GAVA-OLIVEIRA, M.D. Thermal requirements and estimate number of generations of *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) in different *Eucalyptus* plantations regions. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p. 431-436, 2011.

POLANCZYK, R.A.; BARBOSA, W.F.; CELESTINO, F.N.; PRATISSOLI, D.; HOLTZ, A.M.; MILANEZ, A.M.; COCHETO, J.G.; DA SILVA, A.F. Influência da densidade de ovos de *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera: Crambidae) na capacidade de parasitismo de *Trichogramma exiguum* Pinto & Platner e *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, v. 40, p. 238-243, 2011.

POLASZEK, A.; LA SALLE, J. The hyperparasitoids of cereal stem borers in Africa (Hymenoptera: Ceraphronidae, Encyrtidae, Eulophidae, Eurytomidae) of cereal stem borers (Lepidoptera: Noctuidae, Pyralidae) in Africa. **African Entomology**, v. 3, p. 131-146, 1995.

PRASAD, K.S.; ARUNA, A.S.; KUMAR, V.; KARIAPPA, B.K. Feasibility of mass production of *Tetrastichus howardi* (Olliff), a parasitoid of leaf roller (*Diaphania pulverulentalis*), on *Musca domestica* (L.). **Indian Journal of Sericulture**, v. 46, p. 89-91, 2007.

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

PREZOTTI, L.; PARRA, J.R.P.; VENCOVSKI, R.; DIAS, C.T.S.; CRUZ, I.; CHAGAS, M.C.M. Teste de vôo como critério de avaliação da qualidade de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae): Adaptação de metodologia. **Neotropical Entomology**, v. 31, p. 411-417, 2002.

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

RAO, V.P. Natural enemies of rice stem borers and allied species in various parts of the world and possibilities of their use in biological control of rice stem borers in Asia. **Technical Bulletin of the Commonwealth Institute of Biological Control**, v. 6, p. 1-68, 1965.

RAO, G.M.V.P.; RAMANI, S.; SINGH, S.P. Field parasitization of the maize stem borer, *Chilo partellus* (Swinhoe) (Lepidoptera: Pyralidae) in Bangalore. **Journal of Biological Control**, v. 15, p. 193-195, 2001.

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

SALVADOR, G.; CÔNSOLI, F.L. Changes in the hemolymph and fat body metabolites of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) parasitized by *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, v. 45, p. 103-110, 2008.

SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J.C.M. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP2, 2006. 415 p.

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

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

SKOROSZEWSKI, R.W.; VAN HAMBURG, H. The release of *Apanteles flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) against stalk-borers of maize and grain sorghum in South Africa. **Journal of the Entomological Society of Southern Africa**, v. 50, p. 249-255, 1987.

SULLIVAN, D.J.; VÖLKL, W. Hyperparasitism: Multitrophic ecology and behavior. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 291-315, 1999.

UÇKAN, F.; GÜLEL, A. Age-related fecundity and sex ratio variation in *Apanteles galleriae* (Hym., Braconidae) and host effect on fecundity and sex ratio of its hyperparasitoid *Dibrachys boarmiae* (Hym., Pteromalidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 126, p. 534-537, 2002.

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

VAN LENTEREN, J.C. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl**, v. 57, p. 1-20, 2012.

VARGAS, E.L.; PEREIRA, F.F.; TAVARES, M.T.; PASTORI, P.L. Record of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Diatraea* sp.

(Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane crop in Brazil. **Entomotropica**, v. 26, p. 143-146, 2011.

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

YANG, N.W.; WAN, F.H. Host suitability of different instars of *Bemisia tabaci* biotype B for the parasitoid *Eretmocerus hayati*. **Biological Control**, v. 59, p. 313–317, 2011.

ZHU, C.D; HUANG, D.W. A taxonomic study on Eulophidae from Zhejiang, China. **Acta Zootaxonômica Sinica**, v. 26, p. 533-547, 2001.

CAPÍTULO 1

**Registro de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae)
parasitando *Diatraea* sp. (Lepidoptera: Crambidae) em
plântio de cana-de-açúcar no Brasil**

(Entomotropica, v. 26, p. 143-146, 2011)

**REGISTRO DE *Tetrastichus howardi* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE)
PARASITANDO *Diatraea* sp. (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) EM PLANTIO
DE CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL**

RESUMO: O controle biológico tem sido considerado uma alternativa viável para o controle de pragas e novas pesquisas estão sendo realizadas constantemente para encontrar novos inimigos naturais ou melhorar a eficiência dos já conhecidos. Registramos *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) parasitando lagarta e pupa da *Diatraea* sp. (Lepidoptera: Crambidae). Uma pupa de *Diatraea* sp. parasitada por *T. howardi* foi coletada em plantio de cana-de-açúcar no município de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. São apresentados dados sobre o parasitismo de lagartas de *D. saccharalis*, em laboratório, por *T. howardi*. Estes resultados indicam que *T. howardi* parasitou e se desenvolveu em lagarta e pupa de *Diatraea* sp., com isso, seu potencial como agente de controle biológico deve ser investigado.

Palavras-chave: controle biológico, interação hospedeiro-parasitoide, hiperparasitismo, *Saccharum officinarum*; broca-da-cana.

ABSTRACT: Biological control has been considered a viable alternative for pest control and new research is being carried out constantly to find new natural enemies or improve the efficiency of known ones. We record *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing larvae and pupae of *Diatraea* sp. (Lepidoptera: Crambidae). *Diatraea* sp. pupae parasitized by *T. howardi* were collected in sugarcane fields in Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil. Data on parasitism of *D. saccharalis* larvae in laboratory by *T. howardi* are presented. These results indicate that *T. howardi* parasitizes and develops in *Diatraea* sp. larvae and pupae and the potential as a biocontrol agent should be investigated.

Keywords: biological control, host-parasitoid interactions, hyperparasitism, *Saccharum officinarum*, sugarcane borer.

1. INTRODUÇÃO

Diatraea sp. (Lepidoptera: Crambidae) é uma praga da cana-de-açúcar amplamente distribuída e que causa grandes danos nessa cultura (BOTELHO et al., 1999; MACEDO e ARAÚJO, 2000). Atualmente, estudos visando o controle biológico dessa praga, por meio da utilização de parasitoides de ovo, lagarta e pupa estão sendo conduzidos por pesquisadores da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Tetrastichus howardi (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) é uma espécie asiática, amplamente distribuída do norte da Austrália ao norte da China e oeste do Paquistão (LA SALLE e POLASZEK, 2007). Na África do Sul foram feitas liberações

de *T. howardi* para o controle biológico de *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) (LA SALLE e POLASZEK, 2007), *Chilo partellus* (Swinhoe, 1885) (Pyralidae) e *Helicoverpa armigera* (Hubner, 1808) (Noctuidae) (MOORE e KFIR, 1995a). Em Trinidad, este parasitoide foi introduzido como um potencial agente de controle biológico de *Diatraea* spp. (BENNETT, 1965), sendo liberado em plantios de cana-de-açúcar em Cuba (GONZÁLEZ et al., 2003a; GONZÁLEZ et al., 2003b) resultando em uma porcentagem de 20,00% de parasitismo (FELIX et al., 2005). No Brasil, *T. howardi* foi relatado em pupas de *P. xylostella* no Estado de Pernambuco (SILVA-TORRES et al., 2010) e em pupas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) na cultura do milho, no Estado de Minas Gerais (CRUZ et al., 2011).

Tetrastichus howardi é um endoparasitoide gregário e hiperparasitoide facultativo (PRUTZ et al., 2004). Ele pode se desenvolver tanto como um parasitoide primário ou secundário (SULLIVAN e VÖLKL, 1999), sendo capaz de discriminar entre os hospedeiros parasitados e não parasitados; inicialmente prefere os parasitados, porém dois dias depois prefere hospedeiros não parasitados (MOORE e KFIR, 1995b). As espécies de *Tetrastichus* são consideradas idiobiontes. Em condições de laboratório, *T. howardi* se desenvolveu em mantódeos, lepidópteros, coleópteros, dípteros, e espécies de himenópteros (BENNETT, 1965; MOORE e KFIR, 1995a; MOORE e KFIR, 1995b; KFIR et al., 1993; KFIR, 1997; FELIX et al., 2005; BAITHA et al., 2004; PRASAD et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi registrar a ocorrência de *T. howardi* parasitando pupa de *Diatraea* sp. em plantio de cana-de-açúcar em Dourados, Mato Grosso do Sul. Além disso, avaliou-se o parasitismo e desenvolvimento de *T. howardi* em lagartas de *D. saccharalis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Durante a instalação de um experimento, uma pupa de *Diatraea* sp. foi coletada em colmo de cana-de-açúcar, em plantio situado na Fazenda Experimental da UFGD (22°14'1.333"S, 54°59'15.462"W, 530m). A pupa foi colocada em um tubo de vidro (2,5 x 14 cm) e mantida em câmara climatizada à 25 ± 1°C, 60 ± 10% de umidade relativa e fotofase de 14 horas. Uma amostra com parasitoides fixados em álcool 85%

foram encaminhados ao Departamento de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Espírito Santo, para identificação.

Os adultos do parasitoide foram mantidos, no laboratório, em tubos de vidro (2,5 x 14 cm) vedados com algodão e alimentados com gotas de mel puro. Para a multiplicação do parasitoide, pupas de *D. saccharalis* (24 a 48h de idade) foram expostas ao parasitismo por 24h. Após esse período, as pupas foram individualizadas em tubos de vidro e mantidas em câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14h, até a emergência de adultos.

Para avaliar o parasitismo e desenvolvimento do parasitoide, quinze lagartas de quinto ínstar de *D. saccharalis* foram isoladas em placas de Petri (9,0 x 1,5 cm). Cada lagarta foi exposta ao parasitismo por cinco fêmeas de *T. howardi* por 72 h. Após esse período, os parasitoides foram removidos e as lagartas do hospedeiro foram mantidas em câmara climatizada à $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14h até a emergência dos parasitoides.

3. RESULTADOS

Após 14 dias, 36 parasitoides (91,6% de fêmeas) emergiram da pupa coletada no campo. O parasitoide foi identificado pelo Dr. Marcelo Teixeira Tavares, como *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae), sendo este o primeiro registro dessa espécie parasitando naturalmente *Diatraea* sp. em plantio de cana-de-açúcar no Brasil. Espécime *voucher* do parasitoide foi depositada na coleção permanente do Departamento de Ciências Biológicas na UFES, Brasil.

O parasitismo de uma lagarta de *D. saccharalis* por *T. howardi*, em condições de laboratório, foi outro fato inédito. O ciclo de vida de *T. howardi* na lagarta de *D. saccharalis* foi de 23 dias, com progênie de 170 indivíduos (92,3% de fêmeas), oriundos de um único hospedeiro.

4. DISCUSSÃO

Tetrastichus spp. são parasitoides de larva-pupa. O desenvolvimento de *T. howardi* em duas fases de *D. saccharalis* (lagarta e pupa) é um fato significativo para o aumento da eficiência do controle biológico desta praga, possivelmente aliado a um efeito combinado com outras espécies parasitoides, como *Trichogramma galloi* Zucchi,

1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae), que são utilizados pelos produtores de cana para controlar *D. saccharalis* (BOTELHO et al., 1999). Assim, o uso do controle biológico é importante para a manutenção do equilíbrio populacional de insetos-praga em áreas agrícolas e florestais (PRUTZ et al., 2004, NOFEMELA e KFIR, 2005; PEREIRA et al., 2008; PEREIRA et al., 2010). Por essa razão, o incremento de agentes de controle biológico presentes no agroecossistema é prioritário, especialmente visando a redução dos custos aos produtores e de impactos negativos ao agroecossistema (MONTEIRO et al., 2006).

Tetrastichus howardi parasitou lagarta e pupa de *Diatraea* sp. No entanto, para sua utilização no controle biológico, devem-se aprimorar os métodos de criação, investigar sua dispersão no campo e sua associação com parasitoides de ovos (*T. galloi*) e larvas (*C. flavipes*).

5. CONCLUSÕES

Tetrastichus howardi ocorre naturalmente em cultivos de cana-de-açúcar de Dourados, Mato Grosso do Sul.

Tetrastichus howardi parasitou duas fases de desenvolvimento do hospedeiro *D. saccharalis*, lagarta e pupa.

6. AGRADECIMENTOS

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

7. REFERÊNCIAS

BAITHA, A.; JALALI, S.K.; RABINDRA, R.J.; VENKATESAN, T.; RAO, N.S. Parasitizing efficiency of the pupal parasitoid, *Tetrastichus howardi* (Olliff)

(Hymenoptera: Eulophidae) on *Chilo partellus* (Swinhoe) at different exposure periods. **Journal of Biological Control**, v. 18, p. 65-68, 2004.

BENNETT, F.D. Tests with parasites of Asian graminaceous moth-borers on *Diatraea* and allied genera in Trinidad. **Technical Bulletin of the Commonwealth Institute of Biological Control**, v. 5, p. 101-116, 1965.

BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P.; CHAGAS NETO, J.F.; OLIVEIRA, C.P.B. Associação do parasitoide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do parasitoide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) no controle de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, p. 491-496, 1999.

CRUZ, I.; REDOAN, A.C.; SILVA, R.B.; FIGUEIREDO, M.L.C.; PENTEADO-DIAS AM. New record of *Tetrastichus howardi* (Olliff) as a parasitoid of *Diatraea saccharalis* (Fabr.) on maize. **Scientia Agricola**, v. 68, p. 252-254, 2011.

FELIX, J.; GONZÁLEZ, A.; OCA, F.N.M.; RAVELO, H.G.; BAITHA, A. Interaction of *Lixophaga diatraeae* (Townsend) and *Tetrastichus howardi* (Olliff) for management of *Diatraea saccharalis* (Fabr.) in Cuba. **Sugar Tech**, v. 7, p. 5-8, 2005.

GONZÁLEZ, J.F.A.; OCA, F.N.M.; RAVELO, H.G. Bio-ecological studies of *Tetrastichus howardi* Olliff. (Hymenoptera: Eulophidae), pupal parasite of *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) in Cuba. **Centro Agrícola**, v. 30, p. 37-41, 2003a.

GONZÁLEZ, J.F.A.; OCA, F.N.M.; RAVELO, H.G. *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae) nuevo parásito pupal de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) en Cuba. **Centro Agrícola**, v. 30, p. 93, 2003b.

KFIR, R.; GOUWS, S.; MOORE, S.D. Biology of *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae): a facultative hyperparasitoid of stem borers. **Biocontrol Science and Technology**, v. 3, p. 149-159, 1993.

KFIR, R. Parasitoids of *Plutella xylostella* (Lep.: Plutellidae) in South Africa: An annotated list. **Entomophaga**, v. 42, p. 517-523, 1997.

LA SALLE, J.; POLASZEK, A. Afrotropical species of the *Tetrastichus howardi* species group (Hymenoptera: Eulophidae). **African Entomology**, v. 15, p. 45-56, 2007.

MACEDO, N.; ARAUJO, J.R. Efeitos da queima do canavial sobre parasitoides de larvas e de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p. 79-84, 2000.

MONTEIRO, L.B.; SOUZA, A.; PASTORI, P.L. Comparação econômica entre o controle biológico e químico para o manejo de ácaro-vermelho em macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 514-517, 2006.

- MOORE, S.D.; KFIR, R. Aspects of the biology of the parasitoid, *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae). **Journal of African Zoology**, v. 109, p. 455-466, 1995a.
- MOORE, S.D.; KFIR, R. Host preference of the facultative hyperparasitoid *Tetrastichus howardi* (Hym.: Eulophidae). **Entomophaga**, v. 40, p. 69-76, 1995b.
- NOFEMELA, R.S.; KFIR, R. The role of parasitoids in suppressing diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), populations on unsprayed cabbage in the North West Province of South Africa. **African Entomology**, v. 13, p. 71-83, 2005.
- PEREIRA, F.F.; ZANUNCIO, J.C.; TAVARES, M.T.; PASTORI, P.L.; JACQUES, G.C.; VILELA, E.F. New record of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) as a parasitoid of the eucalypt defoliator *Thyrintea arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) in Brazil. **Phytoparasitica**, v. 36, p. 304-306, 2008.
- PEREIRA, F.F.; ZANUNCIO, J.C.; PASTORI, P.L.; CHICHERA, R.A.; ANDRADE, G.S.; SERRÃO, J.E. Reproductive biology of *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) with alternative and natural hosts. **Zoologia**, v. 27, p. 887-891, 2010.
- PRASAD, K.S.; ARUNA, A.S.; KUMAR, V.; KARIAPPA, B.K. Feasibility of mass production of *Tetrastichus howardi* (Olliff), a parasitoid of leaf roller (*Diaphania pulverulentalis*), on *Musca domestica* (L.). **Indian Journal of Sericulture**, v. 46, p. 89-91, 2007.
- PRÜTZ, G.; BRINK, A.; DETTNER, K. Transgenic insect-resistant corn affects the fourth trophic level: Effects of *Bacillus thuringiensis*-corn on the facultative hyperparasitoid *Tetrastichus howardi*. **Naturwissenschaften**, v. 91, p. 451-454, 2004.
- SILVA-TORRES, C.S.A.; PONTES, I.V.A.F.; TORRES, J.B.; BARROS, R. New records of natural enemies of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) in Pernambuco, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 39, p. 835-838, 2010.
- SULLIVAN, D.J.; VÖLKL, W. Hyperparasitism: Multitrophic ecology and behavior. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 291-315, 1999.

CAPÍTULO 2

Multiplicação de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) por sucessivas gerações em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE *Tetrastichus howardi*
(HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) MANTIDO EM PUPAS DE *Diatraea*
***saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) POR SUCESSIVAS GERAÇÕES**

RESUMO: O sucesso do controle biológico com parasitoides está relacionado com a qualidade na produção massal desses inimigos naturais. As características biológicas de *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) multiplicados por 25 gerações sucessivas em pupas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) foram avaliadas. O estudo das gerações iniciou-se com parasitoides adultos provenientes de pupa de *Diatraea* sp. coletada em plantio de cana-de-açúcar. Cada pupa de *D. saccharalis* foi individualizada em tubo de vidro (16 x 100 mm) e exposta ao parasitismo por uma fêmea de *T. howardi* por 24h a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h. Doze fêmeas descendentes da primeira geração foram selecionadas ao acaso e individualizadas em tubos de vidro, cada uma exposta a pupa de *D. saccharalis* nas mesmas condições mencionadas anteriormente, para compor a segunda geração de *T. howardi*. Esse procedimento foi repetido sucessivamente até a geração F25. A reprodução de *T. howardi* em pupas de *D. saccharalis* por 25 gerações sucessivas não compromete a qualidade biológica do parasitoide.

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

ABSTRACT: The success of biological control with parasitoids is related to quality in mass production of these natural enemies. The biological characteristics of *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) reared for 25 successive generations in pupae of *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) were evaluated. The study of generations initiated with adults parasitoids from pupa of *Diatraea* sp. collected in sugarcane fields in Dourados, Mato Grosso do Sul. Each pupa of *D. saccharalis* was individualized in a glass tube (16 x 100mm) and exposed to parasitism by a female *T. howardi* for 24h at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, relative humidity of $60 \pm 10\%$ and photophase of 14h. Twelve female descendants of the first generation were randomly selected and individually placed in glass tubes, each exposed to pupae of *D. saccharalis* the same conditions mentioned above, to form the second generation *T. howardi*. This procedure was repeated successively until the F25 generation. The reproduction of *T. howardi* in pupae of *D. saccharalis* for 25 successive generations did not compromised the biological quality of the parasitoid.

Keywords: quality control; laboratory rearing; biological control; reproductive performance.

1. INTRODUÇÃO

O sucesso do controle biológico com parasitoides está relacionado com a qualidade na produção massal, pois inimigos naturais produzidos de forma adequada apresentam capacidade para localizar e parasitar o hospedeiro quando liberados no

campo (PREZOTTI e PARRA, 2002; GANDOLFI et al., 2003; VREYSEN e ROBINSON, 2010). O controle de qualidade visa determinar se um inimigo natural, após gerações sucessivas em laboratório continua eficiente no controle de pragas (VAN LENTEREN, 2009).

A criação de inimigos naturais em laboratório pode favorecer a maior produção de indivíduos homozigóticos por meio da endogamia, em relação às populações de ambientes naturais e em muitos casos, esses indivíduos possuem caracteres indesejáveis (SORENSEN et al., 2012). O desempenho de parasitoides, mantidos em laboratório durante muitas gerações, pode sofrer alterações genéticas das populações por constituírem apenas uma pequena amostra da variabilidade genética presente na espécie e, portanto, podem não se adaptar à criação em laboratório (DIAS et al., 2008). Uma forma de minimizar o problema de endogamia é a obtenção de grandes populações desses indivíduos para manter uma variação genética suficientemente ampla (BARTLETT, 1985). O tamanho ideal de uma população fundadora é variável em função da espécie e em muitos casos, o tamanho da população inicial não é importante, especialmente se o número de indivíduos aumenta significativamente durante as primeiras gerações (PREZOTTI et al., 2004).

A degeneração das criações de laboratório é percebida pela ocorrência de alterações no tamanho, no período de desenvolvimento, na fecundidade, na razão sexual, longevidade e no comportamento do parasitoide (VINSON e IWANTSCH, 1980; GANDOLFI et al., 2003; VACARI et al., 2012). No entanto, mesmo com o estabelecimento da criação do parasitoide em laboratório, é importante obter periodicamente novos indivíduos coletados no campo para a melhoria das criações já instaladas (MCEWEN, 1997), e reduzir as chances de possíveis perdas de qualidade desse inimigo natural.

A determinação da qualidade de parasitoides produzidos em laboratório é feita pela avaliação de características biológicas expressas por esses inimigos naturais após sucessivas gerações. Dentre os caracteres avaliados citam-se o número de descendentes, razão sexual, fecundidade, longevidade, tamanho do adulto, envergadura da asa, atividade de vôo e desempenho em campo (HARVEY, 2000; WAJNBERG, 2004; GONÇALVES et al., 2005; DAHA, 2011; RULL et al., 2012).

A qualidade do parasitoide está vinculada à qualidade do seu hospedeiro. O desenvolvimento e sobrevivência dos parasitoides imaturos são influenciados pelo tamanho, idade, estado nutricional, condições sanitárias, fase do hospedeiro parasitado e

espécies hospedeiras (SEQUEIRA e MACKAUER, 1992; HARVEY et al., 1994; HARVEY, 2000; SIMÕES et al., 2012). Isso porque o consumo e utilização de alimento constituem condição básica para o crescimento, desenvolvimento e a reprodução do parasitoide gregário, uma vez que a quantidade e qualidade do alimento utilizado na fase larval afeta o desempenho reprodutivo dos adultos (GODFRAY, 1994; HOHMANN e LUCK, 2004; DAHA, 2011).

Tetrastichus howardi (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) foi encontrado parasitando larvas de *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) em cultivo orgânico de couve, na cidade de Chã Grande, Pernambuco (SILVA-TORRES et al., 2010). Esse parasitoide também foi coletado de pupas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) em colmos de plantas de milho no município de Sete Lagoas, Minas Gerais (CRUZ et al., 2011). Em 2009, foi coletada uma pupa de *Diatraea* sp. parasitada por *T. howardi* em plantio de cana-de-açúcar no município de Dourados, Mato Grosso do Sul (VARGAS et al., 2011).

A ocorrência do parasitoide no Estado, cujo cultivo da cana-de-açúcar é bastante significativo, estimula o desenvolvimento de pesquisas visando a utilização de *T. howardi* como mais uma alternativa para o controle de *D. saccharalis* e a criação massal é a etapa inicial para seu uso no controle biológico. Esse processo depende do seu desenvolvimento adequado, para obtenção de inimigos naturais com qualidade (PREZOTTI et al., 2002; PRATISSOLI et al., 2005). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características biológicas de *T. howardi* multiplicado por 25 gerações sucessivas em pupas de *D. saccharalis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Local de condução do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Entomologia/Controle Biológico (LECOBIOL) da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) em Dourados, Mato Grosso do Sul.

Criação de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)

Pupas de *D. saccharalis* cedidas pela empresa BUG – Agentes Biológicos foram separadas por sexo e colocadas em gaiolas de PVC (100 x 220 mm) para a formação de adultos. Essas gaiolas contendo 20 machos e 30 fêmeas desse lepidóptero foram

revestidas internamente com folhas de papel sulfite umedecido, onde as fêmeas, após o acasalamento, ovipositaram. As folhas de papel sulfite contendo os ovos foram imersas em água e sulfato de cobre (1,0%) durante dois minutos para desinfecção e colocadas para secar em varais. Depois de seco, o papel foi recortado de acordo com os espaços em que os ovos se encontravam e colocado em placas de Petri contendo um chumaço de algodão umedecido em sulfato de cobre, para evitar o ressecamento e contaminação dos ovos. Próximo à eclosão das lagartas de *D. saccharalis* (ovos escurecidos), essas posturas foram colocadas em frascos de vidro (500 mL) vedados contendo dieta artificial modificada de Hensley e Hammond (1968), a base de farelo de soja, germe de trigo, vitaminas e sais minerais (Anexo A). Após a inoculação dos ovos os frascos foram acondicionados em estantes de aço e mantidos em sala climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12h. Ao atingir o terceiro ínstar, as lagartas foram transferidas para placas de Petri descartáveis (60 x 16 mm) contendo dieta de realimentação (semelhante a dieta de alimentação, exceto pela adição de ácido acético e remoção de sais de Wesson e germe de trigo), onde permaneceram até a formação de pupas (GARCIA et al., 2009).

Criação de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae)

A criação de *T. howardi* no LECOBIOL iniciou-se em outubro de 2009. Parasitoides adultos foram provenientes de uma pupa de *Diatraea* sp. coletada em plantio de cana-de-açúcar na Fazenda Experimental das Ciências Agrárias (FAECA) da UFGD (VARGAS et al., 2011).

Os adultos de *T. howardi* foram mantidos em tubos de vidro (16 x 100 mm) vedados com algodão e alimentados com gotas de mel puro. Cada pupa de *D. saccharalis* com 48h de idade foi exposta a três fêmeas de *T. howardi* (Apêndice A) por 24h para a criação do parasitoide. Após esse período as pupas foram individualizadas em tubos de vidro e mantidas em câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14h, até a emergência dos adultos do parasitoide (VARGAS et al., 2011).

Desenvolvimento experimental

A avaliação das gerações foi iniciada com os parasitoides adultos provenientes de única pupa de *Diatraea* sp. coletada em plantio de cana-de-açúcar (VARGAS et al., 2011). Pupas de *D. saccharalis*, com 48h de idade e peso entre 0,160 a 0,200 g

(GLAESER, 2011), foram colocadas em tubos de vidro (16 x 100 mm) e expostas ao parasitismo por uma fêmea de *T. howardi* por 24h.

Após este período, a fêmea de *T. howardi* foi retirada e as pupas permaneceram individualizadas em tubos de vidro e mantidas em câmara climatizada à $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h até a emergência dos adultos de *T. howardi* (VARGAS et al., 2011). Doze fêmeas descendentes da geração F1 foram selecionadas ao acaso e individualizadas em tubos de vidro, cada uma com uma pupa de *D. saccharalis* nas mesmas condições mencionadas anteriormente, para compor a geração F2 de *T. howardi*. Esse procedimento foi repetido sucessivamente até a geração F25 de *T. howardi* em pupas de *D. saccharalis*.

As características biológicas avaliadas para cada uma das gerações (F1, F3, F5, F7, F9, F11, F13, F15, F17, F19, F21, F23 e F25) foram: a porcentagem de pupas parasitadas [(número de pupas de *D. saccharalis* com emergência de parasitoides + pupas sem emergência de adultos de *D. saccharalis*)/(número total de pupas) $\times 100$]; porcentagem de pupas com emergência de parasitoides [(número de pupas de *D. saccharalis* com emergência de adultos dos parasitoides)/(número de pupas parasitadas) $\times 100$]; a progênie (número de parasitoides emergidos por pupa de *D. saccharalis*); a duração do ciclo vida (ovo-adulto) (dias); a longevidade média em dias (para avaliação dessa variável foram selecionados ao acaso 20 fêmeas e 10 machos de *T. howardi* de cada tratamento, sendo esses parasitoides no dia de sua emergência, individualizados em tubos de ensaio contendo uma gota de mel, onde permaneceram até a sua morte); o tamanho da cápsula cefálica (para avaliação dessa característica foram escolhidos ao acaso em cada tratamento, 15 fêmeas e 15 machos de *T. howardi*, visando medir a largura da cápsula cefálica em ocular micrométrica) e a razão sexual (RS= número de fêmeas/ número de adultos) de *T. howardi*.

O sexo dos adultos de *T. howardi* foi determinado de acordo com características morfológicas da antena, sendo que as fêmeas apresentam funículo das antenas pigmentado e com três segmentos e nos machos, o funículo contém quatro segmentos e apenas a clava é pigmentada (LA SALLE e POLASZEK, 2007). A mortalidade natural do hospedeiro foi corrigida pela fórmula de Abbott (1925) nas condições do experimento, com pupas de *D. saccharalis* individualizadas em tubos de vidro (16 x 100 mm) sem parasitoides.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 13 tratamentos (gerações avaliadas do parasitoide) e 12 repetições. Para avaliação das características

biológicas de *T. howardi* os valores das médias foram constituídos por um grupo de quatro pupas, que corresponderam às seguintes gerações: F1, F3, F5, F7, F9, F11, F13, F15, F17, F19, F21, F23 e F25. Os dados das características biológicas avaliadas foram submetidos à análise de variância e quando significativo a 5% de probabilidade foi realizado o teste de Scott-Knott. Esse teste foi escolhido pois os dados não se ajustaram a modelos de regressão que explicassem os dados biológicos.

3. RESULTADOS

O período de tempo para obtenção de 25 gerações de *T. howardi* em pupas de *D. saccharalis* foi de 17 meses.

O parasitismo não foi afetado pelo número de gerações avaliadas de *T. howardi* em pupas de *D. saccharalis*, apresentando média de $97,43 \pm 1,11$ ($p > 0,05$) (Tabela 1). Observaram-se diferenças significativas na emergência desse parasitoide em 25 gerações consecutivas ($F = 2,967$; $p = 0,0098$) (Tabela 1).

A duração do ciclo (ovo-adulto) de *T. howardi* criado por gerações sucessivas em pupas de *D. saccharalis* variou de $17,00 \pm 0,00$ (F21) a $25,67 \pm 0,33$ dias (F23) ($F = 89,995$; $p = 0,0000$) (Tabela 1).

Todas as gerações apresentaram maiores valores de progênie quando comparada a primeira geração. Entretanto, para algumas gerações estes valores não diferiram estatisticamente, sendo observada uma oscilação da progênie entre $56,25 \pm 5,73$ (F1) e $135,66 \pm 4,40$ (F19) indivíduos ($F = 6,202$; $p = 0,0001$) (Tabela 1).

A criação sucessiva de *T. howardi* em pupas de *D. saccharalis* não afetou a razão sexual, apresentando média de $0,93 \pm 0,01$ (Tabela 1).

A longevidade de fêmeas ($F = 16,239$; $p = 0,0000$) e machos ($F = 7,645$; $p = 0,0000$) foi maior na nona geração de *T. howardi*, totalizando $39,00 \pm 2,24$ e $38,40 \pm 2,76$ dias, respectivamente (Tabela 2). O tamanho da cápsula cefálica de *T. howardi* diferiu significativamente entre as 25 gerações deste parasitoide em pupas de *D. saccharalis*, variando de 0,51 a 0,62 mm para fêmeas ($F = 10,899$; $p = 0,0000$) e de 0,42 a 0,49 mm para machos ($F = 6,039$; $p = 0,0000$) (Tabela 2).

4. DISCUSSÃO

A manutenção de altas porcentagens de parasitismo (97,43%) indica a qualidade das criações de *T. howardi* em pupas de *D. saccharalis* por 25 gerações sucessivas. A multiplicação de *T. howardi* somente no hospedeiro natural pode ter favorecido sua capacidade de parasitismo ao longo das gerações. Uma vez que, parasitoides criados em hospedeiros alternativos podem antecipar a redução na qualidade biológica, como ocorreu com *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) que apresentou decréscimo na taxa de parasitismo ao ser multiplicado por 22 gerações em ovos de *Sitotroga cerealella* (Olivier, 1789) (Lepidoptera: Gelechiidae) (GONÇALVES et al., 2003).

O número de pupas com emergência de *T. howardi* foi influenciado pelas sucessivas gerações. No entanto, a porcentagem de emergência foi superior a 75%, o que representa um valor satisfatório para manutenção das criações de *T. howardi* em laboratório. Altas porcentagens de emergência em laboratório é uma característica favorável para liberações massais de parasitoides, principalmente quando associadas a um bom parasitismo (DIAS et al., 2008).

O número de geração em laboratório influenciou a duração do ciclo de *T. howardi*. O período de desenvolvimento do parasitoide gregário dentro de um hospedeiro é afetado pelo número de imaturos em desenvolvimento (DORN e BECKAGE, 2007). Sendo assim, reduções nesse período estão relacionadas a menor disponibilidade de alimento e podem contribuir para o aumento do número de gerações produzidas em laboratório. Já o incremento no tempo de desenvolvimento pode ser utilizado pelo indivíduo para explorar de forma mais completa o recurso do hospedeiro (DOYON e BOIVIN, 2005). A disponibilidade de alimento pode prolongar ou reduzir o período ovo-adulto de *T. howardi* em pupas de *D. saccharalis*.

A progênie de *T. howardi* apresentou um aumento após as primeiras gerações em laboratório. Isso acontece porque o parasitoide necessita de um período para adaptar-se às novas condições e expressar suas características biológicas (PREZOTTI e PARRA, 2002). Da geração F5 a F13, o número de parasitoides emergidos por pupa apresentaram valores mais próximos. Na geração F25 o número de parasitoides reduziu próximo aos valores obtidos na primeira geração de *T. howardi*.

A razão sexual de *T. howardi* emergidos por pupa de *D. saccharalis* não se alterou durante 25 gerações. Isso evidencia um importante fator de qualidade, pois são

as fêmeas que causam a mortalidade do hospedeiro e, portanto, realizam o controle biológico dos insetos pragas nas culturas. A razão sexual favorece a retenção dos parasitoides nas culturas e a proporção de 60% de fêmeas nas liberações é o suficiente para um controle eficiente (CAMPOS-FARINHA et al., 2000; VACARI et al., 2012). A proporção de fêmeas de *T. howardi* foi superior a 85% nas sucessivas gerações, o que demonstra a adequação da razão sexual nessas criações.

A longevidade de fêmeas e machos alimentados atingiu períodos superiores a 30 dias, sendo a maior longevidade observada na nona geração. O aumento da longevidade é considerado benéfico nas criações de agentes de controle biológico, pois garante a sobrevivência durante os procedimentos operacionais e favorece a maior permanência dos inimigos naturais nas culturas (SORENSEN et al., 2012).

A variação do tamanho da cápsula cefálica foi menor nos machos de *T. howardi* do que nas fêmeas. Isso pode ser devido às fêmeas parasitoides serem mais exigentes nutricionalmente do que os machos (GODFRAY, 1994; LI e SUN, 2011). Os parasitoides maiores apresentam vantagem competitiva e as fêmeas maiores possuem maior capacidade reprodutiva, maior longevidade e maior capacidade de busca por hospedeiros (GODFRAY, 1994; ELLERS et al., 1998; LYKOURESSIS et al., 2009). Neste contexto, é importante a manutenção de parasitoides maiores na criação sucessiva de *T. howardi* em laboratório.

A obtenção de parasitoides com qualidade em criações de laboratório é dependente da produção de hospedeiros de qualidade. A criação de *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) em lagartas de *D. saccharalis* infectadas por *Nosema* sp. influenciou na biologia de quatro gerações deste parasitoide, reduzindo a fertilidade, fecundidade e capacidade de localizar o hospedeiro (SIMÕES et al., 2012). Esse resultado é um indicativo de que as pupas de *D. saccharalis* devem ser criteriosamente selecionadas para a criação de *T. howardi*. Além disso, são necessários cuidados com a assepsia do laboratório e com a manipulação no preparo da dieta artificial para a criação de *D. saccharalis*, visando à qualidade dos insetos produzidos.

Sugere-se também, como medida para manter a qualidade dos parasitoides produzidos, estimular a variabilidade dos insetos criados massalmente por meio do uso de instalações com diferentes temperaturas, umidades e período de luz (VAN LENTEREN e BIGLER, 2010). Além disso, manter linhagens separadas no laboratório para um posterior cruzamento e multiplicar os parasitoides em diferentes espécies de

hospedeiros (VAN LENTEREN, 2009; GLAESER, 2011), são ações pertinentes para manutenção da qualidade da população.

A capacidade reprodutiva de *T. howardi* não foi afetada pela criação sucessiva durante três gerações no hospedeiro alternativo *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) e posterior criação no hospedeiro natural *D. saccharalis* (OLIVEIRA, 2013). Alternar a criação de *T. howardi* em pupas de *T. molitor* e *D. saccharalis* pode minimizar os efeitos da redução da variabilidade genética deste parasitoide.

Outra forma para inserir novos genes nas criações de laboratório é a coleta e introdução de indivíduos selvagens (CANCINO et al., 2002) e esse procedimento deve ser realizado antes que a população do laboratório apresente qualquer alteração ou redução na variabilidade genética (VAN LENTEREN e BIGLER, 2010). A qualidade das criações de *T. howardi* em pupas de *D. saccharalis* foi mantida após 25 gerações sucessivas em laboratório, mesmo assim, esse fato não impede a introdução de novos indivíduos para garantir a manutenção dessa qualidade.

A criação de *T. howardi* em pupas de *D. saccharalis* a partir de indivíduos obtidos de uma única pupa (coletada em plantio de cana-de-açúcar) por 25 gerações sucessivas não afetou o parasitismo e a razão sexual dos descendentes de *T. howardi*. Houveram variações na progênie, ciclo de vida, longevidade e tamanho da cápsula cefálica deste parasitoide, apesar disto, essas características mantiveram-se em níveis aceitáveis de qualidade (ausência de reduções drásticas das variáveis).

5. CONCLUSÃO

A criação de *T. howardi* em pupas de *D. saccharalis* por 25 gerações sucessivas não compromete a qualidade biológica do parasitoide.

6. AGRADECIMENTOS

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

7. REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal Economy Entomology**, v. 18, p. 265-267, 1925.
- BARTLETT, A.C. Guidelines for genetic diversity in laboratory colony establishment and maintenance. In: SINGH, P.; MOORE, R.F. (Ed.). **Handbook of insect rearing**. Amsterdam: Elsevier, 1985. p. 7-17.
- CAMPOS-FARINHA, A.E.C.; CHAUD-NETTO, J.; GOBBI, N. Biologia reprodutiva de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). IV. Discriminação entre lagartas parasitas e não parasitadas de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae) tempo de desenvolvimento e razão sexual dos parasitoides. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, p. 229-234, 2000.
- CANCINO, J.; CANCINO, J.L.; MARTÍNEZ, M.; LIEDO, P. Quality Control Parameters of Wild and Mass Reared *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead), A Fruit Fly Parasitoid. In: LEPLA, N.C; BLOEM, K.A.; LUCK, R.F. (Eds). **Quality control for mass-rearing Arthropods**. Flórida: IPM, 2002. p. 84-94.
- CRUZ, I.; REDOAN, A.C.; SILVA, R.B.; FIGUEIREDO, M.L.C.; PENTEADO-DIAS, A.M. New record of *Tetrastichus howardi* (Olliff) as a parasitoid of *Diatraea saccharalis* (Fabr.) on maize. **Scientia Agricola**, v. 68, p. 252-254, 2011.
- DAHA, L. Parasitoid Quality of *Gronotoma micromorpha* Parasitizing *Liriomyza huidobrensis* on Chinese Cabbage and Soybean. **Journal of Biosciences**, v. 18, p. 113-117, 2011.
- DIAS, N.S.; PARRA, J.R.P.; LIMA, T.C.C. Seleção de hospedeiro alternativo para três espécies de tricogramatídeos neotropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1467-1473, 2008.
- DORN, S.; BECKAGE, N. Superparasitism in gregarious hymenopteran parasitoids: ecological, behavioural and physiological perspectives. **Physiological Entomology**, v. 32, p. 199-211, 2007.
- DOYON, J.; BOIVIN, G. The effect of development time on the fitness of female *Trichogramma evanescens*. **Journal of Insect Science**, v. 5, p. 1-5, 2005.
- ELLERS, J.; VAN ALPHEN, J.J.M.; SEVENSTER, J.G. A field study of size-fitness relationships in the parasitoid *Asobara tabida*. **Journal of Animal Ecology**, v. 67, p. 318-324, 1998.
- GANDOLFI, M.; MATTIACCI, L.; DORN, S. Mechanisms of behavioral alterations of parasitoids reared in artificial. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, p. 1871-1887, 2003.
- GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.; MACEDO, L.P.M. Criação do parasitoide *Cotesia flavipes* em laboratório. In: BUENO, V.H.P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: Editora UFLA, 2009. p. 199-219.

GLAESER, D.F. **Características biológicas e comportamentais de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) criado em pupa de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)**. 2011. 89f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS.

GODFRAY, H.C.J. **Parasitoids, Behavioral and Evolutionary Ecology**. Princeton: University Press, 1994. 473p.

GONÇALVES, J.R.; HOLTZ, A.M.; PRATISSOLI, D.; GUEDES, R.N.C. Avaliação da qualidade de *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 25, p. 485-489, 2003.

GONÇALVES, C.I.; AMARO, F.; FIGUEIREDO, E.; GODINHO, M.C.; MEXIA, A. Productivity and quality aspects concerning the laboratory rearing of *Trichogramma* spp. (Hym.: Trichogrammatidae) and its factitious host, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae). **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, v. 31, p. 21-25, 2005.

HARVEY, J.A.; HARVEY, I.F.; THOMPSON, D.J. Flexible larval growth allows use of a range of host sizes by parasitoid wasp. **Ecology**, v. 75, p. 1420-1428, 1994.

HARVEY, J.A. Dynamic effects of parasitism by and endoparasitoid wasp on the two host species: implications for host quality and parasitoid fitness. **Ecological Entomology**, v. 25, p. 267-278, 2000.

HENSLEY, S.D.; HAMMOND, A.H. Laboratory techniques for rearing the sugar cane borer on an artificial diet. **Journal Economy Entomology**, v. 61, p. 1742-1743, 1968.

HOHMANN, C.L.; LUCK, R.F. Effect of host availability and egg load in *Trichogramma platneri* Nagarkatti (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and its consequences on progeny quality. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 413-422, 2004.

LA SALLE, J.; POLASZEK, A. Afrotropical species of the *Tetrastichus howardi* species group (Hymenoptera: Eulophidae). **African Entomology**, v. 15, p. 45-56, 2007.

LI, L.; SUN, J. Host suitability of a gregarious parasitoid on beetle hosts: flexibility between fitness of adult and offspring. **PLoS ONE**, v. 6, p. 1-6, 2011.

LYKOURESSIS, D.; GARANTONAKIS, N.; PERDIKIS, D.; FANTINOU, A.; MAUROMOUSTAKOS, A. Effect of female size on host selection by a koinobiont insect parasitoid (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). **European Journal of Entomology**, v. 106, p. 360-367, 2009.

MCEWEN, P. Sampling, handling and rearing insects. In: DENT, D.R.; WALTON, M. P. (Eds.). **Methods in ecological and agricultural entomology**. Wallingford: Oxford University, 1997. p. 5-26.

OLIVEIRA, F.G. **Multiplicação de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) e de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae).** 2013. 63f. Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS.

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

PREZOTTI, L.; PARRA, J.R.P.; VENCOVSKI, R.; DIAS, C.T.S.; CRUZ, I.; CHAGAS, M.C.M. Teste de vôo como critério de avaliação da qualidade de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae): Adaptação de metodologia. **Neotropical Entomology**, v. 31, p. 411-417, 2002.

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

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

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

SEQUEIRA, R; MACKAUER, M. Nutritional ecology of an insect host-parasitoid association: the pea aphid *Aphis ervi* system. **Ecology**, v. 73, p. 183-189, 1992.

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

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

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

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

2012.

VAN LENTEREN, J.C. Controle de qualidade de agentes de controle biológico produzidos massalmente. In: BUENO, V.H.P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: Editora UFLA, 2009. p. 311-337.

VAN LENTEREN, J.C.; BIGLER, F. Quality Control of Mass Reared Egg Parasitoids. In: CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; ZUCHI, R.A. (Eds.). **Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on *Trichogramma* Progress in Biological Control**. Holanda: Springer, 2010. p. 315-340.

VARGAS, E.L.; PEREIRA, F.F.; TAVARES, M.T.; PASTORI, P.L. Record of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Diatraea* sp. (Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane crop in Brazil. **Entomotropica**, v. 26, p. 143-146, 2011.

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

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

WAJNBERG, E. Measuring genetic variation in natural enemies used for biological control: why and how? In: EHLER, L.E; SFORZA, R.; MATEILLE, T. (Eds.). **Genetics, Evolution and Biological Control**. Cambridge: CAB Publishing, 2004, p. 19-31.

Tabela 1. Parasitismo, emergência, duração do ciclo (ovo adulto) (dias), progênie por pupa e razão sexual (médias \pm erro padrão) de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) criado por 25 gerações em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h.

Gerações de <i>T. howardi</i>	Parasitismo		Emergência		Duração do Ciclo		Progênie por pupa		Razão sexual	
	n	Média \pm EP	n	Média \pm EP	n	Média \pm EP	n	Média \pm EP	n	Média \pm EP
1	12	100,00 \pm 0,00 ^{ns}	12	100,00 \pm 0,00a	12	21,08 \pm 0,17 b	12	56,25 \pm 5,73 b	12	0,93 \pm 0,01 ^{ns}
3	11	91,66 \pm 8,333 ^{ns}	11	91,66 \pm 8,33a	11	18,36 \pm 0,49 e	11	87,05 \pm 19,83 b	11	0,92 \pm 0,05 ^{ns}
5	12	100,00 \pm 0,00 ^{ns}	12	100,00 \pm 0,00a	12	18,17 \pm 0,22 e	12	100,92 \pm 8,66 a	12	0,95 \pm 0,01 ^{ns}
7	11	91,66 \pm 8,333 ^{ns}	10	75,00 \pm 0,000b	10	19,16 \pm 0,25 d	11	88,02 \pm 3,75 b	11	0,96 \pm 0,00 ^{ns}
9	12	100,00 \pm 0,00 ^{ns}	12	100,00 \pm 0,00a	12	17,92 \pm 0,08 e	12	111,58 \pm 4,17 a	12	0,91 \pm 0,01 ^{ns}
11	12	100,00 \pm 0,00 ^{ns}	12	100,00 \pm 0,00a	12	18,17 \pm 0,28 e	12	98,58 \pm 4,43 a	12	0,95 \pm 0,01 ^{ns}
13	12	100,00 \pm 0,00 ^{ns}	12	100,00 \pm 0,00a	12	18,25 \pm 0,25 e	12	119,50 \pm 10,00a	12	0,86 \pm 0,02 ^{ns}
15	12	100,00 \pm 0,00 ^{ns}	12	100,00 \pm 0,00a	12	20,75 \pm 0,66 b	12	73,83 \pm 6,30 b	12	0,93 \pm 0,02 ^{ns}
17	12	100,00 \pm 0,00 ^{ns}	10	83,33 \pm 8,333b	10	19,80 \pm 0,10 c	12	86,83 \pm 0,85 b	12	0,95 \pm 0,00 ^{ns}
19	12	100,00 \pm 0,00 ^{ns}	12	100,00 \pm 0,00a	12	17,92 \pm 0,08 e	12	135,66 \pm 4,40 a	12	0,94 \pm 0,01 ^{ns}
21	11	91,66 \pm 8,333 ^{ns}	10	83,33 \pm 8,333b	10	17,00 \pm 0,00 f	11	111,99 \pm 16,36a	11	0,90 \pm 0,04 ^{ns}
23	11	91,66 \pm 8,333 ^{ns}	10	83,33 \pm 8,333b	10	25,67 \pm 0,33 a	11	69,36 \pm 7,78 b	11	0,93 \pm 0,01 ^{ns}
25	12	100,00 \pm 0,00 ^{ns}	11	91,66 \pm 0,010a	11	24,83 \pm 0,08 a	12	72,88 \pm 2,10 b	12	0,92 \pm 0,01 ^{ns}

^{ns} Não significativo pelo teste F à 5%

n: número total de parasitoides

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-knott ($p < 0,05$).

Tabela 2. Longevidade e cápsula cefálica (médias \pm erro padrão) de machos e fêmeas de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) criado por 25 gerações em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h.

Gerações de <i>T. howardi</i>	Longevidade (dias)				Cápsula Cefálica (mm)			
	n	Fêmeas	n	Machos	n	Fêmeas	n	Machos
1	20	24,45 \pm 2,21c	10	23,00 \pm 3,71c	15	0,53 \pm 0,01c	15	0,42 \pm 0,01b
3	20	25,15 \pm 1,23c	10	27,60 \pm 1,95b	15	0,59 \pm 0,01b	15	0,47 \pm 0,01a
5	20	29,75 \pm 1,27c	10	29,50 \pm 1,19b	15	0,55 \pm 0,01c	15	0,46 \pm 0,01a
7	20	26,20 \pm 1,21c	10	21,50 \pm 1,51c	15	0,57 \pm 0,00c	15	0,45 \pm 0,01b
9	20	39,00 \pm 2,24a	10	38,40 \pm 2,76a	15	0,55 \pm 0,01c	15	0,43 \pm 0,01b
11	20	28,40 \pm 1,91c	10	30,70 \pm 2,30b	15	0,61 \pm 0,01a	15	0,47 \pm 0,01a
13	20	28,95 \pm 2,56c	10	29,30 \pm 3,37b	15	0,56 \pm 0,01c	15	0,44 \pm 0,00b
15	20	17,35 \pm 0,94d	10	22,70 \pm 1,64c	15	0,62 \pm 0,01a	15	0,49 \pm 0,01a
17	20	31,45 \pm 1,86b	10	27,50 \pm 2,51b	15	0,51 \pm 0,01d	15	0,47 \pm 0,01a
19	20	19,90 \pm 1,59d	10	29,70 \pm 2,23b	15	0,58 \pm 0,00b	15	0,48 \pm 0,01a
21	20	12,55 \pm 1,42e	10	11,40 \pm 2,26d	15	0,54 \pm 0,01c	15	0,45 \pm 0,01b
23	20	24,85 \pm 1,18c	10	19,10 \pm 1,77c	15	0,62 \pm 0,01a	15	0,49 \pm 0,01a
25	20	33,50 \pm 1,90b	10	32,00 \pm 3,25b	15	0,59 \pm 0,01b	15	0,49 \pm 0,01a

n: número total de parasitoides

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-knott ($p < 0,05$).

CAPÍTULO 3

Reprodução de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupa de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae): relação de diferentes densidades do parasitoide e do hospedeiro

**REPRODUÇÃO DE *Tetrastichus howardi* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE)
EM PUPA DE *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE):
RELAÇÃO DE DIFERENTES DENSIDADES DO PARASITOIDE E DO
HOSPEDEIRO**

RESUMO: *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) é um endoparasitoide gregário e polífago, que foi coletado em plantio de cana-de-açúcar em Dourados-MS, parasitando pupas de *Diatraea* sp. (Lepidoptera: Crambidae). O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da densidade de pupas de *D. saccharalis* e da densidade de fêmeas de *T. howardi* na reprodução deste parasitoide, visando aprimorar sua criação em laboratório. No primeiro experimento, pupas de *D. saccharalis* foram expostas a *T. howardi* por 24h, nas densidades de 1:1, 7:1, 14:1, 21:1, 28:1 ou 35:1 (parasitoide: hospedeiro), respectivamente. No segundo experimento, verificou-se o parasitismo de *T. howardi* em diferentes densidades de pupa de *D. saccharalis*, por meio da exposição simultânea de uma, três, seis, nove ou 12 pupas do hospedeiro a uma fêmea do parasitoide. As pupas foram individualizadas em placas de Petri e ficaram expostas por 96h aos parasitoides. As condições experimentais foram a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14h. O parasitismo de pupas de *D. saccharalis* e a emergência de *T. howardi* foram semelhantes nas diferentes densidades do parasitoide, resultando em média geral de $99,33\% \pm 0,67$ e $98,33\% \pm 1,38$, respectivamente. A densidade de até 14 fêmeas de *T. howardi* por pupa de *D. saccharalis* proporcionou aumento da progênie do parasitoide, com qualidade biológica satisfatória. Uma fêmea de *T. howardi* parasitou em média quatro pupas de *D. saccharalis*, com progênie total de $113,75 \pm 1,93$.

Palavras-chave: criação massal; parasitismo de pupas; controle biológico.

ABSTRACT: *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) is a gregarious endoparasitoid and polyphagous, was collected in crop sugarcane in Dourados-MS parasitizing pupae of *Diatraea* sp. (Lepidoptera: Crambidae). The aim of this study was to evaluate the influence of the density of pupae of *D. saccharalis* and density of females of *T. howardi* in the reproduction of this parasitoid, aiming to improve its inception in the laboratory. In the first experiment, pupae of *D. saccharalis* were exposed to *T. howardi* for 24h, at densities of 1:1, 7:1, 14:1, 21:1, 28:1 or 35:1 (parasitoid: host), respectively. In the second experiment, there was the parasitism of *T. howardi* in different densities of pupae of *D. saccharalis*, by simultaneous exposure of one, three, six, nine or twelve pupae of a host female parasitoid. The pupae were kept individually in Petri dishes and were exposed for 96h to parasitoids. The experimental conditions were a temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ relative humidity and photophase of 14h. The parasitism of pupae of *D. saccharalis* and the emergence of *T. howardi* were similar at different parasitoid densities, resulting in overall average of $99.33\% \pm 0.67$ and $98.33 \pm 1.38\%$, respectively. The density of up to 14 females of *T. howardi* per pupa of *D. saccharalis* provided to increase the progeny of the parasitoid, biological satisfactory quality. One female *T. howardi* parasitized an average of four pupae of *D. saccharalis*, with progeny total of 113.75 ± 1.93 .

Keywords: mass rearing; parasitism of pupae; biological control.

1. INTRODUÇÃO

A implementação dos programas de controle biológico com parasitoides depende do conhecimento dos fatores abióticos e bióticos que envolvem a interação desses inimigos naturais com seus hospedeiros (SALVADOR e CÔNSOLI, 2008; ALTUNTAS et al., 2010). O uso de parasitoides para o controle de pragas exige que os mesmos sejam multiplicados em grandes quantidades. As criações massais referem-se a produção de milhões de insetos de forma contínua durante todo o ano, que envolvem operações semelhantes as de uma fábrica e demandam conhecimento básico das espécies a serem multiplicadas (PARRA e CÔNSOLI, 2009). Neste sentido, as criações em pequena escala para o desenvolvimento de pesquisas são importantes para coletar dados referentes à biologia de determinado inimigo natural.

Pesquisas sobre criação de parasitoides têm demonstrado que as características biológicas desses inimigos naturais são afetadas pela idade, densidade, espécie de parasitoide e hospedeiro, além dos fatores abióticos como temperatura, umidade e fotoperíodo (COSTA LIMA et al., 2009; SILVA-TORRES et al., 2009; SILVA-TORRES et al., 2010a; PEREIRA et al., 2011; CHICHERA et al., 2012; PASTORI et al., 2012ab; RODRIGUES et al., 2013). Portanto, a manipulação desses fatores pode aprimorar as técnicas de criação de parasitoides, possibilitando a produção de grande número de indivíduos com alta capacidade reprodutiva (UÇKAN e GÜLEL, 2002; PARRA e CÔNSOLI, 2009).

Tetrastichus howardi (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) é um endoparasitoide gregário e polífago, parasita principalmente pupas de Lepidoptera e Coleoptera (KFIR et al., 1993; KARINDAH et al., 2005; CRUZ et al., 2011; OLIVEIRA, 2013). Além disso, foi registrado parasitando lagartas de *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) e de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) (KARINDAH et al., 2005; SILVA-TORRES et al., 2010b; VARGAS et al., 2011). Este inimigo natural foi estudado como agente de controle de *D. saccharalis* nos plantios de cana-de-açúcar em Cuba e também foi usado por agricultores que participam de programas integrados de controle de *P. xylostella* em cultivos de repolho na Indonésia (GONZÁLEZ et al., 2003a; KARINDAH et al., 2005; FELIX et al., 2005). O parasitismo em laboratório foi superior a 90% quando *T. howardi* foi exposto a pupas de *D. saccharalis*, *P. xylostella*, *Erinnyis ello* (Linnaeus,

1758) (Lepidoptera: Sphingidae) e *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) (PÉREZ et al., 2008).

A criação de *T. howardi* e sua possível utilização em programas de controle biológico exigem a avaliação de sua capacidade reprodutiva, em função das densidades do parasitoide e de seu hospedeiro. O número de parasitoides por hospedeiros interfere na qualidade e quantidade de parasitoides produzidos, devido às exigências nutricionais para o desenvolvimento dos mesmos (PEREIRA et al., 2010). Além disso, conhecer como os parasitoides respondem às variações da densidade do hospedeiro permite compreender a habilidade do inimigo natural em controlar a população da praga (SILVA-TORRES et al., 2010a). Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a densidade de fêmeas de *T. howardi* e a densidade de pupas de *D. saccharalis* e na reprodução do parasitoide, visando aprimorar sua criação em laboratório.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Local de condução do experimento

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Entomologia/Controle Biológico (LECOBIOL) da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) em Dourados, Mato Grosso do Sul.

Criação de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)

Pupas de *D. saccharalis* cedidas pela empresa BUG – Agentes Biológicos foram separadas por sexo e colocadas em gaiolas de PVC (100 x 220 mm) para a formação de adultos. Essas gaiolas contendo 20 machos e 30 fêmeas desse lepidóptero foram revestidas internamente com folhas de papel sulfite umedecido, onde as fêmeas, após o acasalamento, ovipositaram. As folhas de papel sulfite contendo os ovos foram imersas em água e sulfato de cobre (1,0%) durante dois minutos para desinfecção e colocadas para secar em varais. Depois de seco, o papel foi cortado, de acordo com os espaços em que os ovos se encontravam, e colocado em placas de Petri contendo um chumaço de algodão umedecido em sulfato de cobre para evitar o ressecamento e contaminação dos ovos. Próximo à eclosão das lagartas de *D. saccharalis* (ovos escurecidos), essas posturas foram colocadas em frascos de vidro (500 mL) vedados contendo dieta artificial modificada de Hensley e Hammond (1968), a base de farelo de soja, germe de trigo, vitaminas e sais minerais (Anexo A). Após a inoculação dos ovos os frascos

foram acondicionados em estantes de aço e mantidos em sala climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12h. Ao atingir o terceiro ínstar, as lagartas foram transferidas para placas de Petri descartáveis (60 x 16 mm) contendo dieta de realimentação (semelhante a dieta de alimentação, exceto pela adição de ácido acético e remoção de sais de Wesson e germe de trigo), onde permaneceram até a formação de pupas (GARCIA et al., 2009).

Criação de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae)

A criação de *T. howardi* no LECOBIOL foi iniciada em outubro de 2009. Parasitoides adultos foram provenientes de uma pupa de *Diatraea* sp. coletada em plantio de cana-de-açúcar na Fazenda Experimental das Ciências Agrárias (FAECA) da UFGD (VARGAS et al., 2011).

Os adultos de *T. howardi* foram mantidos em tubos de vidro (16 x 100 mm) vedados com algodão e alimentados com gotas de mel puro. Cada pupa de *D. saccharalis* com 48h de idade foi exposta a três fêmeas de *T. howardi* (Apêndice A) por 24h para a criação do parasitoide. Após esse período as pupas foram individualizadas em tubos de vidro e mantidas em câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14h, até a emergência dos adultos do parasitoide (VARGAS et al., 2011).

Densidade de fêmeas de *T. howardi* por pupa de *D. saccharalis*

Pupas de *D. saccharalis*, com 48h de idade e peso entre 0,160 a 0,200 g (GLAESER, 2011) foram expostas ao parasitismo por fêmeas de *T. howardi*, com 24h de idade em tubos de vidro (16 x 100 mm), com alimento (gotas de mel) nas densidades de 1:1, 7:1, 14:1, 21:1, 28:1 e 35:1, parasitoides/hospedeiro, adaptado de VARGAS et al. (2013), em câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14h. Após 24h, as fêmeas de *T. howardi* foram retiradas e as pupas permaneceram individualizadas em tubos de vidro, sendo mantidas em câmara climatizada, nas mesmas condições, até a emergência do parasitoide.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos (densidade de fêmeas de *T. howardi*), e dez repetições, sendo cada uma, representada por cinco pupas de *D. saccharalis* e as respectivas densidades de parasitoide, totalizando cinquenta pupas por tratamento. A porcentagem de parasitismo [(número de pupas de *D. saccharalis* com emergência de parasitoides + pupas sem

emergência de adultos de *D. saccharalis*)/(número total de pupas) × 100]; a porcentagem de emergência [(número de pupas de *D. saccharalis* com emergência de adultos dos parasitoides)/(número de pupas parasitadas) × 100]; a duração do ciclo (ovo-adulto) em dias, a progênie por pupa (número de indivíduos emergidos por pupa de *D. saccharalis*); a progênie de fêmeas de *T. howardi* e a razão sexual do parasitoide ($rs = n^{\circ}$ de fêmeas/ n° de adultos) foram avaliadas.

Para avaliação da longevidade foram selecionados ao acaso 20 fêmeas e 20 machos de *T. howardi* de cada tratamento, sendo esses parasitoides no dia de sua emergência, individualizados em tubos de ensaio (16 x 100 mm) contendo uma gota de mel, onde permaneceram até a sua morte. O mesmo número de parasitoides machos e fêmeas foram selecionados para determinação do tamanho da cápsula cefálica, com auxílio de ocular micrométrica.

O sexo dos adultos de *T. howardi* foi determinado de acordo com características morfológicas da antena, sendo que as fêmeas apresentam funículo das antenas pigmentado e com três segmentos e nos machos, o funículo contém quatro segmentos e apenas a clava é pigmentada (LA SALLE e POLASZEK, 2007). A mortalidade natural do hospedeiro foi corrigida pela fórmula de Abbott (1925) nas condições do experimento, com pupas de *D. saccharalis* individualizadas em tubos de vidro (16 x 100 mm) sem parasitoides.

Os dados da duração do ciclo e da progênie foram submetidos à análise de regressão a 5% de probabilidade. A equação que melhor se ajustou aos dados foi escolhida a partir dos modelos linear e quadrático, com base no coeficiente de determinação (R^2), na significância dos coeficientes de regressão (β_i) e de regressão pelo teste F (até 5% de probabilidade).

Reprodução de *T. howardi* em diferentes densidades de pupas de *D. saccharalis*

Pupas de *D. saccharalis* com 48h de idade e peso entre 0,160 a 0,200 g (GLAESER, 2011), nas densidades de 1, 3, 6, 9 e 12 foram expostas simultaneamente a uma fêmea de *T. howardi* (24h de idade) em placa de Petri (60 x 16 mm) contendo gotas de mel (para alimentação dos parasitoides). Após 96h, a fêmea de *T. howardi* foi removida da placa com auxílio de um pincel e as pupas individualizadas em tubo eppendorf® (2 mL), os quais foram fechados com algodão. Os tubos eppendorf® devidamente identificados e contendo as pupas do hospedeiro, foram mantidos em

câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14h para observação do parasitismo e emergência dos parasitoides.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos (densidades de pupas de *D. saccharalis*) e dez repetições, cada uma representada por cinco grupos de um, três, seis, nove ou 12 pupas de *D. saccharalis* e uma fêmea do parasitoide. As pupas de *D. saccharalis* parasitadas e com emergência de *T. howardi*, correspondentes aos diferentes tratamentos, foram contadas para a obtenção das médias em cada repetição.

A progênie de *T. howardi* por pupa de *D. saccharalis* e a progênie de fêmeas foram avaliadas pela média da soma dos parasitoides ou das fêmeas parasitoides de cada grupo de pupas, nas respectivas densidades.

Os dados de parasitismo, emergência e progênie foram submetidos à análise de regressão a 5% de probabilidade. A equação que melhor se ajustou aos dados foi escolhida a partir dos modelos linear e quadrático, com base no coeficiente de determinação (R^2), na significância dos coeficientes de regressão (β_i) e de regressão pelo teste F (até 5% de probabilidade). O número de pupas com emergência de fêmeas ou machos de *T. howardi* foram submetidos ao teste do Qui-quadrado (χ^2) a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

Densidade de fêmeas de *T. howardi* por pupa de *D. saccharalis*

O parasitismo de pupas de *D. saccharalis* e a emergência de *T. howardi* dessas pupas foram semelhantes ($p > 0,05$) nas densidades de 1:1, 7:1, 14:1, 21:1, 28:1 ou 35:1 parasitoide: hospedeiro, resultando em média geral de $99,33\% \pm 0,67$ e $99,00\% \pm 1,38$, respectivamente (Tabela 1).

A variação da densidade de fêmeas parasitoides por pupa de *D. saccharalis* não influenciou a duração do ciclo (dias) de *T. howardi* ($p > 0,05$), apresentando média geral de $19,37 \pm 0,65$ dias (Tabela 1).

A progênie total de *T. howardi* por pupa de *D. saccharalis* aumentou com a densidade de fêmeas parasitoides, variando de $87,63 \pm 4,41$ a $398,92 \pm 14,98$ nas densidades de 1:1 e 35:1, parasitoide: hospedeiro, respectivamente ($F= 10,8377$; $p= 0,0424$) (Figura 1; Tabela 1).

A razão sexual de *T. howardi* decresceu de modo linear com o aumento da densidade por pupa de *D. saccharalis* ($F= 244,7698$; $p= 0,0001$) (Figura 2; Tabela 1). A longevidade de fêmeas de *T. howardi* foi semelhante entre os tratamentos ($p > 0,05$), com uma média geral de $32,34 \pm 0,39$ dias (Tabela 1).

O número de machos apresentou aumento linear a medida que houve aumento da densidades de fêmeas do parasitoide por pupa de *D. saccharalis* (Fig 3). Já o aumento da densidade de parasitoides por pupa de *D. saccharalis* diminuiu a longevidade de machos de *T. howardi* ($F= 21,6992$; $p= 0,0164$) (Figura 4).

O tamanho da cápsula cefálica de fêmeas ($F= 15,4088$; $p= 0,0264$) e de machos de *T. howardi* ($F= 21,1511$; $p= 0,0170$) foi inversamente proporcional com o aumento da densidade de fêmeas parasitoides por pupa de *D. saccharalis*. A cápsula cefálica de fêmeas variou de $0,58 \pm 0,01$ a $0,41 \pm 0,01$ mm (Figura 4) e de machos de $0,48 \pm 0,01$ a $0,36 \pm 0,01$ mm, nas densidades de 1:1 a 35:1, respectivamente (Figura 5). A observação dos valores de cápsula cefálica na densidade de 1:1, tornou possível verificar que as fêmeas ($0,58 \pm 0,01$ mm) de *T. howardi*, geralmente, são maiores que os machos ($0,48 \pm 0,01$ mm).

Reprodução de *T. howardi* em diferentes densidades de pupas de *D. saccharalis*

O aumento da densidade de pupas de *D. saccharalis* contribuiu para o incremento no parasitismo desse hospedeiro por *T. howardi*. Uma única fêmea de *T. howardi* parasitou até sete pupas de *D. saccharalis*. É importante ressaltar que não houve emergência do parasitoide de todas essas pupas. No entanto, *T. howardi* causou a mortalidade desse número de hospedeiros.

O número de pupas parasitadas foi proporcional à densidade de pupas de *D. saccharalis* ($F= 58,4634$; $p= 0,0168$). A exposição de uma fêmea de *T. howardi* a três, seis, nove e doze pupas resultaram em um número médio de pupas parasitadas de $0,98 \pm 0,02$; $2,70 \pm 0,11$; $3,66 \pm 0,19$; $4,34 \pm 0,22$ e $4,64 \pm 0,17$, respectivamente (Figura 6).

A emergência de *T. howardi* aumentou linearmente nos diferentes tratamentos ($F=14,6980$; $p= 0,0313$) (Figura 7). A progênie total de *D. saccharalis* não diferiu com o aumento da densidade do hospedeiro, apresentando média geral de $113,75 \pm 1,93$ ($p > 0,05$) parasitoides. Isso resultou em uma razão sexual média de $0,94 \pm 0,01$ ($p > 0,05$).

A exposição de uma fêmea de *T. howardi* a três, seis, nove e doze pupas de *D. saccharalis* fez com que o parasitoide distribuisse os ovos nessas pupas, sendo que a

maior quantidade de ovos foi direcionada a uma única pupa e o restante foi ovipositado nas demais; fato este confirmado pela emergência dos parasitoides dessas pupas.

A maior emergência de fêmeas de *T. howardi* foi observado à medida que aumentou a densidade de pupas do hospedeiro ($\chi^2= 13,182$; $p < 0,001$) (Figura 8). Em algumas pupas houveram apenas emergência de machos de *T. howardi* ($\chi^2= 0,878$; $p= 0,928$) (Figura 8).

Dentre as pupas das quais emergiram fêmeas de *T. howardi*, destacam-se aquelas em que apenas uma fêmea completou o desenvolvimento. A emergência de uma fêmea parasitoide do hospedeiro *D. saccharalis* ocorreu nas densidades de 1:3, 1:6, 1:9 e 1:12 (parasitoide: hospedeiro). Outro fato relevante observado neste experimento é a emergência de parasitoides em adultos de *D. saccharalis*. Em alguns desses adultos de *D. saccharalis*, houve um rompimento na cutícula e parte dos imaturos de *T. howardi* foram eliminados do hospedeiro antes de completar o seu desenvolvimento (Figura 9).

4. DISCUSSÃO

Densidade de fêmeas de *T. howardi* por pupa de *D. saccharalis*

A variação da densidade de *T. howardi* por pupa de *D. saccharalis* não interferiu no parasitismo e na emergência desse parasitoide, o que demonstra a eficiência de uma fêmea parasitar e se desenvolver no hospedeiro. Além disso, indica a habilidade dos imaturos de *T. howardi* em satisfazer suas necessidades nutricionais, mesmo em condições de alta densidade. Essa capacidade de adaptação é inerente aos parasitoides gregários, que garantem o desenvolvimento e sobrevivência em seus hospedeiros ao suprimir suas defesas e completar o ciclo em condições limitadas de alimento (GODFRAY, 1994; DORN e BECKAGE, 2007).

O aumento da densidade de *T. howardi* por pupa de *D. saccharalis* não afetou a duração do ciclo do parasitoide. Esse resultado difere da criação de *T. howardi* em pupas de *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae), pois o aumento do número de fêmeas por pupa do coleóptero reduziu o ciclo de vida desse parasitoide (OLIVEIRA, 2013). Geralmente o período de desenvolvimento é reduzido em grandes densidades de parasitoides. Isso também pode ser evidenciado na reprodução de *Trichospilus diatraeae* Cherian e Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *T. molitor* (FAVERO et al., 2013) e *Palmistichus elaeisis* Delvare & La Salle,

1993 (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Bombyx mori* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Bombycidae) (PEREIRA et al., 2010).

O maior número de *T. howardi* emergidos por pupa de *D. saccharalis* em altas densidades sugere que as fêmeas desse parasitoide regulam a postura de ovos e evitam o superparasitismo, principalmente devido à ausência de imaturos nas densidades de 28:1 e 35:1. Por outro lado, a manutenção da descendência de fêmeas com o aumento da densidade demonstra que o acréscimo da progênie refere-se ao maior número de machos de *T. howardi* por pupa de *D. saccharalis*. Em parasitoides gregários, quando se aumenta o número de fêmeas por hospedeiro, de modo simultâneo, a média do número de descendentes fêmea diminui (RABINOVICH et al., 2000). Isso ocorre porque a progênie de fêmeas apresenta maior competição coespecífica dentro de um único hospedeiro (DORN e BECKAGE, 2007). No entanto, esse fato não foi significativo para *T. howardi* multiplicado em pupas de *D. saccharalis*, pois não houve uma tendência clara de redução ou manutenção do número de fêmeas em função da densidade.

A razão sexual de *T. howardi* diminuiu com o aumento da densidade deste parasitoide em pupas de *D. saccharalis*. Apesar disso, a proporção de fêmeas até a densidade de 21:1 foi de $0,80 \pm 0,01$, que ainda pode ser considerada elevada. A redução da razão sexual pode ser explicada pela maior exigência nutricional das fêmeas parasitoides, o que favoreceu um ajuste na oviposição para machos nas condições de alta densidade (CHARNOV et al., 1981; HARDY e COOK, 1995; BURTON-CHELLEW et al., 2008).

A longevidade de fêmeas de *T. howardi* foi semelhante em todas as densidades e as fêmeas sobreviveram por mais de 32 dias. Os machos de *T. howardi* tiveram a longevidade reduzida com o acréscimo da densidade, ainda assim, apresentaram longevidade satisfatória até a densidade de 21:1. Isso pode ser explicado pelo fato da longevidade ter sido avaliada em fêmeas e machos alimentados e que foram individualizados no dia da emergência. Fêmeas de *T. howardi* que após emergirem de pupas de *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) foram alimentadas e sobreviveram de 38 a 56 dias; já as fêmeas desse parasitoide que foram alimentadas e expostas aos hospedeiros, a longevidade ficou entre 14 e 21 dias (KARINDAH et al., 2005). O sucesso reprodutivo dos parasitoides é limitado pela longevidade (BEZEMER e MILLS, 2003) sendo assim, com a maior longevidade de *T. howardi*, as fêmeas possuem tempo suficiente para localizar e parasitar o hospedeiro,

mesmo que a sobrevivência desse parasitoide seja reduzida pela metade em condições de campo.

O tamanho da cápsula cefálica de fêmeas e de machos de *T. howardi* diminuiu com o aumento da densidade de fêmeas por pupa de *D. saccharalis*. Isso demonstra que o tamanho do adulto varia em função do número de imaturos dentro de um mesmo hospedeiro. Nos parasitoides gregários a competição dos imaturos pelos recursos nutricionais do hospedeiro ajusta o tamanho do adulto e sua aptidão reprodutiva, nesse caso, fêmeas maiores vivem por mais tempo e apresentam maior fecundidade (HARDY et al., 1992; GODFRAY, 1994; ZAVIEZO e MILLS, 2000).

Uma fêmea de *T. howardi* por pupa de *D. saccharalis* é o suficiente para o parasitismo e desenvolvimento desse parasitoide. No entanto, a otimização da criação em laboratório, com obtenção de maior número de parasitoides por hospedeiro é possível utilizando-se a proporção de até 14:1. Até essa densidade, *T. howardi* apresentou progênie de fêmeas, razão sexual, longevidade e tamanho de cápsula cefálica com qualidade para sua multiplicação em laboratório, visando uma possível utilização no controle de *D. saccharalis*.

Reprodução de *T. howardi* em diferentes densidades de pupas de *D. saccharalis*

Fêmeas de *T. howardi* ficaram mais estimuladas a parasitar quando expostas a um maior número de pupas de *D. saccharalis*. Isso evidencia que a fêmea desse parasitoide responde de forma positiva em relação à densidade de seu hospedeiro, parasitando várias pupas de *D. saccharalis* durante quatro dias. O parasitismo de até sete pupas do hospedeiro nesse período, sugere que uma fêmea de *T. howardi* pode parasitar mais de uma pupa de *D. saccharalis* em 24h. Esse parasitoide utiliza de 6 a 14 min para ovipositar em uma lagarta de *P. xylostella* e aproximadamente 30 min para parasitar uma pupa de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) em laboratório (GONZÁLEZ et al., 2003b; KARINDAH et al., 2005).

A exposição de uma fêmea de *T. howardi* a seis, nove ou doze pupas de *D. saccharalis* resultou em parasitismo médio de quatro pupas. O mesmo resultado foi obtido quando foram oferecidas diariamente pupas de *Helicoverpa armigera* (Hubner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) para fêmeas de *T. howardi*, as quais causaram a mortalidade de até quatro pupas do hospedeiro (KFIR et al., 1993). Uma fêmea de *T. howardi* parasitou até cinco pupas de *G. mellonella* durante sua fase reprodutiva.

A resposta adequada do inimigo natural à variação da densidade do hospedeiro é um dos critérios para sua utilização como agente de controle biológico (VAN LENTEREN, 2009). Nesse caso, mesmo que não ocorra a emergência de *T. howardi* de todas as pupas parasitadas, causar a mortalidade de várias pupas do hospedeiro, o torna eficiente para utilização em programas de liberações inundativas.

O número de pupas de *D. saccharalis* com emergência de *T. howardi* aumentou com a densidade do hospedeiro. No entanto, o acréscimo de emergência nas densidades acima de 1:3 (parasitoide:hospedeiro) não foi significativa para justificar o uso de pupas acima dessa quantidade. É importante ressaltar, que a alta emergência é essencial para a manutenção e otimização das criações de *T. howardi* em laboratório, além disso, deve-se evitar o desperdício de material biológico nas criações massais.

Pressupõe-se, com base na emergência, que *T. howardi* depositou maior quantidade de ovos em uma única pupa de *D. saccharalis* quando foi exposto as densidades de 1:3, 1:6, 1:9 e 1:12 (parasitoide: hospedeiro). É possível que esse comportamento da fêmea de *T. howardi* seja um mecanismo para garantir sua descendência em um hospedeiro. Apesar de não ser possível afirmar que as pupas com maior progênie foram as primeiras a serem parasitadas, sabe-se que as fêmeas parasitoides gastam energia com a oviposição e sua fecundidade reduz com a idade (ROITBERG et al. 2001; GÜNDÜZ e GÜLEL, 2005; PASTORI et al., 2012b). Além disso, González (2004) verificou que *T. howardi*, ao ser exposto diariamente a pupas de *G. mellonella*, produziu maior número de descendentes nas primeiras 72 horas.

A progênie total de *T. howardi* de *D. saccharalis* não foi influenciada pela densidade dessas pupas, do mesmo modo, o número de fêmeas não se alterou pelas variações na densidade do hospedeiro. A progênie de fêmeas apresentou média geral de $106,92 \pm 6,04$, quando uma fêmea de *T. howardi* foi exposta a diferentes densidades de pupas de *D. saccharalis*. A produção de grande número de fêmeas parasitoides é um indicativo de que a criação de *T. howardi* pode ser aprimorada por meio da manipulação da proporção do hospedeiro e do parasitoide, pois no experimento anterior observou-se o acréscimo da progênie com o aumento da densidade de fêmeas de *T. howardi*.

A manipulação da densidade do parasitoide e do hospedeiro também é uma alternativa para otimizar a criação de *T. howardi* no espaço físico do laboratório. A criação desse parasitoide em maiores densidades de pupas de *D. saccharalis* reduziria os recipientes utilizados e o espaço ocupado no laboratório. A densidade de cinco lagartas parasitadas de *D. saccharalis* por placa de Petri não afetou o desenvolvimento e

a qualidade de *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae). Além disso, a criação massal nessa densidade de lagartas exigiu menos espaço na sala de criação (VACARI et al., 2012).

O número de pupas de *D. saccharalis* com emergência somente de fêmeas de *T. howardi* aumentou proporcionalmente com a densidade do hospedeiro. O grande número de pupas com emergência somente de fêmeas remete, mais uma vez, a habilidade do parasitoide em regular sua postura. A maior disponibilidade de hospedeiro possibilitou um ajuste no número de ovos por pupa e isso reduziu a competição entre os imaturos, o que favoreceu um maior número de pupas com emergência de fêmeas de *T. howardi*. O parasitoide *Mastrus ridibundus* (Gravenhorst, 1829) (Hymenoptera: Ichneumonidae) produziu mais fêmeas quando foi aumentada a disponibilidade de lagartas de *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Tortricidae). Os autores acreditam que a redução da competição entre os imaturos resultou no aumento da descendência de fêmeas (BEZEMER e MILLS, 2003). Outra explicação para a emergência somente de fêmeas de *T. howardi* pode estar relacionada ao fato de poucos machos serem necessários para copular um grande número de fêmeas parasitoides.

A reprodução de uma fêmea de *T. howardi* por pupa de *D. saccharalis* resultou em uma razão sexual média de $0,94 \pm 0,01$, isso representa que para cada macho tem-se em média 15,6 fêmeas. Esse resultado foi semelhante à razão sexual de *T. howardi* quando o mesmo foi criado em pupa de *T. molitor*, com uma proporção de 94% de fêmeas na progênie (OLIVEIRA, 2013). A baixa quantidade de machos nos descendentes também é característica de outros parasitoides da família Eulophidae, entre eles, *T. diatraeae* e *P. elaeisis* (CHICHERA et al., 2012; PASTORI et al., 2012a; FAVERO et al., 2013).

A emergência de *T. howardi* de 17 adultos de *D. saccharalis* indica a capacidade desse parasitoide em completar o desenvolvimento em diferentes fases do hospedeiro. A mudança da fase de pupa para adulto é regulada pelos hormônios ecdisônio e de eclosão, que promovem a formação da cutícula do adulto e a ecdise (COSTA e IDE, 2006). Neste caso, os imaturos de *T. howardi* superaram as alterações hormonais do processo de metamorfose e atingiram a fase adulta. Esse fato evidencia que os processos da interação parasitoide-hospedeiro são regulados pelo parasitoide visando tornar o hospedeiro adequado para sustentar as necessidades nutricionais específicas da fase imatura desses inimigos naturais (SALVADOR e CÔNSOLI, 2008).

Tetrastichus howardi apresentou alta capacidade reprodutiva ao parasitar, emergir e produzir um grande número de fêmeas parasitoides em diferentes densidades de pupas de *D. saccharalis*. A resposta positiva de uma única fêmea de *T. howardi* ao aumento da densidade do hospedeiro no período de quatro dias permite aprimorar a metodologia de criação deste parasitoide. É possível efetuar uma combinação de densidade do parasitoide e do hospedeiro para obtenção de maior número de *T. howardi* em pupa de *D. saccharalis*, visando liberações inundativas, caso este parasitoide seja utilizado em programas de controle biológico.

5. CONCLUSÕES

A densidade de até 14 fêmeas de *T. howardi* por pupa de *D. saccharalis* é a mais efetiva para proporcionar aumento da progênie sem perder características biológicas essenciais em uma criação de laboratório.

Uma fêmea de *T. howardi* possui capacidade de parasitar em média quatro pupas de *D. saccharalis*, com progênie total de $113,75 \pm 1,93$, chegando a parasitar sete pupas.

Tetrastichus howardi é capaz de completar seu ciclo e emergir de adultos de *D. saccharalis*.

6. AGRADECIMENTOS

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

7. REFERÊNCIAS

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

ALTUNTAS, H.; KILIC, A.Y.; SIVAS ZEYTINOGLU, H. The effects of parasitism by the ectoparasitoid *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) on host hemolymph proteins in the Mediterranean flour moth *Ephestia kueniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Turkish Journal of Zoology**, v. 34, p. 409-416, 2010.

BEZEMER, R.M.; MILLS, N.J. Clutch size decisions of a gregarious parasitoid under laboratory and field conditions. **Animal Behaviour**, v. 66, p. 1119-1128, 2003.

BURTON-CHELLEW, M.N.; KOEVOETS, T.; GRILLENBERGER, B.K.; SYKES, E.M.; UNDERWOOD, S.L.; BIJLSMA, K.; GADAU, J.; VAN DE ZANDE, L.; BEUKEBBOOM, W.; WEST, S.A.; SHUKER, D.M. Facultative sex ratio adjustment in natural populations of wasps: Cues of local mate competition and the precision of adaptation. **The American Naturalist**, v. 172, p. 393-404, 2008.

CHARNOV, E.L.; LOS-DEN HARTOGH, R.L.; JONES, W.T, VAN DEN ASSEM, J. Sex ratio evolution in a variable environment. **Nature**, v. 289, p. 27-33, 1981.

CHICHERA, R.A.; PEREIRA, F.F.; KASSAB, S.O.; BARBOSA, R.H.; PASTORI, P.L.; ROSSONI, C. Capacidade de busca de *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Interciencia**, v. 37, p. 852-856, 2012.

COSTA, C.; IDE, S. Crescimento e Muda. In: COSTA, C.; IDE, S.; SIMONKA, C.E. (Eds). **Insetos imaturos: Metamorfose e identificação**. Ribeirão Preto: Holos, 2006. p. 31- 36.

COSTA LIMA, T.C.; GEREMIAS, L.D; PARRA, J.R.P. Efeito da temperatura e umidade relativa do ar no desenvolvimento de *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromysidae em *Vigna unguilata*. **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 727-733, 2009.

CRUZ, I.; REDOAN, A.C.; SILVA, R.B.; FIGUEIREDO, M.L.C.; PENTEADO-DIAS, A.M. New record of *Tetrastichus howardi* (Olliff) as a parasitoid of *Diatraea saccharalis* (Fabr.) on maize. **Scientia Agricola**, v. 68, p. 252-254, 2011.

DORN, S.; BECKAGE, N. Superparasitism in gregarious hymenopteran parasitoids: ecological, behavioural and physiological perspectives. **Physiological Entomology**, v. 32, p. 199-211, 2007.

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

FELIX, J.; GONZÁLEZ, A.; OCA, F.N.M.; RAVELO, H.G.; BAITHA, A. Interaction of *Lixophaga diatraeae* (Townsend) and *Tetrastichus howardi* (Olliff) for management of *Diatraea saccharalis* (Fab.) in Cuba. **Sugar Tech**, v. 7, p. 5-8, 2005.

GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.; MACEDO, L.P.M. Criação do parasitoide *Cotesia flavipes* em laboratório. In: BUENO, V.H.P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: Editora UFLA, 2009. p. 199-219.

GLAESER, D.F. **Características biológicas e comportamentais de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) criado em pupa de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)**. 2011. 89f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS.

GODFRAY, H.C.J. Parasitoids, Behavioral and Evolutionary Ecology, Princeton: University Press, 1994. 473p.

GONZÁLEZ, J.F.A.; OCA, F.N.M.O.; RAVELO, H.G. *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae): nuevo parásito pupal de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) en Cuba. **Centro Agrícola**, v. 30, p. 93, 2003a.

GONZÁLEZ, J.F.Á.; OCA, F.N.M.; RAVELO, H.G. Estudios bioecológicos de *Tetrastichus howardi* Olliff. (Hymenoptera: Eulophidae), parásito pupal de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) en Cuba (Primeira Parte). **Centro Agrícola**, v. 30, p. 37-41, 2003b.

GONZÁLEZ, J.F.A. **Estudios bioecológicos, reproducción artificial y liberación de *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoide pupal de *Diatraea saccharalis* (Fab.) en Cuba.** 2004. 176 f. Tese (Doctor en Ciencias Agrícolas) – Universidad Central de Las Villas, Santa Clara - Cuba.

GÜNDÜZ, E.A.; GÜLEL, A. Investigation of fecundity and sex ratio in the parasitoid *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) in relation to parasitoid age. **Turkish Journal of Zoology**, v. 29, p. 291-294, 2005.

HARDY, I.C.W.; COOK, J.M. Brood sex ratio variance, developmental mortality and virginity in a gregarious parasitoid wasp. **Oecologia**, v. 103, p. 162-169, 1995.

HARDY, I.C.W.; GRIFFITHS, N.T.; GODFRAY, H.C.J. Clutch size in a parasitoid wasp: A manipulation experiment. **Journal of Animal Ecology**, v. 61, p. 121-129, 1992.

HENSLEY, S.D.; HAMMOND, A.H. Laboratory techniques for rearing the sugar cane borer on an artificial diet. **Journal Economy Entomology**, v. 61, p. 1742-1743, 1968.

KARINDAH, S.; SULTANTO, E.S.; SULISTYOWATI, L. Parasitoid larva-pupa *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) pada *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) di pertanaman kubis kota batu dan kabupaten malang. **Jurnal Entomologi Indonesia**, v. 2, p. 61- 68, 2005.

KFIR, R.; GOUWS J.; MOORE, S.D. Biology of *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae): A Facultative hyperparasitoid of stem borers. **Biocontrol Science and Technology**. v. 3, p. 149-159, 1993.

LA SALLE, J.; POLASZEK, A. Afrotropical species of the *Tetrastichus howardi* species group (Hymenoptera: Eulophidae). **African Entomology**, v. 15, p. 45-56, 2007.

OLIVEIRA, F.G. **Multiplicação de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) e de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae).** 2013. 63f. Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS.

PARRA, J.R.P.; CÔNSOLI, F.L. Criação massal e controle de qualidade de parasitoides de ovos. In: BUENO, V.H.P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: Editora UFLA, 2009. p. 169-197.

PASTORI, P.L.; PEREIRA, F.F.; ZANUNCIO, J.C.; OLIVEIRA, H.N.; CALADO, V.F.R.; SILVA, R.O. Densidade de fêmeas de *Palmistichus elaeisis* Delvare & Lasalle, 1993 (Hymenoptera: Eulophidae) para sua reprodução em pupas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, p. 525-532, 2012a.

PASTORI, P.L.; ZANUNCIO, J.C.; SILVA, R.O.; PEREIRA, F.F.; AZAMBUJA, R.; PEREIRA, J.M.M. Reprodução de *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) em relação á idade do parasitoide e do hospedeiro. **EntomoBrasilis**, v. 5, p. 37-42, 2012b.

PEREIRA, F.F.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E.; ZANUNCIO, T.V.; PRATISSOLI, D.; PASTORI, P.L. The density of females of the *Palmistichus elaeisis* Delvare and LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) affects their reproductive performance on pupae of *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 82, p. 1-9, 2010.

PEREIRA, F.F.; ZANUNCIO, J.C.; OLIVEIRA, H.N.; GRANCE, E.L.V.; PASTORI, P.L.; GAVA-OLIVEIRA, M.D. Thermal requirements and estimate number of generations of *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) in different *Eucalyptus* plantations regions. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p. 431-436, 2011.

PÉREZ, J.A.; ÁLVAREZ, M.V.; MARRERO, M.G.; ARROJO, L.R.; SANABRIA, E.M. Critérios ecológicos em el manejo de plagas de la caña de azúcar y cultivos varios una opción para lograr alimentos sanos. **Agroecología**, v. 3, p. 51-53, 2008.

RABINOVICH, J.E.; JORDA, M.T.; BERNSTEIN, C. Local mate competition and precise sex ratios in *Telenomus fariai* (Hymenoptera: Scelionidae), a parasitoid of triatomine eggs. **Behavioral Ecology and Sociology**, v. 48, p. 308-315, 2000.

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

ROITBERG, B.D.; BOIVIN G.; VET, L.E.M. Fitness, parasitoids, and biological control: an opinion. **Canadian Entomologist**, v. 133, p. 429-438, 2001.

SALVADOR, G.; CÔNSOLI, F.L. Changes in the hemolymph and fat boy metabolites of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) parasitized by *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, v. 45, p. 103-110, 2008.

SILVA-TORRES, C.S.A.; BARROS, R.; TORRES, J.B. Efeito da idade, fotoperíodo e disponibilidade de hospedeiro no comportamento de parasitismo de *Oomyzus*

sokolowskii Kurdjumov (Hymenoptera: Eulophidae). **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 512-519, 2009.

SILVA-TORRES, C.S.A.; TORRES, J.B.; BARROS, R.; PALLINI, A. Parasitismo de traça-das-crucíferas por *Oomyzus sokolowskii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 638-645, 2010a.

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

UÇKAN, F.; GÜLEL, A. Age-related fecundity and sex ratio variation in *Apanteles galleriae* (Hym., Braconidae) and host effect on fecundity and sex ratio of its hyperparasitoid *Dibrachys boarmiae* (Hym., Pteromalidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 126, p. 534-537, 2002.

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

VARGAS, E.L.; PEREIRA, F.F.; TAVARES, M.T.; PASTORI, P.L. Record of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Diatraea* sp. (Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane crop in Brazil. **Entomotropica**, v. 26, p. 143-146, 2011.

VARGAS, E.L.; PEREIRA, F.F.; CALADO, V.R.F.; GLAESER, D.F.; RODRIGUES, B.A.C.; SILVA, N.V. Densidades de fêmeas de *Trichospilus diatraeae* por pupa de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 13, p. 1-20, 2013.

VAN LENTEREN, J.C. Critérios de seleção de inimigos naturais. In: BUENO, V.H.P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: Editora UFLA, 2009. p. 11-32.

ZAVIEZO, R.; MILLS, N. Factors influencing the evolution of clutch size in a gregarious insect parasitoid. **Journal of Animal Ecology**, v. 69, p. 1047-1057, 2000.

Tabela 1. Características biológicas de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) nas densidades de 1, 7, 14, 21, 28 ou 35 fêmeas por pupa de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h.

Características biológicas (médias)							
Densidade parasitoide: hospedeiro	Parasitismo (%)	Emergência (%)	Duração do ciclo (dias)	Progênie total	Progênie de fêmeas	Razão sexual	Longevidade de fêmeas
1:1	96,00	100,00	21,39	87,63	82,46	0,93	33,40
7:1	100,00	100,00	18,98	322,38	278,40	0,87	33,20
14:1	100,00	100,00	18,76	350,72	291,06	0,83	31,45
21:1	100,00	100,00	19,04	376,86	300,22	0,80	32,85
28:1	100,00	94,00	18,92	393,93	293,55	0,75	32,15
35:1	100,00	100,00	19,12	398,92	268,38	0,67	31,00

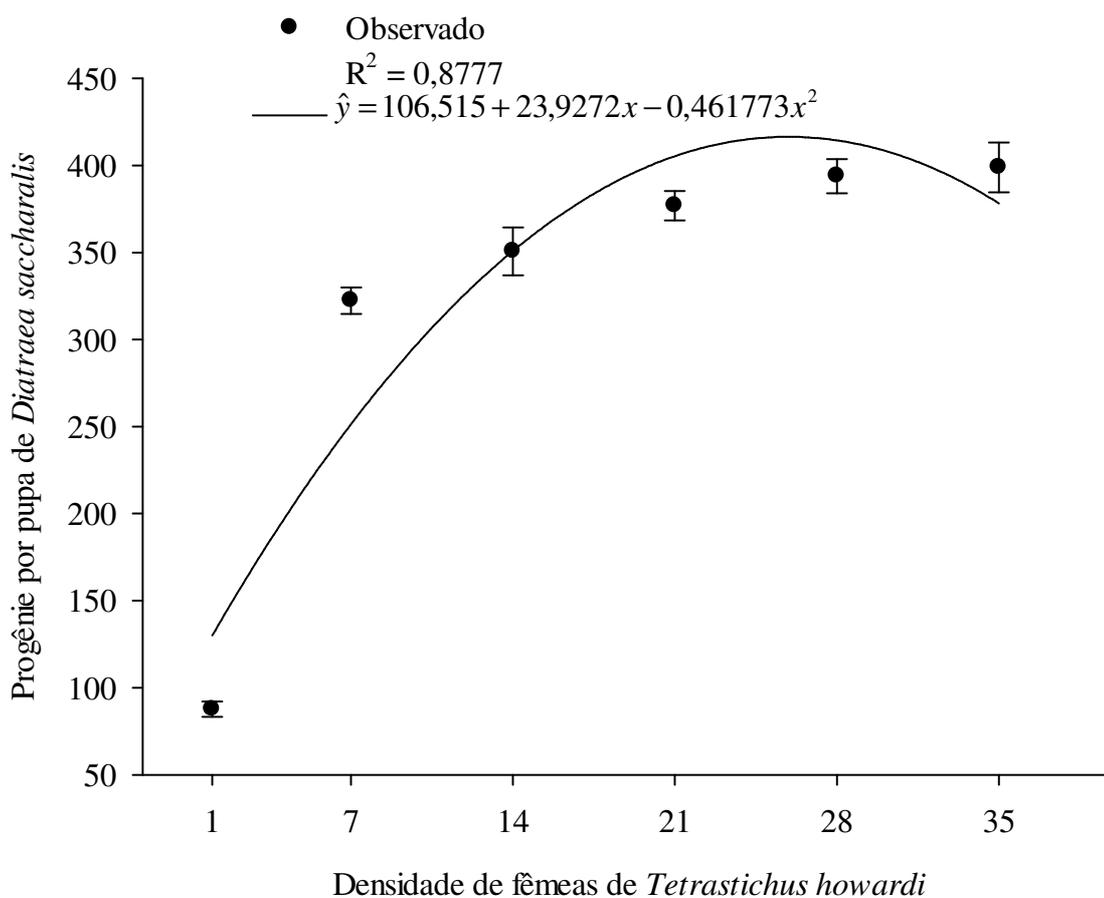


Figura 1. Progênie de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) nas densidades de 1, 7, 14, 21, 28 ou 35 fêmeas por pupa de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h ($F = 10,8377$; $p = 0,0424$).

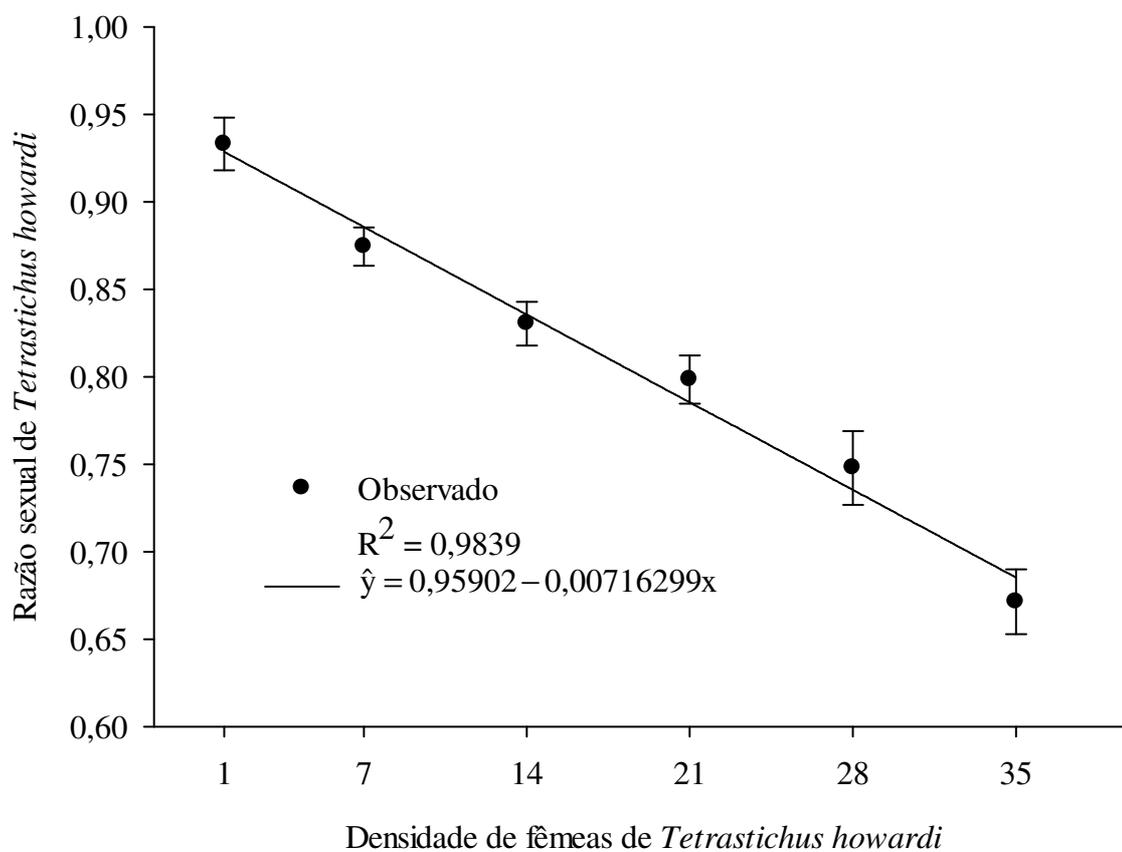


Figura 2. Razão sexual de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) nas densidades de 1, 7, 14, 21, 28 ou 35 fêmeas por pupa de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h ($F = 244,7698$; $p = 0,0001$).

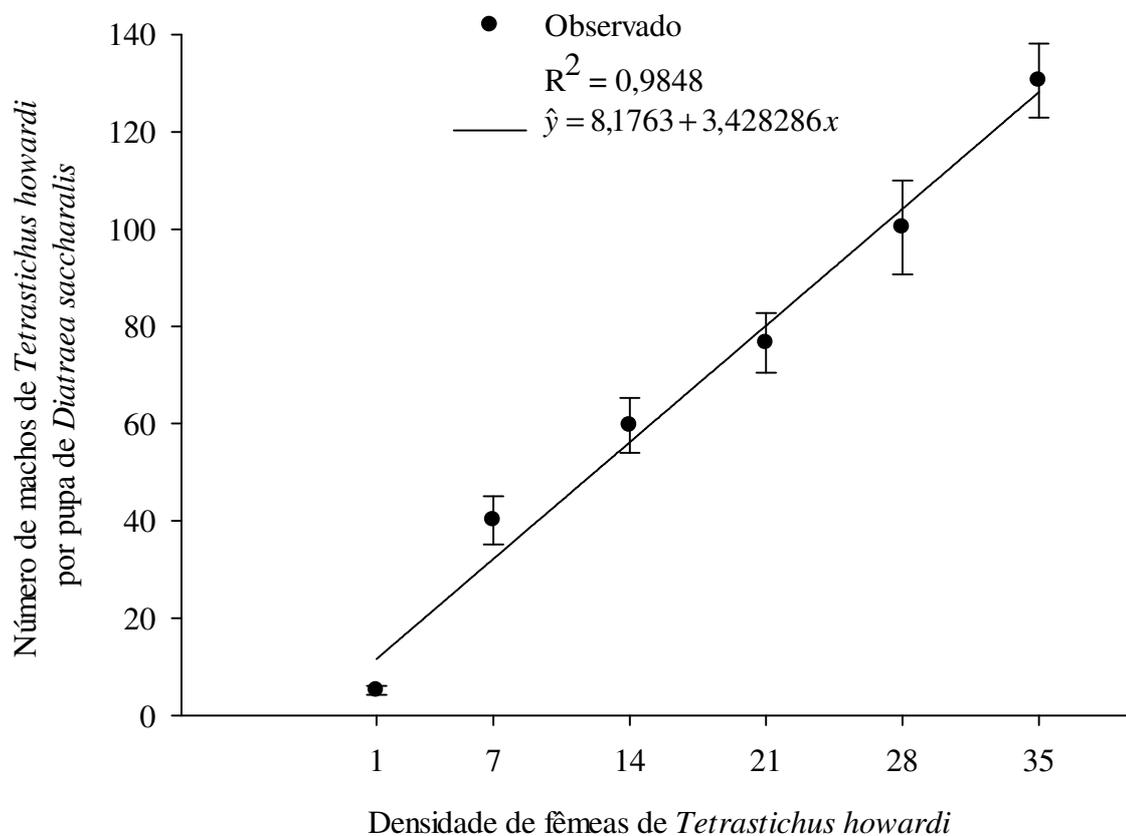


Figura 3. Número de machos de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) nas densidades de 1, 7, 14, 21, 28 ou 35 fêmeas por pupa de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h ($F = 21,6992$; $p = 0,0164$).

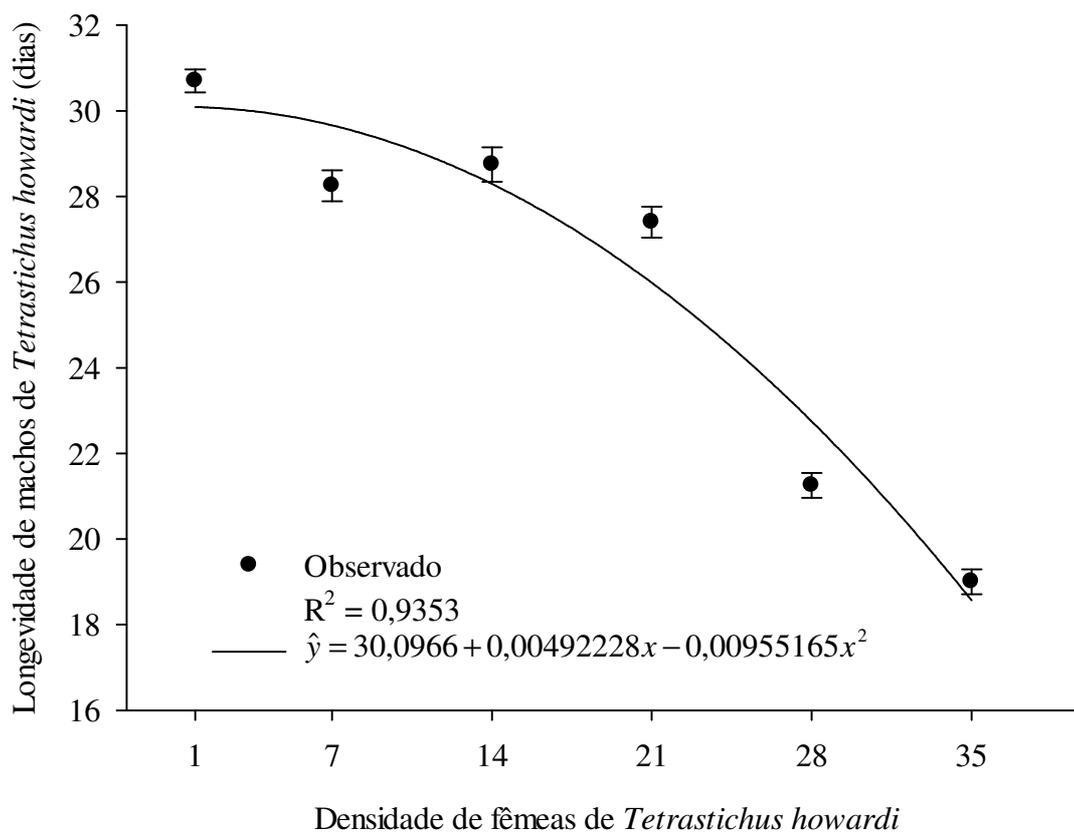


Figura 4. Longevidade de machos (dias) de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) nas densidades de 1, 7, 14, 21, 28 ou 35 fêmeas por pupa de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h ($F = 21,6992$; $p = 0,0164$).

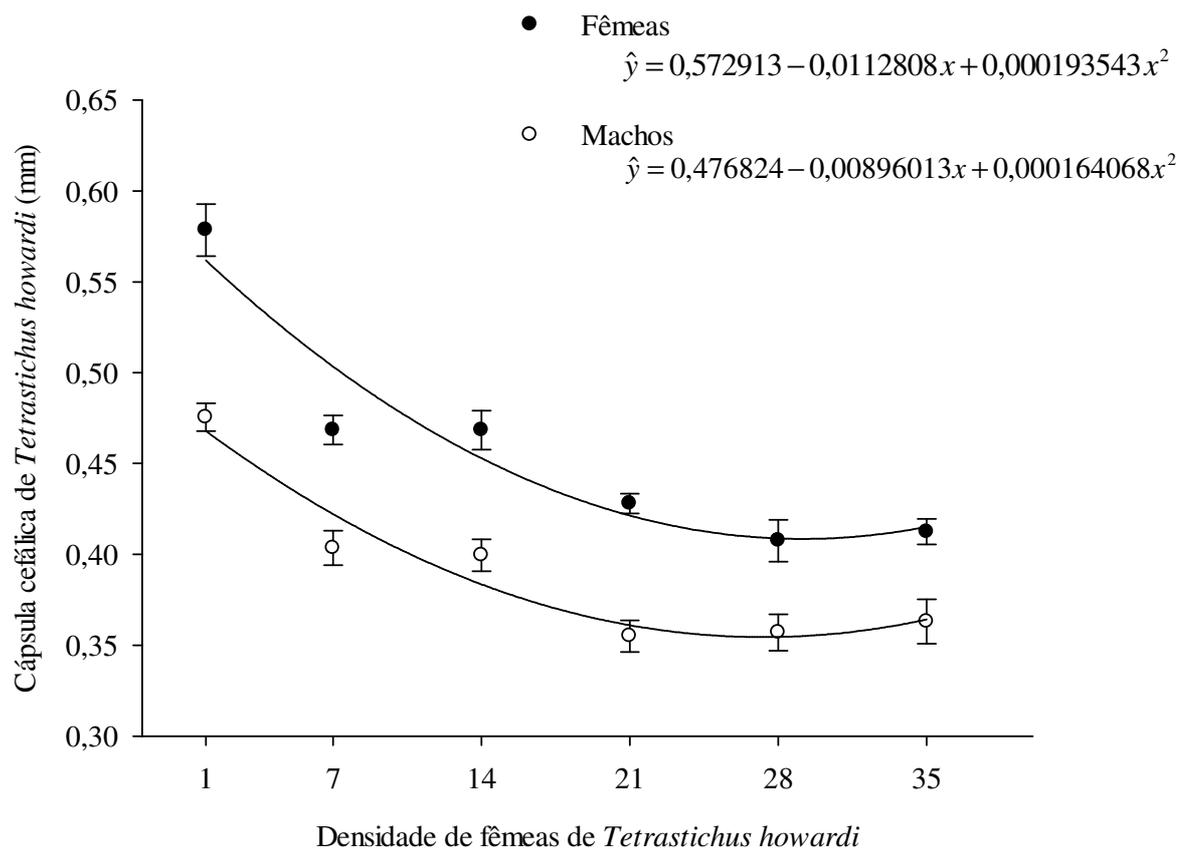


Figura 5. Cápsula cefálica (mm) de fêmeas (●) e de machos (○) de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) nas densidades de 1, 7, 14, 21, 28 ou 35 fêmeas por pupa de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h ($F = 15,4088$; $p = 0,0264$).

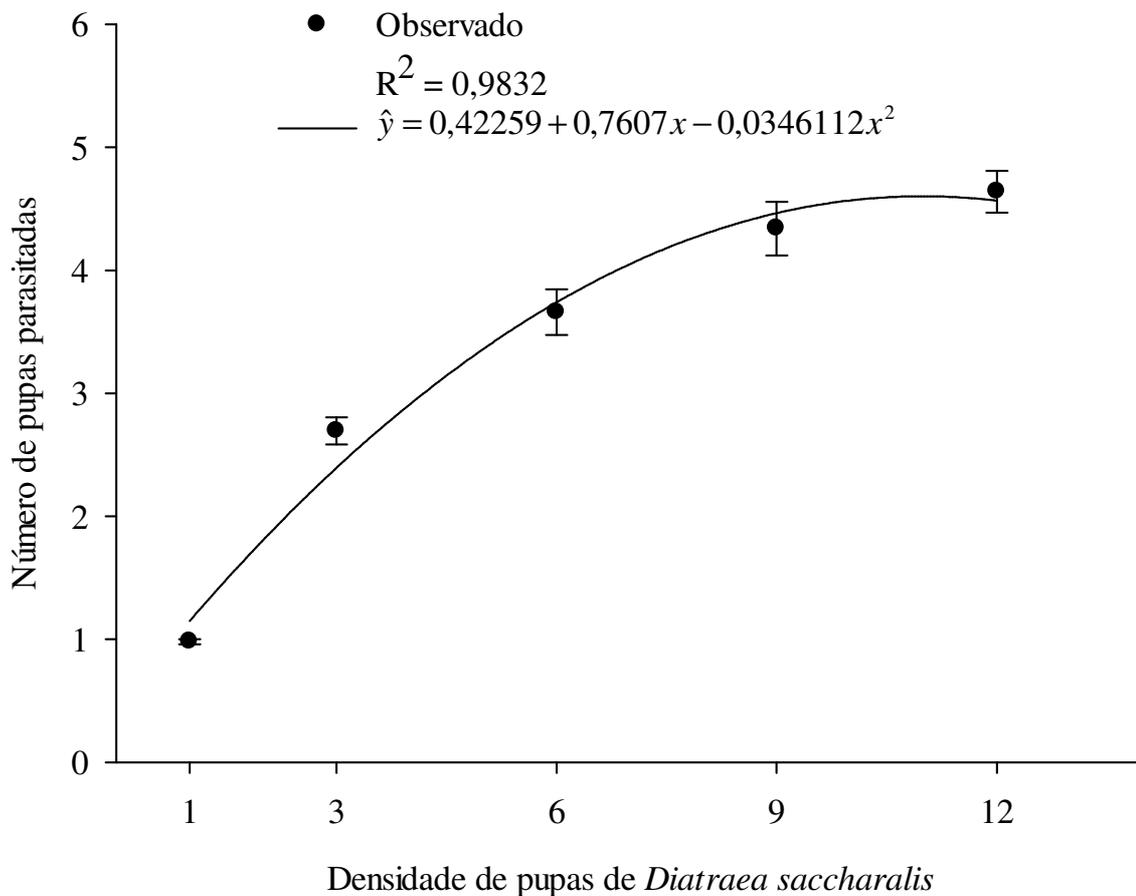


Figura 6. Número de pupas parasitadas por uma fêmea de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em relação as densidades de 1, 3, 6, 9 ou 12 pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h ($F = 58,4634$; $p = 0,0168$).

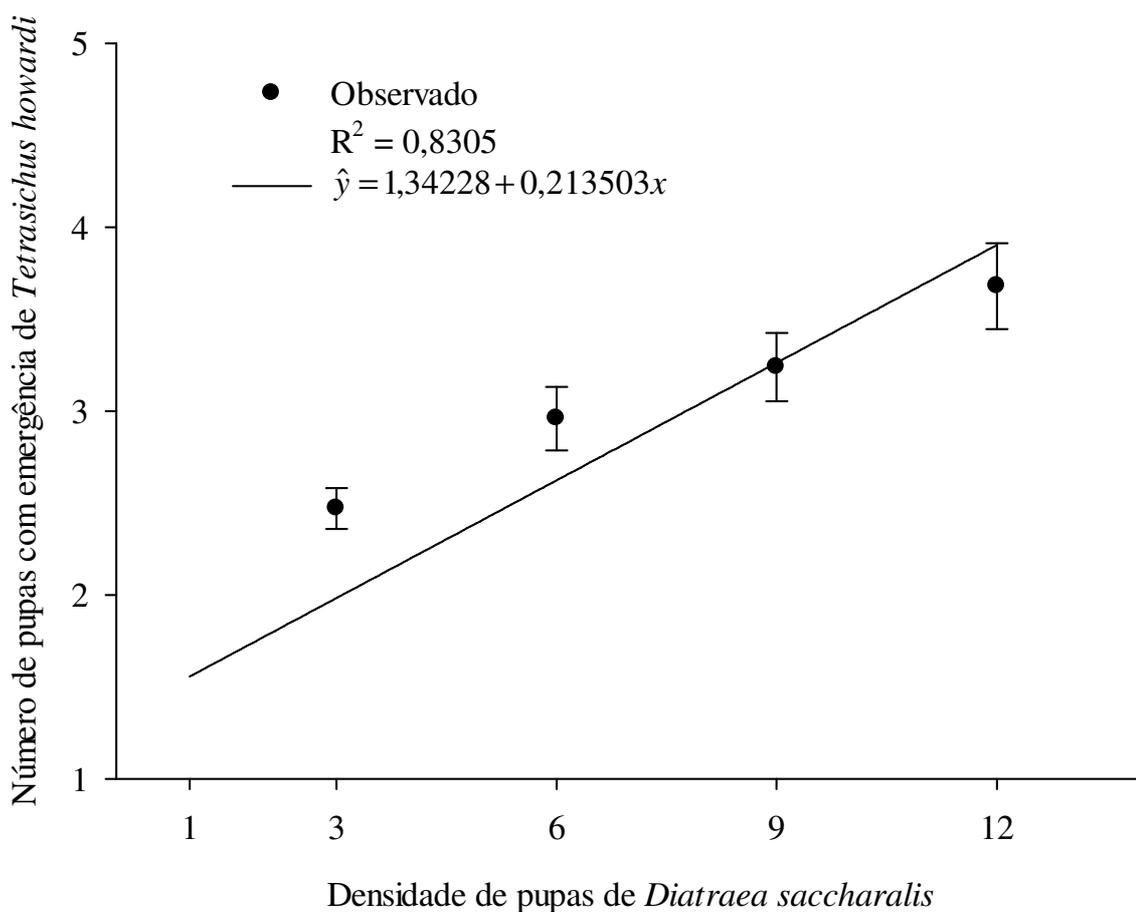


Figura 7. Número de pupas com emergência de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em relação as densidades de 1, 3, 6, 9 ou 12 pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h ($F= 14,6980$; $p= 0,0313$).

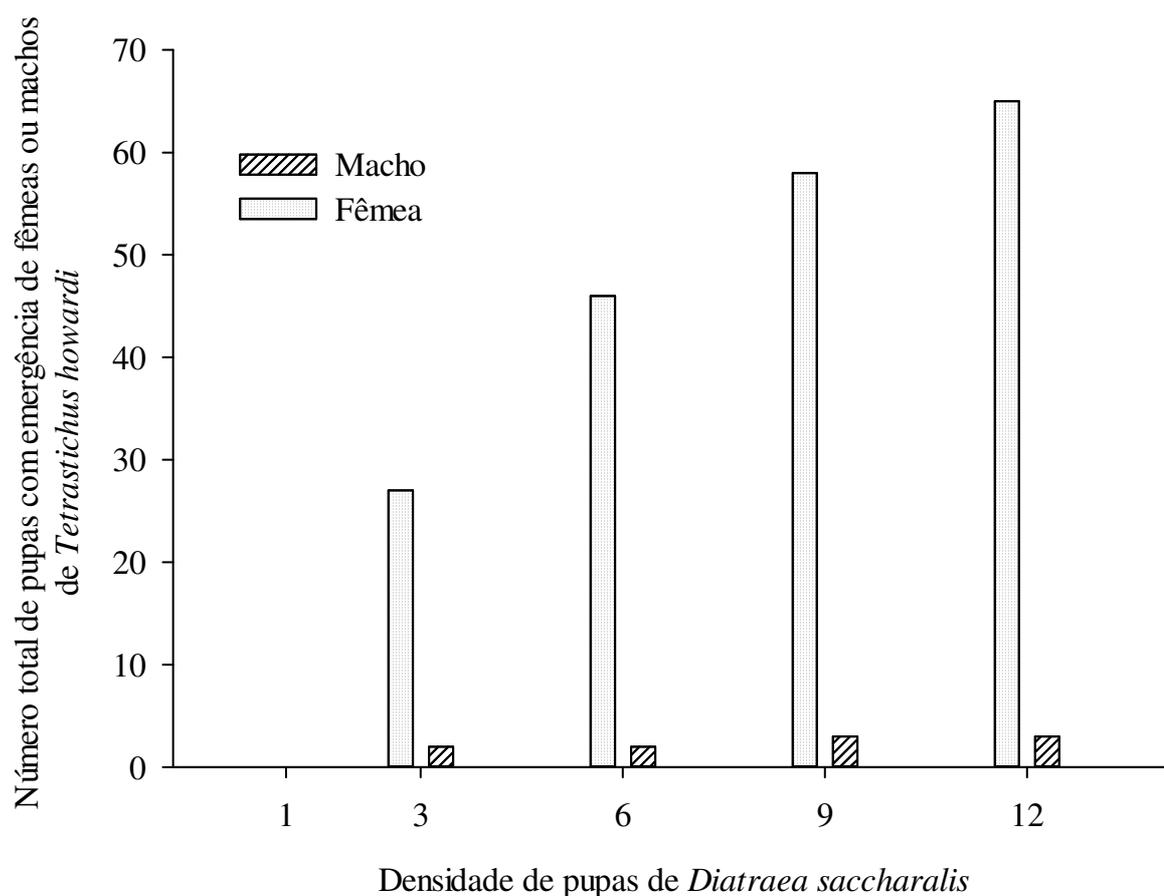


Figura 8. Número total de pupas com emergência de fêmeas ou machos de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em relação as densidades de 1, 3, 6, 9 ou 12 pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h. (Pupas com emergência de fêmeas $\chi^2 = 13,182$; $p < 0,001$) e (Pupas com emergência de machos $\chi^2 = 0,878$; $p = 0,928$).



Fotos: Elizangela Leite Vargas

Figura 9. Adulto de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) proveniente de pupa parasitada por *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) (A). Adulto de *D. saccharalis* com imaturos de *T. howardi* (B).

CAPÍTULO 4

**Parasitismo e desenvolvimento de *Tetrastichus howardi*
(Hymenoptera: Eulophidae) em lagartas de diferentes ínstares
de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)**

**PARASITISMO E DESENVOLVIMENTO DE *Tetrastichus howardi*
(HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) EM LAGARTAS DE DIFERENTES
ÍNSTARES *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

RESUMO: *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) parasita pupas e lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). O objetivo deste trabalho foi avaliar o parasitismo, desenvolvimento e produção de progênie de *T. howardi* em lagartas de *D. saccharalis*, em função da densidade do parasitoide e ínstaes do hospedeiro. No primeiro experimento, lagartas de segundo, terceiro, quarto e quinto ínstaes de *D. saccharalis* foram individualizadas em placas de Petri (60 x 16 mm) e expostas ao parasitismo por uma ou quatro fêmeas de *T. howardi*, por 24h. No segundo experimento, lagartas de terceiro ínstar de *D. saccharalis* foram individualizadas em placas de Petri e expostas, por 24h, ao parasitismo por fêmeas de *T. howardi* nas densidades de 1:1, 4:1, 7:1, 10:1 e 13:1 (parasitoide: hospedeiro). As condições experimentais foram a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14h. A porcentagem de parasitismo das lagartas apresentou maiores valores na interação de quatro fêmeas do parasitoide com o segundo (100%), terceiro (72%), quarto (72%) e quinto ínstaes (36%) de *D. saccharalis*. A porcentagem de parasitismo das lagartas de terceiro ínstar de *D. saccharalis* foi semelhante quando variou a densidade de fêmeas de *T. howardi*, apresentando média geral de $67,20\% \pm 2,87$. O parasitoide completou o seu desenvolvimento em lagartas de terceiro, quarto e quinto ínstaes de *D. saccharalis*. O aumento do número de fêmeas de *T. howardi* por lagarta de terceiro ínstar de *D. saccharalis* proporcionou aumento no parasitismo, emergência e na progênie do parasitoide.

Palavras-chave: broca-da-cana; taxa de parasitismo; parasitoide.

ABSTRACT: *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) parasite pupae and caterpillar of *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). The aim of this study was to evaluate the parasitism, development and progeny production of *T. howardi* in the *D. saccharalis* caterpillar, in function parasitoid density and host instars. In the first experiment, *D. saccharalis* caterpillars of second, third, fourth and fifth instar were isolated in petri dishes (60 x 16 mm) and exposed to parasitism by one or four females of *T. howardi* for 24h. In the second experiment, *D. saccharalis* caterpillar of third instar were individualized in Petri dishes and exposed for 24h to parasitism by females of *T. howardi* at densities of 1:1, 4:1, 7:1, 10:1 and 13:1 (parasitoid: host). The experimental conditions were temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ relative humidity and photophase of 14h. The percentage of parasitism of caterpillars showed higher values in the interaction of four parasitoid females with the second (100%), third (72%), one quarter (72%) and fifth instars (36%) of *D. saccharalis*. The percentage of parasitism of third instar larvae of *D. saccharalis* was similar when used different densities of females *T. howardi*, with overall average of $67.20\% \pm 2.87$. The parasitoid completed its development in larvae of the third, fourth and fifth instar *D. saccharalis*. The increased number of female *T. howardi* by third instar caterpillar of *D. saccharalis* increased the parasitism time, emergence and progeny of the parasitoid.

Keywords: sugarcane borer; parasitism rate; parasitoid.

1. INTRODUÇÃO

Parasitoides são importantes reguladores populacionais de uma grande variedade de insetos que podem alcançar o status de praga em sistemas agrícolas (DANNEELS et al., 2010). Os parasitoides são mais abundantes na ordem Hymenoptera, sendo utilizado grande número de espécies no controle biológico aplicado em comparação com predadores, especialmente devido à especificidade e facilidade de criação em laboratório (PARRA, 2002; VAN LENTEREN, 2012).

O uso de parasitoides no controle biológico depende de estudos que avaliem a habilidade desses inimigos naturais em vencer as diversas restrições impostas pelo hospedeiro (ANDRADE et al., 2010; ASGARI e RIVERS, 2011). Dentre as quais, o tamanho, a idade, o estágio de desenvolvimento e o estado nutricional do hospedeiro (BARBOSA et al., 2008; CÔNSOLI e VINSON, 2009; PASTORI et al., 2012a) que podem influenciar no parasitismo, desenvolvimento dos imaturos, fecundidade, razão sexual e longevidade do parasitoide (VINSON e IWANTSCH, 1980).

O parasitoide ao se reproduzir impede a continuidade do ciclo dos hospedeiros, sendo este, o fator essencial para o controle de insetos em cultivos agrícolas (BUENO et al., 2009). A produção de progênie é um indicativo da compatibilidade do hospedeiro com o parasitoide, sendo um pré-requisito para a multiplicação do inimigo natural (BELL et al., 2005; BUENO e SAMPAIO, 2009). Dentre os parasitoides, os gregários normalmente apresentam plasticidade para a exploração de recurso alimentar, o que influencia no desenvolvimento dos imaturos, no tamanho e na aptidão reprodutiva dos adultos (GODFRAY, 1994; VINSON, 1998; MUELLER et al., 2005).

Outro aspecto que influencia a otimização das criações e o controle biológico aplicado com parasitoides é o ínstar do hospedeiro (HARVEY et al., 1994; DORN e BECKAGE, 2007; YANG e WAN, 2011). Isso acontece porque o parasitoide fica sujeito às alterações metabólicas e às taxas de crescimento impostas pelo alimento explorado pelo hospedeiro (CÔNSOLI e VINSON, 2009). A seleção dos ínstars larvais pelos parasitoides é baseada na facilidade de localização, no comportamento, na idade e no tamanho do hospedeiro (PASCUA e PASCUA, 2004).

Tetrastichus howardi (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) é um endoparasitoide gregário que parasita pupas e lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) (VARGAS et al., 2011). O registro de parasitismo de lagartas de *D. saccharalis* em laboratório por *T. howardi* deve ser

investigado em função dos ínstares do hospedeiro e da densidade do parasitoide. Isso porque o número de fêmeas parasitoides por hospedeiro afeta a capacidade de parasitismo e desenvolvimento do inimigo natural (BARBOSA et al., 2008; ANDRADE et al., 2010; PASTORI et al., 2012b). Enquanto larvas em desenvolvimento podem interferir no sucesso reprodutivo do parasitoide devido a variação nutricional nos diferentes estádios (HARVEY et al., 1994; SAMPAIO et al., 2001; LI e SUN, 2011).

Objetivou-se com este trabalho avaliar o parasitismo, desenvolvimento e produção de progênie de *T. howardi* em lagartas de *D. saccharalis*, em função da densidade do parasitoide e diferentes ínstares do hospedeiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Local de condução do experimento

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Entomologia/Controle Biológico (LECOBIOL) da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) em Dourados, Mato Grosso do Sul.

Criação de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)

Pupas de *D. saccharalis* cedidas pela empresa BUG – Agentes Biológicos foram separadas por sexo e colocadas em gaiolas de PVC (100 x 220 mm) para a formação de adultos. Essas gaiolas contendo 20 machos e 30 fêmeas desse lepidóptero foram revestidas internamente com folhas de papel sulfite umedecido, onde as fêmeas, após o acasalamento, ovipositaram. As folhas de papel sulfite contendo os ovos foram imersas em sulfato de cobre (1,0%) durante dois minutos e colocadas para secar em varais. Depois de seco, o papel foi recortado de acordo com os espaços em que os ovos se encontravam e colocado em placas de Petri contendo um chumaço de algodão umedecido em sulfato de cobre, para evitar o ressecamento dos ovos. Próximo à eclosão das lagartas de *D. saccharalis* (ovos escurecidos), essas posturas foram colocadas em frascos de vidro (500 mL) vedados contendo dieta artificial modificada de Hensley e Hammond (1968), a base de farelo de soja, germe de trigo, vitaminas e sais minerais (Anexo A). Após a inoculação dos ovos os frascos foram acondicionados em estantes de aço e mantidos em sala climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12h. Ao atingir o terceiro ínstar, as lagartas foram transferidas para placas de Petri descartáveis (60 x 16 mm) contendo dieta de realimentação (semelhante a dieta de

alimentação, exceto pela adição de ácido acético e remoção de sais de Wesson e germe de trigo), onde permaneceram até a formação de pupas (GARCIA et al., 2009).

Criação de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae)

A criação de *T. howardi* no LECOBIOLOG foi iniciada em outubro de 2009. Parasitoides adultos foram provenientes de uma pupa de *Diatraea* sp. coletada em plantio de cana-de-açúcar na Fazenda Experimental das Ciências Agrárias (FAECA) da UFGD (VARGAS et al., 2011).

Os adultos de *T. howardi* foram mantidos em tubos de vidro (16 x 100 mm) vedados com algodão e alimentados com gotas de mel puro. Cada pupa de *D. saccharalis* com 48h de idade foi exposta a três fêmeas de *T. howardi* (Apêndice A) por 24h para a criação do parasitoide. Após esse período as pupas foram individualizadas em tubos de vidro e mantidas em câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14h, até a emergência dos adultos do parasitoide (VARGAS et al., 2011).

Parasitismo e desenvolvimento de *T. howardi* em lagartas de diferentes ínstares de *D. saccharalis*

Para determinação dos ínstares, a cápsula cefálica de cada lagarta de *D. saccharalis* foi medida com o auxílio de ocular micrométrica e obtido um valor médio (mm). Cinquenta lagartas de segundo ($0,606 \pm 0,014$ mm), terceiro ($0,988 \pm 0,012$ mm), quarto ($1,228 \pm 0,014$ mm) e quinto ($1,475 \pm 0,014$ mm) ínstares de *D. saccharalis* foram colocadas individualmente em placas de Petri (60 x 16 mm). Cada lagarta foi exposta ao parasitismo por uma ou quatro fêmeas de *T. howardi* com 24h. Essas placas foram mantidas em câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14h. Após 24h, as fêmeas de *T. howardi* foram retiradas das placas com um pincel. As lagartas de *D. saccharalis* permaneceram nas placas, nas quais foi adicionada dieta artificial de realimentação, sendo observadas diariamente, até a emergência dos parasitoides. A dieta das lagartas parasitadas foi removida das placas e para as lagartas que permaneciam vivas e se alimentando, a dieta foi trocada periodicamente.

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2 x 4 (duas densidades do parasitoide e quatro ínstares do hospedeiro), em delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições, cada uma representada por cinco lagartas de *D. saccharalis*, totalizando 400 lagartas. A porcentagem de parasitismo [(número de lagartas ou pupas

de *D. saccharalis* com emergência de parasitoides + lagartas ou pupas sem emergência de adultos de *D. saccharalis*)/(número total de lagartas) \times 100]; a porcentagem de emergência da progênie [(número de lagartas ou pupas de *D. saccharalis* com emergência de adultos dos parasitoides)/(número de lagartas parasitadas) \times 100]; a duração do ciclo (ovo-adulto) em dias; a progênie por pupa (número de indivíduos emergidos por lagarta ou pupa de *D. saccharalis*) e a razão sexual do parasitoide ($rs = n^{\circ}$ de fêmeas/ n° de adultos) foram avaliadas.

O sexo dos adultos de *T. howardi* foi determinado de acordo com características morfológicas da antena, sendo que as fêmeas apresentam funículo das antenas pigmentado e com três segmentos e nos machos, o funículo contém quatro segmentos e apenas a clava é pigmentada (LA SALLE e POLASZEK, 2007). A mortalidade natural dos hospedeiros foi corrigida pela fórmula de Abbott (1925) nas condições do experimento, com lagartas de *D. saccharalis* individualizadas em placas de Petri descartável (60 x 16 mm) sem parasitoides e alimentadas com dieta artificial. Os dados foram submetidos à análise de variância para verificar a significância da interação entre densidade de fêmeas parasitoides e os instares do hospedeiro e, quando significativo a 5% de probabilidade foi realizado o teste de Scott-Knott.

Densidade de *T. howardi* por lagarta de *D. saccharalis*

Lagartas de terceiro ínstar (0,988 mm) de *D. saccharalis* foram individualizadas em placas de Petri (60 x 16 mm) e expostas ao parasitismo por fêmeas de *T. howardi*, com 24h de idade, nas densidades de 1:1, 4:1, 7:1, 10:1 e 13:1 (parasitoide: hospedeiro). Após 24h, as fêmeas de *T. howardi* foram retiradas das placas com auxílio de um pincel. As lagartas de *D. saccharalis* permaneceram nas placas, nas quais foi adicionada dieta artificial de realimentação e mantidas em câmara climatizada a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14h. A dieta das lagartas parasitadas foi removida das placas e para as lagartas que permaneciam vivas e se alimentando a dieta foi trocada periodicamente.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos (densidades do parasitoide por lagarta do hospedeiro) e dez repetições, cada uma, representada por cinco lagartas de *D. saccharalis*, totalizando 50 lagartas por tratamento. Os dados referentes ao parasitismo, à emergência, à duração do ciclo (ovo-adulto), à progênie e à razão sexual do parasitoide foram submetidos à análise de variância e, quando significativo a 5% de probabilidade foi realizada a análise de

regressão. A equação que melhor se ajustou aos dados foi escolhida a partir dos modelos linear e quadrático, com base no coeficiente de determinação (R^2) e na significância dos coeficientes de regressão (β_i) a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

Parasitismo e desenvolvimento de *T. howardi* em lagartas de diferentes ínstares de *D. saccharalis*

O parasitismo das lagartas de *D. saccharalis* por *T. howardi* foi confirmado pela mortalidade da lagarta, pela presença de imaturos ou pela emergência dos parasitoides. *T. howardi* parasitou lagartas de segundo, terceiro, quarto e quinto ínstares de *D. saccharalis* (Apêndice B). As lagartas de *D. saccharalis* que foram parasitadas apresentaram alteração da coloração e da consistência do corpo, que inicialmente apresentou coloração amarelada e aspecto flácido. As lagartas que morreram em decorrência do parasitismo, adquiriram coloração escura, tegumento flácido e depois rígido, sendo que as lagartas de quinto ínstar muitas vezes ficaram em estágio intermediário entre lagarta e pupa. Além de se ter observado que as lagartas parasitadas adquiriram um aspecto transparente quando o imaturo de *T. howardi* encontrava-se no final de seu desenvolvimento.

O parasitismo, desenvolvimento e emergência de *T. howardi* em lagartas de *D. saccharalis* ocorreram nos estádios de terceiro e quarto ínstar. Nas lagartas de quinto ínstar, em que o parasitoide completou seu desenvolvimento, a emergência ocorreu na fase de pupa desse hospedeiro.

A combinação de uma fêmea de *T. howardi* com lagartas de *D. saccharalis* em diferentes ínstares prolongou esse estágio do hospedeiro. Em alguns casos, o parasitoide causou a morte do hospedeiro somente na fase de pupa. Esse fato foi observado em lagartas de terceiro, quarto e quinto ínstares. Destaca-se ainda, que para algumas dessas pupas restaram apenas a cutícula.

A combinação de uma ou quatro fêmeas de *T. howardi* com o segundo, terceiro, quarto e quinto ínstares de *D. saccharalis* influenciou significativamente o parasitismo, a duração do ciclo (ovo-adulto) e a progênie do parasitoide (Tabela 1).

O aumento da densidade de fêmeas de *T. howardi* proporcionou maiores taxas de parasitismo em lagartas de segundo (100%), quarto (72%) e quinto ínstares (36%)

(Tabela 2). O parasitismo foi semelhante nas lagartas de terceiro ínstar de *D. saccharalis*, quando se utilizou uma ou quatro fêmeas de *T. howardi* (Tabela 2).

A emergência de *T. howardi* de lagartas de *D. saccharalis* não apresentou diferença significativa em função da densidade do parasitoide e dos ínstars do hospedeiro ($p > 0,05$). Não houve emergência do parasitoide das lagartas de segundo ínstar. Quando houve parasitismo de lagartas de quinto ínstar, a emergência dos parasitoides ocorreu na fase de pupa de *D. saccharalis*, isso porque em até quatro dias da montagem do experimento essas lagartas passaram para fase de pupa. A média de emergência de *T. howardi* em lagartas de diferentes ínstars de *D. saccharalis* foi de $24,44\% \pm 2,94$ e $22,00\% \pm 2,00$ nas densidades de uma e quatro fêmeas do parasitoide por lagarta, respectivamente.

A duração do ciclo ovo-adulto de *T. howardi* variou de $20,00 \pm 0,00$ a $26,66 \pm 1,45$ dias. A combinação de uma fêmea parasitoide com lagartas de terceiro, quarto e quinto ínstars resultou em períodos semelhantes de desenvolvimento; já a combinação de quatro fêmeas por lagarta, resultou em maior duração do ciclo de *T. howardi* que se desenvolveram em lagartas de terceiro e quarto ínstar (Tabela 3).

A progênie de *T. howardi* por lagarta de *D. saccharalis* foi proporcional ao aumento do tamanho da lagarta nas densidades de uma e quatro fêmeas. A maior progênie foi resultante da interação entre a lagarta de quinto ínstar exposta a uma fêmea de *T. howardi* (Tabela 3).

A razão sexual foi semelhante entre os tratamentos, com média de $0,94 \pm 0,01$ ($p > 0,05$).

Densidade de *T. howardi* por lagarta de *D. saccharalis*

As lagartas de terceiro ínstar de *D. saccharalis* foram parasitadas em todas as densidades de fêmeas de *T. howardi* avaliadas. No entanto, a porcentagem de parasitismo foi semelhante entre os tratamentos ($p > 0,05$), com média de $67,20\% \pm 2,87$.

A emergência dos parasitoides ($F= 30,6662$; $p= 0,016$) foi diretamente proporcional ao aumento do número de fêmeas de *T. howardi* por lagarta de terceiro ínstar de *D. saccharalis*, ajustando-se à equação linear (Figura 1).

A duração do ciclo (ovo-adulto) não foi influenciada pela variação na densidade de fêmeas parasitoides por lagarta de terceiro ínstar de *D. saccharalis* ($p > 0,05$), apresentando média de $23,42 \pm 0,63$.

A progênie de *T. howardi* por lagarta de terceiro ínstar de *D. saccharalis* ($F=31,3330$; $p=0,0113$) variou de 1,00 a 62,31, nas densidades de uma e treze fêmeas, respectivamente (Figura 2).

A razão sexual ($F=11,8767$; $p=0,0410$) de *T. howardi* apresentou relação inversa com o aumento da densidade de fêmeas parasitoides por lagarta de terceiro ínstar de *D. saccharalis*, com ajuste linear dos dados (Figura 3).

4. DISCUSSÃO

Tetrastichus howardi parasitou lagartas de *D. saccharalis* de segundo ao quinto ínstar, sendo que uma fêmea parasitoide foi suficiente para causar mortalidade do hospedeiro. A oviposição de fêmeas de *T. howardi* ocasionou uma modificação no corpo da lagarta desse lepidóptero. As mudanças na coloração e na consistência do corpo de lagartas de *D. saccharalis* parasitadas por *T. howardi* podem estar relacionadas com as alterações promovidas pelos fluídos que são injetados durante a oviposição. Essas substâncias causam distúrbios fisiológicos que auxiliam na supressão do sistema imunológico do hospedeiro (DANNEELS et al., 2010; ASGARI e RIVERS, 2011; COLINET et al., 2013).

A porcentagem de parasitismo foi influenciada pelos ínstars das lagartas de *D. saccharalis*, sendo maior quando combinada a densidade de quatro fêmeas de *T. howardi*. No entanto, a variação de densidade de um a 13 não apresentou diferença significativa quando essas fêmeas foram expostas a lagartas de terceiro ínstar. Esse dado é muito importante, pois evidencia que uma única fêmea de *T. howardi* pode causar a mortalidade de lagartas dos ínstars avaliados de *D. saccharalis*.

O fato de uma fêmea de *T. howardi* parasitar diferentes ínstars de *D. saccharalis* demonstra a habilidade deste parasitoide em se desenvolver em duas fases do hospedeiro (lagarta e pupa) que de acordo com Cónsoli e Vinson (2009) caracterizam-se ambientes nutricionais diferentes. Além disso, a pupa é uma fase sésil enquanto a lagarta apresenta movimentos e é passível de se defender do ataque do parasitoide (CÔNSOLI e VINSON, 2009; GREENEY et al., 2012). *Tetrastichus howardi* parasita larvas de *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) e neste caso é considerado parasitoide de larva-pupa (KARINDAH et al., 2005; CRUZ et al., 2011).

Uma fêmea de *T. howardi*, em alguns casos, não causa a morte imediata das lagartas de *D. saccharalis*, isso foi evidenciado quando lagartas de diferentes ínstares morreram após atingirem a fase de pupa. É importante ressaltar, que foi disponibilizada dieta artificial para as lagartas até atingirem a fase de pupa, apesar das mesmas consumirem alimento por um tempo limitado.

Pupas mortas e ocas ocorreram, possivelmente, devido ao sistema imune do hospedeiro que ativou o metabolismo da profenoloxidase, que resultou em uma melanização generalizada (KANOST, 1999; SILVA et al., 2000; AJAMHASSANI et al., 2012). Isso pode ter causado a morte dos imaturos do parasitoide, como também foi letal para o próprio hospedeiro. Assim como observado no parasitismo de *C. flavipes* em lagartas de *D. saccharalis*, que afetou a atividade das fenoloxidasas, principalmente no final do desenvolvimento dos imaturos do parasitoide (LOPES, 2008).

O parasitoide não completou o desenvolvimento nas lagartas de segundo ínstar, não havendo emergência de *T. howardi* nesse estágio do hospedeiro. Isso pode ser devido ao excesso de toxina injetada no hospedeiro no momento da oviposição, considerando principalmente a proporção de quatro fêmeas parasitoides por lagarta de segundo ínstar de *D. saccharalis*. Esse fato também pode ser atribuído ao menor tamanho da lagarta, pois não houve emergência de *T. howardi* mesmo quando se utilizou uma única fêmea por hospedeiro, demonstrando que o recurso disponível nessas lagartas não foi suficiente para os imaturos completarem o desenvolvimento. Alta mortalidade também foi observada em larvas de primeiro e segundo ínstar de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae), 90 e 86% respectivamente, indicam que estas larvas são inadequadas para a criação de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead, 1905) (Hymenoptera: Braconidae) (VAN NIEUWENHOVE e OVRUSKI, 2011).

As lagartas de quinto ínstar de *D. saccharalis* apresentaram o menor percentual de parasitismo, $12 \pm 6,11$ e $36 \pm 8,33$, quando expostas a uma ou quatro fêmeas de *T. howardi*, respectivamente. Esse fato, possivelmente está relacionado com as alterações nos hormônios da metamorfose, haja vista que a proximidade da fase de pupa reduz a liberação do hormônio juvenil e estimula a produção e liberação do hormônio da muda na hemolinfa dos lepidópteros (COSTA e IDE, 2006). Além disso, a qualidade nutricional da larva como hospedeiro aumenta a medida que ela cresce e se desenvolve (CÔNSOLI e VINSON, 2009), isso pode ter favorecido a recuperação hemocitária das larvas de quinto ínstar de *D. saccharalis*, diminuindo conseqüentemente o parasitismo

por *T. howardi*, principalmente porque as lagartas foram alimentadas após serem expostas ao parasitoide (MAHMOUD et al., 2011).

Outro fato importante é que as larvas em estágio mais adiantado são mais agressivas, demonstrando que hospedeiros maiores podem se defender melhor do que os menores (KOUAMÉ e MACKAUER, 1991). As lagartas de quinto ínstar apresentaram um comportamento defensivo que reduziu o parasitismo por *T. howardi*, por meio de movimentos do corpo e regurgito. Situação semelhante foi observada para larvas de terceiro, quarto e quinto ínstar de *Helicoverpa armigera* (Hubner, 1809) (Lepidoptera: Noctuidae) que apresentaram movimentos agressivos em direção a *Eriborus argenteopilosus* (Cameron, 1907) (Hymenoptera: Ichneumonidae), interrompendo a oviposição da fêmea parasitoide ou afastando-a para longe (PASCUA e PASCUA, 2004).

Nas lagartas parasitadas de terceiro e quarto ínstar, nas quais o parasitoide completou o desenvolvimento, a emergência de *T. howardi* foi da própria lagarta. Ao contrário, nas lagartas de quinto ínstar, os adultos do parasitoide emergiram das pupas de *D. saccharalis*. A mudança de fase dessas lagartas pode ter sido influenciada pelo parasitismo ou pelo cessamento da alimentação. A parada alimentar promove redução no metabolismo, com isso as secreções das células do cérebro passam a estimular a glândula protorácica em níveis suficientes para promover a muda (COSTA e IDE, 2006).

A emergência da progênie foi proporcional à densidade de *T. howardi* por lagarta de *D. saccharalis* em terceiro ínstar, atingindo uma porcentagem máxima de 30%. A concentração de plasmatócitos, granulócitos e esferulócitos é elevada em lagartas de terceiro ínstar de *D. saccharalis* (OLIVEIRA et al., 2008), com isso, o aumento da densidade de *T. howardi* por lagarta do hospedeiro é necessário para inibir a ação desses hemócitos e permitir que os imaturos do parasitoide completem o seu desenvolvimento. De maneira semelhante, a imunidade de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae) foi suprimida com o aumento das densidades dos parasitoides *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae) e *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle, 1993 (Hymenoptera: Eulophidae) (ANDRADE et al., 2010). A baixa emergência de *T. howardi* de lagartas de *D. saccharalis* é um indicativo que esta fase do hospedeiro não é a mais apropriada para a multiplicação desse parasitoide em laboratório.

A duração do ciclo (ovo-adulto) de *T. howardi* na interação entre os diferentes ínstars de *D. saccharalis* expostos a uma fêmea do parasitoide foi semelhante. Ao se utilizar quatro fêmeas parasitoides por lagarta, o ciclo diferiu significativamente entre os ínstars, sendo menor no quinto ínstar. Isso pode ser devido ao fato de larvas de ínstars avançados fornecerem mais nutrientes para os parasitoides do que larvas mais jovens, resultando em rápido crescimento e desenvolvimento (PASCUA e PASCUA, 2004).

A progênie de *T. howardi* obtida em lagartas de *D. saccharalis* foi maior nas lagartas de quarto e quinto ínstar, o que pode ser devido ao estágio mais avançado desse hospedeiro. Semelhante ao observado com a obtenção de progênie de *D. longicaudata*, que ocorreu somente nos ínstars mais tardios de *A. fraterculus* (VAN NIEUWENHOVE e OVRUSKI, 2011). Já para as lagartas de terceiro ínstar o aumento da densidade resultou em maior número de indivíduos. Isso pode estar relacionado ao fato de um maior número de parasitoides serem necessários para suprimir a imunidade do hospedeiro e dessa forma proporcionar melhores condições para os imaturos completarem seu desenvolvimento. Tendo em vista a comprovação de que o aumento da densidade de parasitoides é importante para reduzir os hemócitos circulantes no hospedeiro, os quais participam dos processos iniciais de reconhecimento de invasores e desencadeiam as defesas humorais (ANDRADE et al., 2010).

A variação da densidade por lagarta de terceiro ínstar de *D. saccharalis* reduziu a razão sexual de *T. howardi*. Esse resultado foi semelhante quando diferentes quantidades de fêmeas de *T. howardi* foram utilizadas para a criação desse parasitoide em pupa de *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) (OLIVEIRA, 2013). De maneira geral, a razão sexual permaneceu adequada, mesmo com a variação da densidade de *T. howardi* por lagarta de *D. saccharalis*.

No estágio larval ocorrem alterações na estrutura de vários tecidos e também no metabolismo do inseto, o que interfere na disponibilidade de nutrientes na hemolinfa das larvas (CÔNSOLI e VINSON, 2009). Esse fato pode explicar a baixa porcentagem de emergência e a grande variação na produção de progênie de *T. howardi* em lagartas de diferentes ínstars de *D. saccharalis*.

O parasitismo de *T. howardi* sobre lagartas de *D. saccharalis* foi influenciado pelos ínstars das lagartas desse hospedeiro e pela densidade de fêmeas parasitoides. A multiplicação de *T. howardi* em lagartas de *D. saccharalis* foi prejudicada devido a baixa emergência nesta fase do hospedeiro, sendo indicada apenas como um

complemento nas criações. No entanto, *T. howardi* parasitou com eficiência as lagartas em laboratório, sendo que uma única fêmea foi capaz de causar a mortalidade de lagartas de segundo, terceiro, quarto e quinto ínstars de *D. saccharalis*. Essas informações são relevantes e favorecem o desenvolvimento de pesquisas que visam à utilização deste parasitoide para o controle desse hospedeiro em plantios de cana-de-açúcar.

5. CONCLUSÕES

Tetrastichus howardi parasita lagartas de segundo, terceiro, quarto e quinto ínstars de *D. saccharalis*, sendo que seu desenvolvimento e emergência ocorre em lagartas de terceiro e quarto ínstars.

Quando o parasitismo acontece em lagartas de quinto ínstar de *D. saccharalis*, a emergência dos parasitoides ocorre na fase de pupa do hospedeiro.

O aumento do número de fêmeas de *T. howardi* por lagarta de *D. saccharalis* proporcionou acréscimo no parasitismo, emergência e progênie do parasitoide.

O maior parasitismo e melhor desenvolvimento de *T. howardi* se dá pelo aumento do número de fêmeas por lagarta de *D. saccharalis*.

O terceiro ínstar de *D. saccharalis* é o mais indicado para utilização em criações de *T. howardi*.

6. AGRADECIMENTOS

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

7. REFERÊNCIAS

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

ANDRADE, G.S.; SERRÃO, J.E.; ZANUNCIO, J.C.; ZANUNCIO, T.V.; LEITE, G.L.D.; POLANCZYK, R.A. Immunity of an alternative host can be overcome by higher densities of its parasitoids *Palmistichus elaeisis* and *Trichospilus diatraeae*. **PLoS ONE**, v. 5, p. 1-7, 2010.

AJAMHASSANI, M.; SENDI, J.J.; FARSI, M.J.; ZIBAEE, A. Purification and characterization of phenoloxidase from the hemolymph of *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae). **Invertebrate Survival Journal**, v. 9, p. 64-71, 2012.

ASGARI, S.; RIVERS, D.B. Venom proteins from endoparasitoid wasps and their role in host-parasite interactions. **Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 313-335, 2011.

BARBOSA, L.S.; COURI, M.S.; COELHO, V.M.A. Desenvolvimento de *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae), utilizando diferentes densidades do parasitoide. **Biota Neotropica**, v. 8, p. 49-54, 2008.

BELL, H.A.; MARRIS, G.C.; PRICKETT, A.J.; EDWARDS, J.P. Influence of host size on the clutch size and developmental success of the gregarious ectoparasitoid *Eulophus pennicornis* (Nees) (Hymenoptera: Braconidae) attacking larvae of the tomato moth *Lacanobia oleracea* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae). **The Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 3199-3209, 2005.

BUENO, R.C.O.F.; PARRA, J.R.P.; BUENO, A.F.; HADDAD, M.L. Desempenho de Tricogramatídeos como potenciais agentes de controle de *Pseudoplusia includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical entomology**, v. 38, p. 389-394, 2009.

BUENO, V.H.P.; SAMPAIO, M.V. Desenvolvimento e multiplicação de parasitóides de pulgões, p.117-167. In: BUENO, V.H.P. (Eds.). **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: Editora UFLA, 2009. 429p.

COLINET, D.; MATHÉ-HUBET, H.; ALLEMAND, R.; GATTI, J.L.; POIRIÉ, M. Variability of venom components in immune suppressive parasitoid wasps: From a phylogenetic to a population approach. **Journal of Insect Physiology**, v. 59, p. 205-212, 2013.

CÔNSOLI, F.L.; VINSON, S.B. Parasitoides (Hymenoptera). In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (Eds.). **Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p. 837-873.

COSTA, C.; IDE, S. Crescimento e muda. In: COSTA, C.; IDE, S.; SIMONKA, C.E. (Eds.). **Insetos imaturos: metamorfose e identificação**. Ribeirão Preto: Holos, 2006. p. 31-36.

CRUZ, I.; REDOAN, A.C.; SILVA, R.B.; FIGUEIREDO, M.L.C.; PENTEADO-DIAS, A.M. New record of *Tetrastichus howardi* (Olliff) as a parasitoid of *Diatraea saccharalis* (Fabr.) on maize. **Scientia Agricola**, v. 68, p. 252-254, 2011.

DANNEELS, E.L.; RIVERS, D.B.; GRAAF, D.C. Venom proteins of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*: Recent discovery of an untapped pharmacopee. **Toxins**, v. 2, p. 494-516, 2010.

DORN, S.; BECKAGE, N. Superparasitism in gregarious hymenopteran parasitoids: ecological, behavioural and physiological perspectives. **Physiological Entomology**, v. 32, p. 199-211, 2007.

HARVEY, J.A.; HARVEY, I.F.; THOMPSON, D.J. Flexible larval growth allows use of a range of host sizes by parasitoid wasp. **Ecology**, v. 75, p. 1420-1428, 1994.

GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.; MACEDO, L.P.M. Criação do parasitoide *Cotesia flavipes* em laboratório. In: BUENO, V.H.P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: Editora UFLA, 2009. p.199-219.

GODFRAY, H.C.J. **Parasitoids, Behavioral and Evolutionary Ecology**. Princeton: University Press, 1994. 473p.

GREENEY, H.F.; DYER, L.A.; SMILANICH, A.M. Feeding by lepidopteran larvae is dangerous: A review of caterpillars' chemical, physiological, morphological, and behavioral defenses against natural enemies. **Invertebrate Survival Journal**, v. 9, p. 7-34, 2012.

HENSLEY, S.D.; HAMMOND, A.H. Laboratory techniques for rearing the sugar cane borer on an artificial diet. **Journal Economy Entomology**, v. 61, p. 1742-1743, 1968.

KARINDAH, S.; SULTANTO, E.S.; SULISTYOWATI, L. Parasitoid larva-pupa *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) pada *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) di pertanaman kubis kota batu dan kabupaten malang. **Jurnal Entomologi Indonesia**, v. 2, p. 61- 68, 2005.

KANOST, M.R. Serine preoteinase inhibitors in arthropod immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 23, p. 291-301, 1999.

KOUAMÉ, K.L.; MACKAUER, M. Influence of aphid size, age and behaviour on host choice by the parasitoid wasp *Ephedrus californicus*: a test of host-size models. **Oecologia**, v. 88, p. 197-203, 1991.

LA SALLE, J.; POLASZEK, A. Afrotropical species of the *Tetrastichus howardi* species group (Hymenoptera: Eulophidae). **African Entomology**, v. 15, p. 45-56, 2007.

LI, L.; SUN, J. Host suitability of a gregarious parasitoid on beetle hosts: flexibility between fitness of adult and offspring. **PLoS ONE**, v. 6, p. 1-6, 2011.

LOPES, C.S. **Regulação do desenvolvimento e resposta imune de lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) por *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae)**. 2008. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.

MAHMOUD, M.; LUNA-SANTILLANA, D.; RODRÍGUES-PÉREZ, M.A. Parasitism by the endoparasitoid, *Cotesia flavipes* induces cellular immunosuppression and enhances susceptibility of the sugar cane borer, *Diatraea saccharalis* to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Insect Science**, v. 11, p. 1-15, 2011.

MUELLER, L.D.; FOLK, D.G.; NGUYEN, N.; NGUYEN, P.; LAM, P.; ROSE, M.R.; BRADLEY, T. Evolution of larval foraging behaviour in *Drosophila* and its effects on growth and metabolic rates. **Physiological Entomology**, v. 30, p. 262-269, 2005.

OLIVEIRA, M.A.P.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; MARQUES, E.J.; ALBUQUERQUE, A.C.; SANTOS, F.A.B.; BARROS, R.; TEIXEIRA, A.A.C. Dinâmica hemocitária em *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae) desafiada imunologicamente pelos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, p. 173-179, 2008.

OLIVEIRA, F.G. **Multiplicação de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) e de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)**. 2013. 63f. Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS.

PARRA, J.R.P. Criação massal de inimigos naturais. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Eds.). **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 143- 164.

PASCUA, M.E.; PASCUA, L.T. Ichneumonid wasp, *Eriborus argenteopilosus* Cameron (hymenoptera: Ichneumonidae) on the different larval stages of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Science**, v. 132, p. 103-108, 2004.

PASTORI, P.L.; ZANUNCIO, J.C.; SILVA, R.O.; PEREIRA, F.F.; AZAMBUJA, R.; PEREIRA, J.M.M. Reprodução de *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) em relação á idade do parasitoide e do hospedeiro. **EntomoBrasilis**, v. 5, p. 37-42, 2012a.

PASTORI, P.L.; PEREIRA, F.F.; ZANUNCIO, J.C.; OLIVEIRA, H.N.; CALADO, V.F.R.; SILVA, R.O. Densidade de fêmeas de *Palmistichus elaeisis* Delvare & Lasalle, 1993 (Hymenoptera: Eulophidae) para sua reprodução em pupas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, p. 525-532, 2012b.

SAMPAIO, M.V.; BUENO, V.H.P.; MALUF, R.P.; Parasitismo de *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Aphidiidae) em diferentes densidades de *Mysus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 81-87, 2001.

SILVA, C.; DUNPHY, G.B.; RAU, M.E. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 24, p. 367-379, 2000.

VAN LENTEREN, J.C. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl**, v. 57, p. 1-20, 2012.

VAN NIEUWENHOVE, A.; OVRUSKI, S.M. Influence of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) Larval Instars on the Production of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymneoptera: Braconidae) Progeny and their Sex Ratio. **Florida Entomologist**, v. 94, p. 863-86, 2011.

VARGAS, E.L.; PEREIRA, F.F.; TAVARES, M.T.; PASTORI, P.L. Record of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Diatraea* sp. (Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane crop in Brazil. **Entomotropica**, v. 26, p. 143-146, 2011.

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

VINSON, S.B. The General Host Selection Behavior of Parasitoid Hymenoptera and a Comparison of Initial Strategies Utilized by Larvaphagous and Oophagous Species. **Biological Control**, v. 11, p. 79-96, 1998.

YANG, N.W.; WAN, F.H. Host suitability of different instars of *Bemisia tabaci* biotype B for the parasitoid *Eretmocerus hayati*. **Biological Control**, v. 59, p. 313–317, 2011.

Tabela 1. Análise de variância (ANOVA) da interação entre densidade de fêmeas de *Tetrastichus howardi* e ínstaes de *Diatraea saccharalis*. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h.

Características biológicas	F	p (< 0,05)
Parasitismo	3,734	0,0149*
Emergência	0,574	0,6336 ^{ns}
Duração do ciclo (ovo-adulto)	4,887	0,0221*
Progênie	4,329	0,0314*
Razão sexual	0,344	0,7143 ^{ns}

^{ns} Não significativo

* Significativo a 5% de probabilidade

Tabela 2. Parasitismo (médias \pm erro padrão) de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) com variação na densidade de fêmeas e ínstaes de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h.

Densidade de fêmeas	Parasitismo de <i>Tetrastichus howardi</i>			
	Ínstaes de <i>Diatraea saccharalis</i>			
	2°	3°	4°	5°
1	52,00 \pm 5,33Ab	62,00 \pm 7,57Aa	34,00 \pm 6,00Bb	12,00 \pm 6,11Cb
4	100,00 \pm 0,00Aa	72,00 \pm 6,80Ba	72,00 \pm 4,42Ba	36,00 \pm 8,33Ca

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3. Duração do ciclo (dias) (médias \pm erro padrão) e progênie (médias \pm erro padrão) de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) com variação na densidade de fêmeas e ínstaes de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h.

Ínstaes	Duração do ciclo (ovo-adulto)		Progênie por lagarta	
	fêmea: lagarta	fêmeas: lagarta	fêmea: lagarta	fêmeas: lagarta
	1:1	4:1	1:1	4:1
3°	21,33 \pm 1,33Ba	26,66 \pm 1,05Aa	53,67 \pm 2,60Ab	15,67 \pm 5,28Bb
4°	20,00 \pm 0,00Ba	25,66 \pm 1,45Aa	59,66 \pm 7,31Ab	79,33 \pm 21,66Aa
5°	22,00 \pm 4,00Aa	20,40 \pm 0,40Ab	127,00 \pm 4,00Aa	52,40 \pm 9,29Ba

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

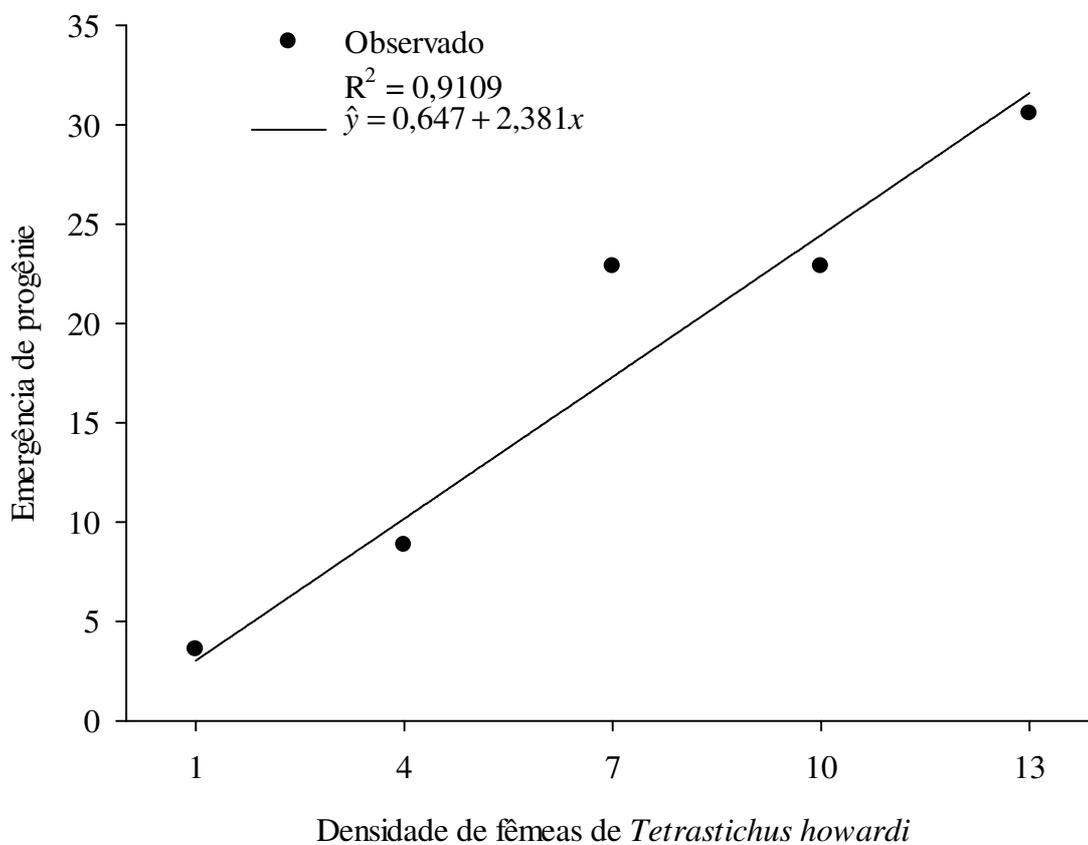


Figura 1. Emergência de progênie de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) nas densidades de 1, 4, 7, 10 ou 13 fêmeas por lagarta de terceiro ínstar de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h ($F = 30,6662$; $p = 0,0116$).

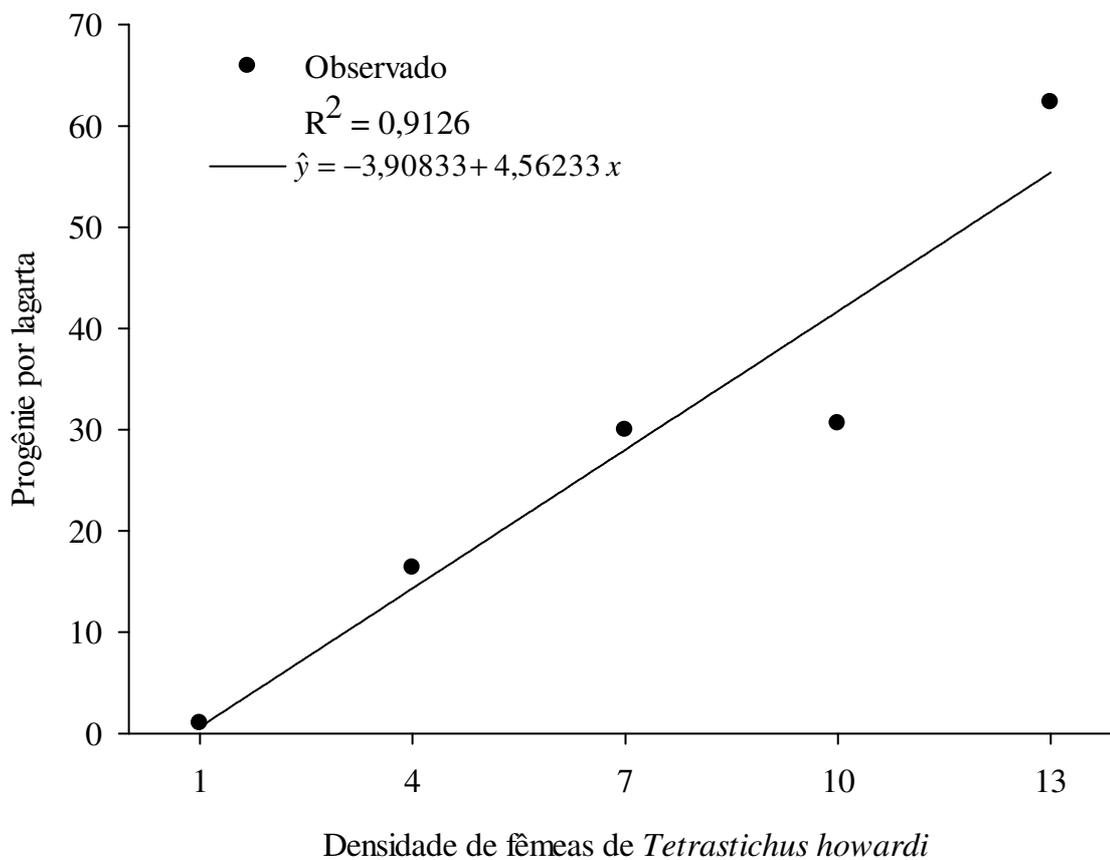


Figura 2. Progênie de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) nas densidades de 1, 4, 7, 10 ou 13 fêmeas por lagarta de terceiro ínstar de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h ($F = 31,3330$; $p = 0,0113$).

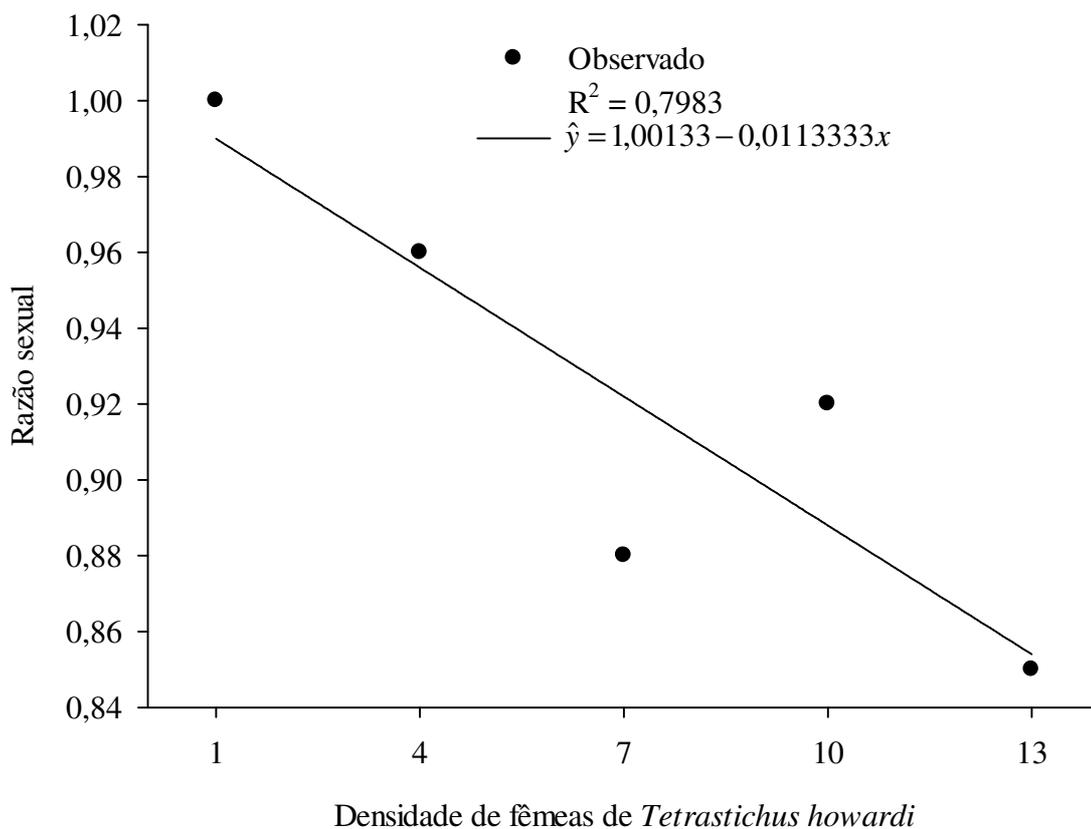


Figura 3. Razão sexual de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) nas densidades de 1, 4, 7, 10 ou 13 fêmeas por lagarta de terceiro ínstar de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h ($F = 11,8767$; $p = 0,0410$).

CONCLUSÕES GERAIS

Tetrastichus howardi ocorre naturalmente em cultivos de cana-de-açúcar de Dourados, Mato Grosso do Sul.

Tetrastichus howardi parasitou duas fases de desenvolvimento do hospedeiro *D. saccharalis*, lagarta e pupa.

A criação de *T. howardi* em pupas de *D. saccharalis* por 25 gerações sucessivas não compromete a qualidade biológica do parasitoide.

A densidade de até 14 fêmeas de *T. howardi* por pupa de *D. saccharalis* é a mais efetiva para proporcionar aumento da progênie sem perder características biológicas essenciais em uma criação de laboratório.

Uma fêmea de *T. howardi* possui capacidade de parasitar em média quatro pupas de *D. saccharalis*, com progênie total de $113,75 \pm 1,93$, chegando a parasitar sete pupas.

Tetrastichus howardi é capaz de completar seu ciclo e emergir de adultos de *D. saccharalis*.

Tetrastichus howardi parasita lagartas de segundo, terceiro, quarto e quinto instares de *D. saccharalis*, sendo que seu desenvolvimento e emergência ocorre em lagartas de terceiro e quarto instares.

Quando o parasitismo acontece em lagartas de quinto ínstar de *D. saccharalis*, a emergência dos parasitoides ocorre na fase de pupa do hospedeiro.

O aumento do número de fêmeas de *T. howardi* por lagarta de *D. saccharalis* proporcionou acréscimo no parasitismo, emergência e progênie do parasitoide.

O maior parasitismo e melhor desenvolvimento de *T. howardi* se dá pelo aumento do número de fêmeas por lagarta de *D. saccharalis*.

O terceiro ínstar de *D. saccharalis* é o mais indicado para utilização em criações de *T. howardi*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho registram o parasitismo de lagartas de diferentes ínstares de *Diatraea saccharalis* por *Tetrastichus howardi*. Além disso, proporcionam um melhor conhecimento do desempenho reprodutivo de *T. howardi* multiplicado em pupas de *D. saccharalis* por sucessivas gerações e sob diferentes densidades do parasitoide e do hospedeiro.

Essas informações são importantes, pois podem contribuir para a otimização da multiplicação de *T. howardi* em laboratório, assim como para o planejamento de estudos visando o controle biológico de *D. saccharalis* com este inimigo natural em condições de campo.

ANEXO

ANEXO A. Dieta de Hensley e Hammond (1968) modificada para a criação de lagartas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae).

Ingredientes	Quantidades (g ou mL)	
	Dieta de criação *	Dieta de realimentação
Água destilada	3800 mL	6400 mL
Açúcar	205 g	360 g
Farelo de soja	300 g	540 g
Germe de trigo	150 g	-
Levedura de cana	225 g	400 g
Metilparahidroxibenzoato	15 g	40 g
Ácido ascórbico	8 g	8 g
Sais de Wesson	15 g	-
Cloreto de colina	2 g	8 g
Solução vitamínica	40 mL	40 mL
Vita Gold	3 mL	7 mL
Ácido nalidíxico	3 g	3 g
Cloridrato de tetraciclina	3 g	3 g
Formol	6 mL	14 mL
Caragenato	65 g	150 g
Ácido acético	-	65 mL

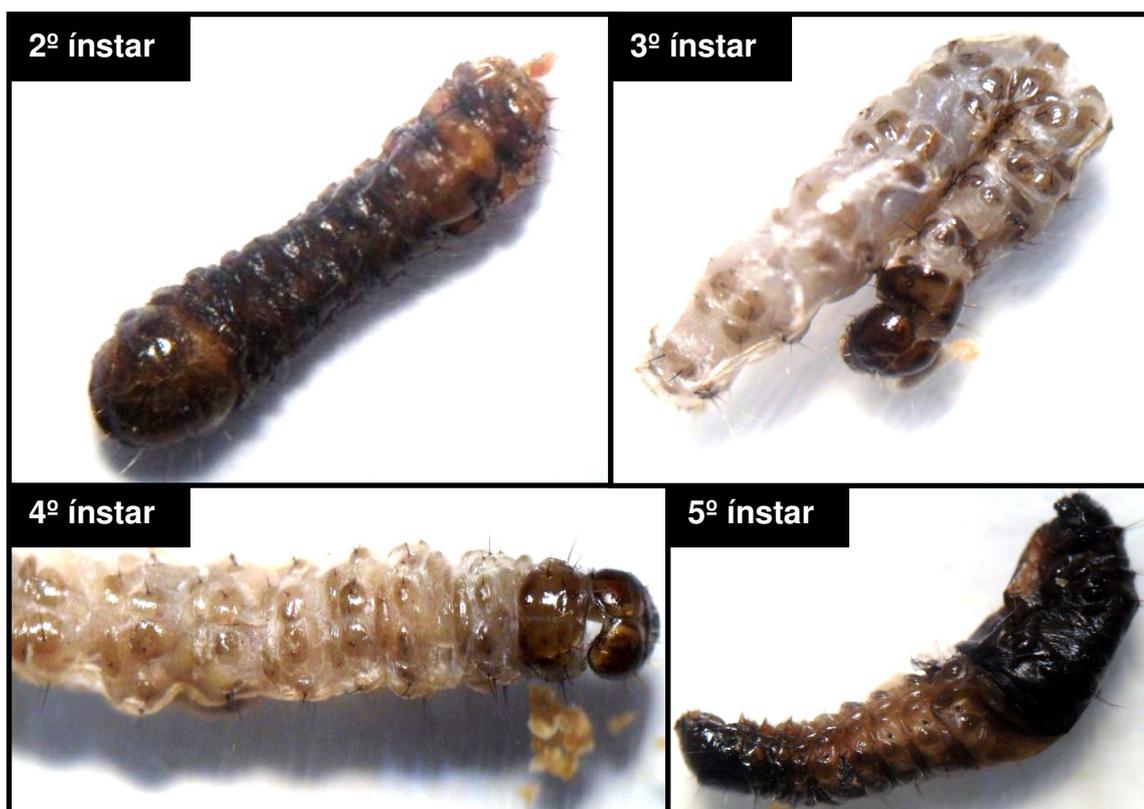
* Quantidade de ingredientes para 12 frascos de vidro (capacidade para 500 mL).

APÊNDICE



Fotos: Elizangela Leite Vargas

APÊNDICE A. Fêmea de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitando pupa de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Imaturos de *T. howardi* (B)



Fotos: Elizangela Leite Vargas

APÊNDICE B. Lagartas de segundo, terceiro, quarto e quinto ínstares de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) parasitadas por *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae).