

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

SUSCETIBILIDADE E DESEMPENHO BIOLÓGICO DE TRÊS
EULOFÍDEOS PARASITOIDES A FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS

Camila Rossoni

Dourados-MS
Agosto de 2016

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

Camila Rossoni

SUSCETIBILIDADE E DESEMPENHO BIOLÓGICO DE TRÊS
EULOFÍDEOS PARASITOIDES A FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

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

Orientador: Dr. Fabricio Fagundes Pereira

Dourados-MS
Agosto de 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

R823s Rossoni, Camila.
Suscetibilidade e desempenho biológico de três eulofídeos parasitoides a fungos entomopatogênicos. / Camila Rossoni. – Dourados, MS : UFGD, 2016.
137f.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Fagundes Pereira.
Tese (Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. *Palmistichus elaeisis*. 2. *Tetrastichus howardi*. 3. *Trichospilus diatraeae*. 4. *Beauveria bassiana*. 5. *Metarhizium anisopliae*. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

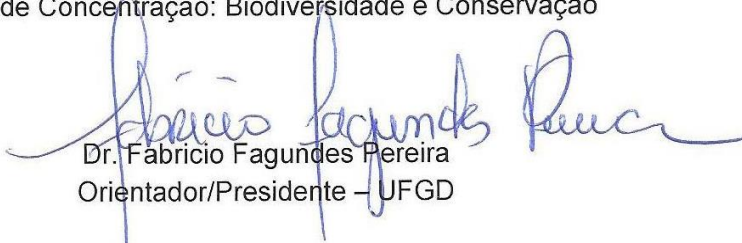
©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

**“SUSCETIBILIDADE E DESEMPENHO BIOLÓGICO DE TRÊS EULOFÍDEOS
PARASITOIDES A FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.”**

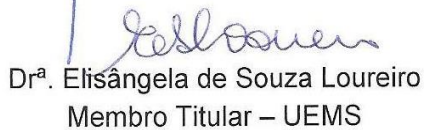
Por

CAMILA ROSSONI

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



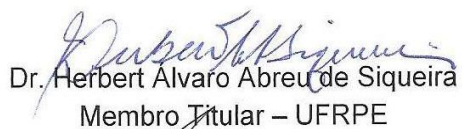
Dr. Fabricio Fagundes Pereira
Orientador/Presidente – UFGD



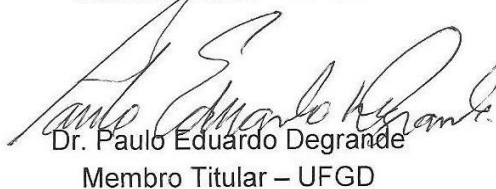
Dr.ª Elisângela de Souza Loureiro
Membro Titular – UEMS



Dr. Gilberto Santos Andrade
Membro Titular – UTFPR



Dr. Herbert Alvaro Abreu de Siqueira
Membro Titular – UFRPE



Dr. Paulo Eduardo Degrande
Membro Titular – UFGD

Aprovada em: 24 de agosto de 2016.

BIOGRAFIA

CAMILA ROSSONI, filha de Vilmar José Rossoni e Vera Lúcia Sebben Rossoni, nasceu na cidade de Realeza, Estado do Paraná, Brasil, no dia 24 de abril de 1989.

Em 1994 mudou-se com a família para Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, onde iniciou o ensino fundamental na escola Estadual Castro Alves em 1996 permanecendo até a 4º série no ano 1999, sendo transferida então para a escola Estadual Presidente Vargas em 2000, onde finalizou o ensino fundamental em 2003. Os três anos seguintes do ensino médio 2004/05/06 foram cursados na escola Decisivo Sistema Anglo de ensino, então em 2007, ingressou no Curso de Ciências Biológicas (Bacharelado) da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados (FCBA/UFGD) em Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, concluindo-o em março de 2011 pela mesma faculdade.

Em março de 2011, iniciou o Curso de Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade (FCBA/UFGD) em Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, defendendo a Dissertação em março de 2013. Em março de 2013, iniciou o Curso de Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade (FCBA/UFGD), submetendo-se a defesa em Agosto de 2016.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por estar sempre a meu lado, me dando o suficiente para viver e para meu crescimento, me protegendo e me iluminando.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, da Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade de realizar o Curso de Doutorado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, da Universidade Federal da Grande Dourados pelos ensinamentos transmitidos.

Ao meu orientador Dr. Fabricio Fagundes Pereira pelos ensinamentos transmitidos, durante esses anos de orientação e pela confiança e amizade.

A professora Dr^a. Elisângela de Souza Loureiro pelos ensinamentos transmitidos, carinho e amizade.

A banca examinadora formada pela Dr^a. Elisângela de Souza Loureiro, Dr. Gilberto Santos Andrade, Dr. Herbert Álvaro Abreu de Siqueira e Dr. Paulo Eduardo Degrande, por disponibilizarem parte de seu tempo para corrigir e partilhar sugestões valiosas a este documento.

A todos os meus familiares, pelo apoio e confiança. Em especial agradeço aos meus pais Vilmar José Rossoni e Vera Lúcia Seben Rossoni, por toda a educação e incentivo que me proporcionaram durante todos estes anos da minha vida. A minha irmã Regina Rossoni pela compreensão e a minha sobrinha querida Bianca Rossoni Kronbauer pelo carinho. A minha sogra/amiga Rosana Aparecida de Oliveira Kassab pela compreensão e conselhos.

Com muito amor agradeço ao meu marido Samir Oliveira Kassab que sempre me serviu de fonte inspiradora para enfrentar todos os obstáculos e seguir em frente, e me deu muito carinho e apoio durante toda minha formação acadêmica.

A minha amiga/irmã Ana Paula Catalano Neto e ao meu amigo Renato dos Prazeres Silva pelo apoio, carinho e compreensão nestes anos.

Ao amigo Rodrigo Keite Arakava pela ajuda na manutenção das criações e pelos momentos de conversas e risadas durante estes últimos anos.

Agradeço também aos amigos Augusto Rodrigues, Isabela Chaves da Conceição e Talita dos Santos Ribeiro por toda ajuda na condução dos experimentos e nas criações de insetos. Aos amigos Antonio de Souza Silva, Nahara Gabriela Piñeyro Ferreira, Rogério Hidalgo Barbosa, Winnie Cezario Fernandes e Eduardo Faca pelos momentos de descontração e a todos os colegas que trabalharam comigo no Laboratório de Controle Biológico de Insetos da UFGD.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo auxílio financeiro para a execução deste trabalho.

A empresa Ballagro Agro-Tecnologia pela concessão dos produtos biológicos e a Usina São Fernando Açúcar e Alcool por permitir usar sua área na realização dos experimentos.

Aos meus pais Vilmar José Rossoni e Vera Lúcia Sebben Rossoni. A minha irmã Regina Rossoni, a minha sobrinha Bianca Rossoni Kronbauer, a minha sogra Rosana Aparecida de Oliveira Kassab e ao meu marido Samir Oliveira Kassab, pelos momentos de compreensão, convívio, amizade, respeito e amor incondicional compartilhados.

Aos meus amigos, colegas e professores,
Pelos ensinamentos, apoio, incentivo e companheirismo.

Dedico

SUMÁRIO

“SUSCETIBILIDADE E DESEMPENHO BIOLÓGICO DE TRÊS EULOFÍDEOS PARASITOIDES A FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS”

	página
Resumo Geral.....	1
General Abstract.....	3
Introdução.....	5
Revisão Bibliográfica.....	6
Objetivo Geral.....	16
Hipóteses.....	17
Referências.....	18
CAPÍTULO I - Efeito de <i>Beauveria bassiana</i> (Cordycipitaceae) e <i>Metarhizium anisopliae</i> (Clavicipitaceae) sobre parasitoides eulofídeos (Hymenoptera)	
Resumo.....	37
Introdução.....	38
Material e Métodos.....	40
Resultados.....	45
Discussão.....	48
Conclusão.....	53
Agradecimentos.....	53
Referências.....	54

CAPÍTULO II - Desenvolvimento de eulofídeos (Hymenoptera) em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) expostas a fungos entomopatogênicos

Resumo.....	69
Introdução.....	70
Material e Métodos.....	72
Resultados.....	75
Discussão.....	77
Conclusão.....	82
Agradecimentos.....	82
Referências.....	82

CAPÍTULO III - Interações de *Beauveria bassiana* (Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Clavicipitaceae) com parasitoides eulofídeos (Hymenoptera) em plantas de cana-de-açúcar

Resumo.....	95
Introdução.....	96
Material e Métodos.....	98
Resultados.....	101
Discussão.....	102
Conclusão.....	106
Agradecimentos.....	106
Referências.....	106
Conclusões Gerais.....	120
Considerações Finais.....	121
Anexos.....	122

RESUMO GERAL

Himenópteros parasitoides têm sido relacionados como inimigos naturais, dentre esses, os parasitoides *Palmistichus elaeisis* Delvare e Lasalle, 1993, *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) e *Trichospilus diatraeae* Cherian e Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae) são relatados no controle de pragas de importância agrícola, especialmente, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). Juntamente com os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 (Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff, 1879) Sorokin, 1883 (Clavicipitaceae) estes parasitoides podem regular populações de insetos após aplicações inundativas e inoculativas. Por isto, o objetivo deste trabalho foi avaliar se os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. Anisopliae* prejudicam o desenvolvimento destes eulofídeos e a sobrevivência de fêmeas adultas. No primeiro trabalho experimento I, fêmeas de cada espécie de parasitoide foram individualizadas em tubos de vidro, contendo uma superfície de contato de papel filtro (3 cm de largura × 3 cm de comprimento) tratada com as concentrações de 1×10^9 con. mL⁻¹, 5×10^9 con. mL⁻¹, 10×10^9 con. mL⁻¹ dos produtos à base de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, sendo as mortalidades diária e confirmada avaliadas. No experimento II, as fêmeas dos eulofídeos foram expostas as mesmas três concentrações dos bioinseticidas por 48 horas. Após a exposição, cinco fêmeas dos parasitoides de cada tratamento foram individualizadas em tubos de ensaio juntamente com uma pupa de *D. saccharalis* e o parasitismo foi permitido por 24 horas. No segundo trabalho, pupas do hospedeiro foram expostas ao parasitismo por três fêmeas de cada espécie de parasitoide por 72 h, depois, as pupas parasitadas foram acondicionadas, individualmente, em tubos de vidro e tampados com algodão, sendo que no interior de cada tubo, foi inserido uma superfície de contato tratada com 1 mL de suspensão fúngica nas concentrações de 1×10^9 con. mL⁻¹, 5×10^9 con. mL⁻¹, 10×10^9 con. mL⁻¹ dos produtos à base de *B. bassiana* e *M. anisopliae* e acondicionados em câmara climatizada (BOD). Por fim, no terceiro trabalho, pupas de *D. saccharalis* foram individualizadas e inseridas em orifícios pré-perfurados em um

colmo amarrado na planta de cana-de-açúcar, posteriormente foram pulverizadas as formulações dos dois entomopatógenos separadamente na concentração de $5,5 \times 10^9$ con. mL⁻¹ e então a touceira de cana foi coberta, individualmente, com uma gaiola de “voil”, sendo posteriormente liberadas 102 fêmeas dos parasitoides por pupa separadamente. O parasitismo foi permitido por quatro dias e, após esse período, as pupas foram retiradas dos colmos e levadas ao laboratório para avaliação da porcentagem de parasitismo, porcentagem de emergência, a duração do ciclo de vida, progênie e a razão sexual. No primeiro trabalho foi possível concluir que os fungos entomopatogênicos reduziram a longevidade de fêmeas de *P. elaeisis* e *T. diatraeae* com maior mortalidade para a espécie *T. howardi*. No entanto, este fato não influenciou o parasitismo e a emergência de *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* em pupas de *D. saccharalis*. No segundo trabalho, a emergência de *T. howardi* e *T. diatraeae* não foi comprometida pelos fungos entomopatogênicos, porém a espécie *P. elaeisis* foi afetada, no entanto, a duração do ciclo de vida, progênie e razão sexual destes parasitoides não foram afetadas após exposição aos entomopatógenos no interior das pupas. No terceiro trabalho, os fungos entomopatogênicos na concentração de $5,5 \times 10^9$ con. mL⁻¹ não prejudicaram o parasitismo de pupas *D. saccharalis* pelos parasitoides da família Eulophidae em plantas de cana-de-açúcar. De maneira geral, os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* nas concentrações testadas são compatíveis com os parasitoides *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae*.

Palavras chave: *Palmistichus elaeisis*, *Tetrastichus howardi*, *Trichospilus diatraeae*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*

GENERAL ABSTRACT

Hymenoptera parasitoids have been reported as natural enemies, among these, the parasitoids *Palmistichus elaeisis* Delvare and Lasalle, 1993, *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) and *Trichospilus diatraeae* Cherian and Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae) are reported in the control of pests of agricultural importance, especially, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). Along with the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 (Cordycipitaceae) and *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff, 1879) Sorokin, 1883 (Clavicipitaceae) these parasitoids can regulate insects populations after inundative and inoculative applications. Therefore, the objective of this study was to evaluate whether the entomopathogenic fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* detrimental to the development of these Eulophidae parasitoids and the survival of adult females. In the experiment I first work, females of each species of parasitoid were individualized in glass tubes, containing a contact surface of filter paper (3 cm wide $\times$ 3 cm length) treated with concentrations of 1×10^9 con. mL⁻¹, 5×10^9 con. mL⁻¹, 10×10^9 con. mL⁻¹ of products based on *B. bassiana* and *M. anisopliae*, and the daily and confirmed mortality were assessed. In the experiment II, the females of Eulophidae parasitoids were exposed to the same three concentrations of biopesticides for 48 hours. After exposure, five female parasitoids of each treatment were individualized in test tubes along with a pupa of *D. saccharalis* and the parasitism was allowed for 24 hours. In the second work, pupae of the host were exposed to parasitism by three females of each species of parasitoid for 72 h, after the parasitized pupae were placed individually, in glass tubes and capped with cotton, and inside each tube, It was inserted a contact surface treated with 1 mL of fungal suspension with concentrations of 1×10^9 con. mL⁻¹, 5×10^9 con. mL⁻¹, 10×10^9 con. mL⁻¹ of products based on *B. bassiana* and *M. anisopliae* and placed in a growth chamber (BOD). Finally, in the third work, pupae of *D. saccharalis* were individualized and inserted into pre-drilled holes in stalks of the sugarcane plant, were subsequently sprayed formulations of two

entomopathogens separately at a concentration of 5.5×10^9 con. mL⁻¹ and then the sugarcane plant was covered individually with a cage of fabric "voil", and later 102 parasitoids female per pupae was separately released. The parasitism was allowed for four days and after this period, the pupae were removed from the stalks and taken to the laboratory for evaluation of parasitism, emergence percentage, the duration of the life cycle, progeny and the sex ratio. In the first study it was concluded that the entomopathogenic fungi reduced the longevity of females of *P. elaeisis* and *T. diatraeae* with higher mortality for the species *T. howardi*. However, this fact did not influence the parasitism and the emergence of *P. elaeisis*, *T. howardi* and *T. diatraeae* in pupae of *D. saccharalis*. In the second work, the emergence of *T. howardi* and *T. diatraeae* was not compromised by entomopathogenic fungi. However the species *P. elaeisis* was affected, but the duration of the life cycle, the progeny of these parasitoids and sex ratio were not affected after exposure to entomopathogens inside the pupae. In the third work, the entomopathogenic fungi at a concentration of 5.5×10^9 con. mL⁻¹ did not prevent the parasitism of pupae of *D. saccharalis* by Eulophidae parasitoids in sugarcane plants. In general, the fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* in the tested concentrations are compatible with the parasitoid *P. elaeisis*, *T. howardi* and *T. diatraeae*.

Key words: *Palmistichus elaeisis*, *Tetrastichus howardi*, *Trichospilus diatraeae*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*

INTRODUÇÃO GERAL

O setor sucroalcooleiro apresenta posição de destaque no cenário socioeconômico brasileiro, dada sua importância na geração de renda e empregos para o Brasil. A expansão das áreas destinadas ao cultivo de cana-de-açúcar se justifica pela crescente demanda dos produtos derivados dessa cultura, principalmente, açúcar, etanol e bioeletricidade (Conab 2015).

Diatraea saccharalis (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), conhecida como broca-da-cana, *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) e *Mahanarva posticata* (Stål, 1855) (Hemiptera: Cercopidae) denominadas popularmente como cigarrinha-das-raízes e cigarrinha-das-folhas, respectivamente, são insetos-praga que causam prejuízos na cultura da cana-de-açúcar (Botelho 1992; Dossi *et al.* 2006; Kassab *et al.* 2015).

A utilização de agentes biológicos como fungos entomopatogênicos e parasitoides tem sido um método bastante explorado no controle das cigarrinhas e da broca respectivamente. Himenópteros parasitoides têm sido relacionados como inimigos naturais, dentre esses, os parasitoides *Palmistichus elaeisis* Delvare e Lasalle, 1993, *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) e *Trichospilus diatraeae* Cherian e Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae) são relatados no controle de pragas de importância agrícola, especialmente, *D. saccharalis* (Vargas *et al.* 2011; Chicera *et al.* 2012; Rodrigues *et al.* 2013).

Juntamente com os parasitoides, os fungos entomopatogênicos podem regular populações de insetos em aplicações inundativas e inoculativas (Kurtti e Keyhani 2008). *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff, 1879) Sorokin, 1883 (Clavicipitaceae), fungo entomopatogênico aplicado em canaviais do Brasil, reduz populações de *M. fimbriolata* para níveis inferiores aos de dano econômico (Loureiro *et al.* 2005). Além disso, *D. saccharalis* é suscetível a *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 (Cordycipitaceae) e *M. anisopliae* e o contato dos fungos entomopatogênicos com a broca da cana-de-açúcar pode afetar as características biológicas deste inseto-praga (Wenzel *et al.* 2006; Oliveira *et al.* 2008; Hayashida *et al.* 2014).

Interações sinérgicas entre patógenos e inimigos naturais aumentam a eficácia de controle de pragas, considerando que interações antagônicas as reduzem (Fuentes-Contreras e Niemeyer 2000; Stolz *et al.* 2002; Rossoni *et al.* 2014a, 2014b). Dessa forma, entender os padrões de mortalidade e as interações entre os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* e os inimigos naturais *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* é importante para se aprimorar programas de controle biológico com esses organismos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A cultura da cana-de-açúcar no Brasil

A cana-de-açúcar chegou ao Brasil em 1502 a partir de mudas da Ilha da Madeira, e o cultivo ficou estagnado por falta de mão-de-obra e de interesse da população que tinha sua economia voltada ao extrativismo de madeira e a descoberta de minas de ouro e prata (Corrêa 1926).

A agroindústria de cana-de-açúcar no Brasil só começou a se desenvolver com a construção dos engenhos na região nordeste e a partir de 1535 este setor já havia conquistado o monopólio mundial de produção de açúcar e, assim contribuía com o desenvolvimento do país (Corrêa 1935). Atualmente, a cultura tem grande importância econômica para alguns países das Américas, especialmente, para o Brasil (Smeets *et al.* 2008) que se destaca como um dos principais produtores mundiais do complexo sucroalcooleiro e o país com maior competitividade no custo de produção de açúcar e álcool (Carvalho e Oliveira 2006; Sandoval e Senô 2010).

Com a criação do Instituto do Álcool e Açúcar (IAA) por Getúlio Vargas em 1933, o setor passou a ser regulamentado e a receber incentivos para produção e exportação do açúcar o que favoreceu o crescimento do setor e em 1955, a área ocupada pela cana-de-açúcar no Brasil atingia cerca de 1 milhão de hectares (Rosseto 2008).

Atualmente a área cultivada no Brasil com cana-de-açúcar é de 9.057,2 mil hectares que deverá ser colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2015/16. A produção de cana-de-açúcar alcançou 663,11 milhões de toneladas na

última safra com um aumento de 4,5% de produção em relação à safra 2014/2015 (Conab 2015). A produção de açúcar no Brasil chegou a 35,56 milhões de toneladas na safra 2014/15, estima-se que para a safra 2015/16 ocorrerá um aumento de 5,8%, chegando a 37,63 milhões de toneladas (Conab 2015; Biosul 2015).

A produção de etanol total consolidou-se em 28,66 bilhões de litros na safra 2014/15 e está estimado em 28,82 bilhões de litros para safra 2015/16, um aumento de 156,94 milhões de litros, ou 0,5%. Sendo que o etanol anidro, utilizado na mistura com a gasolina, deve ter um aumento de 355,17 milhões de litros e o etanol hidratado, utilizado nos veículos *flex fuel*, a expectativa é de redução de 1,2%, quando comparado com a produção da safra anterior, o que equivale a menos 198,23 milhões de litros (Conab 2015).

O estado de Mato Grosso do Sul possui 7,9% (713,7 mil hectares) da área plantada ocupando a quarta posição no ranking nacional da produção de cana-de-açúcar (Conab 2015). Neste estado, o potencial para crescimento da produção do etanol, quer seja como aditivo à gasolina ou em veículos *flex fuel*, é um dos maiores do país. As 22 usinas de açúcar e álcool atuais processaram 47 milhões de toneladas de cana e com os novos empreendimentos industriais o volume irá passar de 1,9 bilhão de litros na safra 2009/2010, para 5,9 bilhões de litros na safra 2015 (Biosul 2015).

Um fator limitante a produção sucroalcooleira é o ataque de insetos-praga que causam dano à cultura da cana-de-açúcar. Dentre estes insetos, são considerados os mais importantes *D. saccharalis*, conhecido como broca-da-cana, *M. fimbriolata* e *M. posticata* (Stål, 1855) (Hemiptera: Cercopidae) denominadas popularmente como cigarrinha-das-raízes e cigarrinha-das-folhas, respectivamente (Botelho 1992; Mendonça 2005; Dossi *et al.* 2006; Sandoval e Senô 2010).

A broca-da-cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*

Diatraea saccharalis é a principal praga da cana-de-açúcar, ocorrendo em todo hemisfério oeste onde a cultura é cultivada. Esta espécie também ataca outras

culturas de importância econômica como o milho, o sorgo e o arroz (Pinto *et al.* 2006).

A broca da cana-de-açúcar tem como sua provável origem a América Central e do Sul. O adulto é uma mariposa com asas em forma de “Vs” invertidos quando fechadas, sendo as anteriores de coloração amarelo-palha, com alguns desenhos pardacentos e as asas posteriores esbranquiçadas, sua longevidade é de aproximadamente cinco dias. Os machos se diferenciam das fêmeas por serem de menor tamanho e apresentarem maior pigmentação nas asas, além de possuírem cerdas no último par de pernas (Téran *et al.* 1983; Botelho e Macedo 2002; Gallo *et al.* 2002).

A fêmea realiza a postura nas folhas da cana, com número de ovos variável de cinco a 50, colocados em massas. Os ovos são muito sensíveis à dessecação, podendo tornar-se ressecados em umidades menores que 70% e duram entre quatro a doze dias até a eclosão. As lagartas recém-eclodidas alimentam-se inicialmente do parênquima foliar, convergindo posteriormente para a bainha e, após a primeira ecdise, penetram no colmo pela sua parte mais tenra (Gallo *et al.* 1988; Gallo *et al.* 2002; Pinto *et al.* 2006).

A duração do estágio larval de *D. saccharalis* pode variar de 50 a 90 dias podendo ocorrer até seis ecdises, o estágio de pupa dura de 10 a 11 dias e a longevidade de adultos de três a sete dias variando em função da temperatura. As lagartas possuem três pares de pernas torácicas, quatro pares de falsas pernas abdominais e mais um par de falsas pernas anais. Apresentam coloração branco-leitosa, cápsula cefálica marrom-escura e linhas marrons dispostas ao longo do corpo (Botelho 1985; Téran *et al.* 1983; Mélo e Parra 1988; Botelho e Macedo 2002).

As injúrias diretas causadas por *D. saccharalis* podem ocasionar perda na biomassa e morte das gemas apicais das plantas pela abertura de galerias, ocasionando perda de peso da cana. Em canas novas podem causar o “coração morto” (Macedo e Botelho 1988; Gallo *et al.* 2002; Dinardo-Miranda *et al.* 2011, 2012). O dano indireto deve-se à redução da produção de açúcar e álcool devido a microrganismos que invertem o açúcar ou contaminam o caldo extraído dos

colmos atacados (Macedo e Botelho 1988; Gallo *et al.* 2002; Simões *et al.* 2012; Rossato *et al.* 2013).

As perdas provocadas pela broca da cana-de-açúcar para cada 1% de intensidade de infestação dessa praga são de 0,25% de açúcar, 0,20% de álcool e 0,77% de peso (Gallo *et al.* 2002).

Inseticidas químicos são pouco eficientes para o controle de *D. saccharalis*, cujas lagartas de primeiro instar migram para o colmo da cana-de-açúcar, ficando protegidas das aplicações (Cirelli e Penteado Dias 2003; Antigo *et al.* 2013; Oliveira *et al.* 2014) e isso tem motivado a busca por outros métodos de controle, visando reduzir a densidade populacional desse lepidóptero-praga, como a utilização de parasitoides (Rodrigues *et al.* 2013).

Aspectos taxonômicos e biológicos de *Palmistichus elaeisis*, *Trichospilus diatraeae* e *Tetrastichus howardi*

Parasitoides são eficientes reguladores de pragas agrícolas, apresentam menor custo (Favero *et al.* 2013, 2014) e risco ambiental (Barrat *et al.* 2010) para o controle de insetos em relação aos inseticidas químicos.

Dentre estes inimigos naturais, a família Eulophidae é uma das mais diversas dentro de Chalcidoidea e se destaca como sendo importante para o controle biológico, pois ao se desenvolver dentro do hospedeiro leva-o a morte (Noyes 2003; Pereira *et al.* 2010; Munro *et al.* 2011). Esta família pertence à ordem Hymenoptera e é constituída de 297 gêneros e 4472 espécies distribuídas em cinco subfamílias: Entiinae, Eulophinae, Entedoninae, Tetrastichinae e Opheliminae (Noyes 2003). São insetos pequenos e abundantes em todas as regiões tropicais e temperadas, sendo em sua maioria parasitoides que possuem diferenças em sua biologia, pois se desenvolvem em estágios adulto e imaturo em uma diversidade de hospedeiros de diferentes táxons incluindo mais de 100 famílias e 10 ordens de artrópodes (Lasalle 1994; Schauff *et al.* 1997; Munro *et al.* 2011).

Estes inimigos naturais podem ser endoparasitoides ou ectoparasitoides, ou seja, se desenvolvem dentro ou fora de seus hospedeiros; coinobiontes ou

idiobiontes, eles podem permitir que seu hospedeiro cresça enquanto eles se desenvolvem ou podem se desenvolver em hospedeiros mortos ou paralisados; são solitários ou gregários; primários que se desenvolvem em hospedeiros não parasitados ou hiperparasitoides que se desenvolvem em outros parasitoides; ou ainda podem ser especialistas ou generalistas o que ressalta ainda mais a importância desses indivíduos como controladores biológicos (Gauthier *et al.* 2000; Parra *et al.* 2002; Hansson 2004).

Palmistichus elaeisis e *T. diatraeae* parasitam e se desenvolvem em insetos das famílias Riodinidae (Delvare e Lasalle 1993; Zaché *et al.* 2011a), Geometridae (Pereira *et al.* 2008a; Zaché *et al.* 2010; Pereira *et al.* 2011; Pastori *et al.* 2012), Noctuidae (Bittencourt e Berti-filho 2004; Andrade *et al.* 2010), Arctiidae (Delvare e Lasalle 1993; Zaché *et al.* 2013), Saturniidae (Pereira *et al.* 2008b; Pastori *et al.* 2012), Lymantriidae (Zaché *et al.* 2011b; Zaché *et al.* 2012a), Nymphalidae (Bouček 1976; Zaché *et al.* 2012b; Tavares *et al.* 2013), Crambidae (Bittencourt e Berti-filho 2004; Chichera *et al.* 2012; Glaeser *et al.* 2014; Silva *et al.* 2015) e Tenebrionidae (Zanuncio *et al.* 2008; Favero *et al.* 2013).

Tetrastichus howardi (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) foi registrado se desenvolvendo em insetos das famílias Plutellidae, Noctuidae, Pyralidae (Kfir *et al.* 1993; Lasalle e Polaszek 2007; Silva-Torres *et al.* 2010), Sphingidae (Barbosa *et al.* 2015) e Crambidae (González *et al.* 2003; Pereira *et al.* 2015). Uma peculiaridade desse parasitoide é a sua capacidade de parasitar as fases de larva e pupa do hospedeiro *D. saccharalis* (Vargas *et al.* 2011; Pereira *et al.* 2015). Além da habilidade de penetrar nas galerias produzidas nas plantas de cana-de-açúcar por este lepidóptero (Felix *et al.* 2005).

Palmistichus elaeisis é um endoparasitoide de pupas, preferencialmente de lepidópteros, com hábito gregário que foi relatado em mais de 20 espécies (Pereira *et al.* 2009). Alguns aspectos da biologia de *P. elaeisis* foram descritos por Bittencourt & Berti Filho (2004) em hospedeiros como *D. saccharalis*, *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818, *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae). Os autores descrevem os ovos deste inimigo

natural como hialinos, lisos e apresentando a região anterior mais estreita. O período de incubação de aproximadamente 48 horas. As larvas do 1º instar ápodas com a cutícula transparente, as larvas dos 2º, 3º e 4º ínstaes com coloração esbranquiçada e segmentação bem definida. O estágio larval com aproximadamente $8,04 \pm 0,17$ dias. A pré-pupa com cor branca e apêndices pigmentados. O estágio de pré-pupa de aproximadamente 24 horas, sendo o período pupal de $9,8 \pm 0,17$ dias. Relatando que até a diferenciação sexual que ocorre a partir do 14º dia de desenvolvimento, a coloração das pupas é esbranquiçada e com olhos vermelhos, sendo as pupas de fêmeas, geralmente, maiores em comprimento do que as dos machos, ocorrendo mais tarde o escurecimento do tegumento e dos olhos. O desenvolvimento pós-embrionário apresenta quatro instares larvais, sendo estes determinados pela distribuição de frequências das medidas de cápsula cefálica das fases larvais (Bittencourt e Berti Filho 2004).

Trichospilus diatraeae é um parasitoide pupal, gregário, sendo principalmente primário (Boucek 1976; Bournier 1975; Paron e Berti Filho 2000). Os imaturos de *T. diatraeae* foram caracterizados por Paron (1999) a partir da dissecação de pupas de *D. saccharalis* onde foi observado que os ovos deste parasitoide têm em média 0,2 mm de comprimento, são hialinos, sem esculturações e alongados nas extremidades. O período de incubação dura aproximadamente 24 horas. As larvas de 1 e 2 dias têm em média 0,35 mm de comprimento, apresentam cutícula transparente, tornando-se esbranquiçada no estágio seguinte, com segmentação do corpo bem definida. O estágio larval nesse hospedeiro dura de 7 a 8 dias. A pré-pupa tem em média 2,3 mm de comprimento é branca e tem cabeça, tórax e abdome bem definidos. O período de pré-pupa e pupa duram de 9 a 10 dias. A pupa recém-formada apresenta apêndices alares e olhos que são inicialmente de coloração rosácea tornando-se vermelhos. Os adultos deste inimigo natural são de coloração castanha amarelada e tem dimorfismo sexual acentuado. As fêmeas possuem a inserção das antenas na parte central da cabeça e os machos lateralmente, além disso, a forma do abdome das fêmeas é arredondada, sendo nos machos mais estreito (Paron 1999).

Tetrastichus howardi é um endoparasitoide preferencialmente de pupas, com habito gregário que parasitam uma ampla gama de hospedeiros particularmente no laboratório, e são capazes de agir como parasitoides primário ou secundário (Baitha *et al.* 2004; Lasalle e Polaszek 2007; Prasad *et al.* 2007). Os ovos deste parasitoide são pequenos em tamanho, com 0,28 e 0,30 mm de comprimento e 0,08 mm de largura, branco leitoso e levemente granulado internamente, com uma extremidade mais estreita. Uma fêmea coloca 26 ovos em cada hospedeiro esta fase dura cerca de 2 dias. A fase larval passa por três instares, as larvas de 1º instar são esbranquiçadas e medem aproximadamente 0,8 mm, de 2º instar são de cor creme com corpo ligeiramente curvado e segmentação nítida e medem entre 1,2 e 2,0 mm e as de 3º instar são semelhantes às de 2º instar na cor e formato do corpo e medem entre 2,5 e 2,9 mm, essa fase dura cerca de 5 a 6 dias. As pupas são esculpidas, de cor amarelo pálido, escurecendo com o desenvolver dos indivíduos, assim como acontece com os olhos e ocelos, passando de amarelo claro ao laranja e mais tarde para o vermelho, para finalmente tornar-se vermelho escuro pouco antes da emergência adulto, isto acontece em 8 a 9 dias, sendo este o tempo da fase de pupa. O comprimento médio do corpo das fêmeas é de 1,98 mm, os machos medem 1,53 mm podendo variar com o hospedeiro e número de indivíduos, os adultos emergem do hospedeiro entre 16 a 18 dias depois do parasitismo. Nas pupas já formadas pode se reconhecer o sexo dos parasitoides, pois os machos tem o flagelo antenal branco com o último antenômero preto e as fêmeas tem todo o flagelo antenal preto (González *et al.* 2003).

Fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e a interação com os parasitoides

Os fungos entomopatogênicos são microrganismos muito heterogêneos. Pertencem a diferentes grupos sistemáticos e possuem diferenças em sua biologia. No entanto, todos eles são patogênicos em relação aos insetos, e sua eficácia em infectar seus hospedeiros pode se tornar um fator regulador da abundância de insetos. São geralmente encontrados no solo, em cadáveres de insetos e folhas em

decomposição de florestas em todo o mundo, no entanto a diversidade em florestas temperadas destes entomopatógenos é relativamente mais baixa em comparação com florestas tropicais (Evans 1982; Grunde-Cimerman *et al.* 1998; Aung *et al.* 2008).

Em contraste com outros entomopatógenos (bactérias e vírus), que entra nos insetos através do alimento, fungos entomopatogênicos infectam seus hospedeiros através do tegumento. A infecção envolve: a aderência do esporo sobre o tegumento dos insetos, a penetração no tegumento pelo tubo de germinação, o desenvolvimento do fungo no interior do corpo do inseto e a colonização da hemocele do hospedeiro pelas hifas fúngicas. O processo de penetração do tegumento dos insetos é um resultado de uma pressão mecânica e da atividade enzimática do tubo de germinação que secreta lipases, proteases e quitinases. A morte do inseto é geralmente um resultado de danos mecânicos causados pelo crescimento do micélio dentro do inseto (mumificação) e das toxinas produzidas e disseminadas pelo patógeno. Após a morte do hospedeiro, o fungo coloniza o cadáver e durante 2 a 3 dias forma as hifas aéreas e depois ocorre a esporulação e a disseminação dos esporos no ambiente (Hajek e St. Leger 1994).

Estes entomopatógenos destacam-se por ocasionar aproximadamente 80% das doenças ocorridas em insetos e apresentarem várias vantagens em relação aos demais métodos de controle, como variabilidade genética, infecção em diferentes estágios do desenvolvimento do hospedeiro, penetração via tegumento e propágulos de alta capacidade de disseminação. Ocorrem na natureza cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies de fungos entomopatogênicos destacando-se *B. bassiana* e *M. anisopliae* que há muito tempo vem sendo estudados e aplicados para controlar insetos-praga. Para que este controle seja eficiente se faz necessário o conhecimento de todos os fatores envolvidos como: bioecologia do inseto, aspectos técnicos e fisiológicos da cultura, o ambiente onde ele vive, quais são seu inimigos naturais e como estes fatores interagem entre si (Alves 1998).

Há uma crescente demanda por inseticidas comerciais baseados em fungos entomopatogênicos uma vez que podem ser produzidos em larga escala de forma

barata e com vida útil significativas sendo também fáceis de armazenar e aplicar. A utilização mais usual do fungo é através de formulações contendo os conídios puros ou contendo conídios em óleo vegetal emulsionável, ou ainda distribuindo os grãos infestados diretamente, geralmente por avião (Borgio e Bency 2011; Kassab *et al.* 2012; Kassab *et al.* 2015).

Beauveria bassiana e *M. anisopliae* podem ser usados no controle de numerosos insetos pragas agrícolas e urbanos de diferentes ordens como: Isoptera, Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera e Diptera sendo estes insetos susceptíveis a infecção por estes entomopatógenos. Espera-se ver combinações entre agentes de controle microbiano com outras tecnologias (em combinação com semioquímicos, pesticidas químicos suaves, outros inimigos naturais, plantas resistentes, etc.) o que irá melhorar a eficácia e a sustentabilidade das estratégias de controle (Hasan 2014).

Interações entre os agentes de controle (parasitoides, predadores e entomopatógenos como vírus, bactéria e fungos) podem ocorrer, pesquisas realizadas comprovam que fungos entomopatogênicos não causam impacto sobre o desenvolvimento de parasitoides (Rossoni *et al.* 2014a, 2014b). Estes agentes de controle biológico podem agir sinergicamente ou antagonicamente. Interações sinérgicas entre patógenos e inimigos naturais aumentam a eficácia de controle, considerando que interações antagônicas a reduz (Fuentes-Contreras e Niemeyer 2000; Stolz *et al.* 2002). As interações entre hospedeiro-parasitoide-patógeno estão presentes em muitos sistemas e podem ter papel significativo sobre populações e comunidades ecológicas. Entender os resultados destas interações, os padrões de mortalidade e os agentes biológicos presentes, podem ajudar a implementar programas de controle biológico, daí a necessidade de aperfeiçoamento e seleção de patógenos específicos (Almeida *et al.* 1998; Santos Jr. *et al.* 2006a; Roy e Cottrell 2008).

Os isolados ideais de patógenos utilizados como myco-inseticidas devem ter uma estreita gama de hospedeiros, não infectando grupos benéficos de artrópodes e não apresentando riscos de desenvolver grandes epizootias em espécies não-alvo após ser liberado no ambiente. A avaliação do perigo que os

entomopatógenos podem representar para os artrópodes não-alvo é feita em diversas etapas. Primeiramente, isolados individuais são selecionados de acordo com a patogenicidade aos artrópodes não-alvo. Estes testes são feitos em laboratório e altas doses dos patógenos são expostas a potenciais hospedeiros. Se o patógeno apresentar virulência, experimentos em níveis mais elevados são realizados na tentativa de avaliar de forma mais realista os efeitos da exposição em condições de campo. Tais experimentos combinam bioensaios em semi-campo com observações de campo em grande escala (Danfa e Van Der Valk 1999).

Trabalhos de interação entre patógenos e inimigos naturais sugerem que o fungo *B. bassiana* afeta negativamente parasitoides como: *Cotesia americanus* (Lepeletier, 1825) (Hymenoptera: Braconidae) (Vázquez 2002), *Anisopteromalus calandrae* (Howard, 1881) e *Lariophagus distinguendus* (Förster, 1841) (Hymenoptera: Pteromalidae) (Hansen e Steenberg 2007), *Encarsia formosa* Gahan, 1924 (Hymenoptera: Aphelinidae) (Barrera *et al.* 2013), *Diaeretiella rapae* (McIntoch, 1855) (Hymenoptera: Braconidae) (Martins *et al.* 2014), *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov, 1912) (Hymenoptera: Eulophidae) (Santos Jr. *et al.* 2006a), *Aphidius colemani* Viereck, 1912 (Hymenoptera: Braconidae) (Emami *et al.* 2013), *Aphidius matricariae* Haliday, 1834 (Hymenoptera: Braconidae) (Rashki *et al.* 2009), *Apoanagyrus lopezi* De Santis, 1964 (Hymenoptera: Encyrtidae) e *Bracon hebetor* Say, 1857 (Hymenoptera: Braconidae) (Danfa e Van Der Valk 1999) e *Trybliographa rapae* (Westwood, 1835) (Hymenoptera: Figitidae) (Rännbäck *et al.* 2015). *M. anisopliae* afeta negativamente os parasitoides: *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov, 1912) (Hymenoptera: Eulophidae) (Santos Jr. *et al.* 2006a) e *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Broglia-Micheletti *et al.* 2006a, 2006b).

Outros trabalhos demonstram a inocuidade de *B. bassiana* a parasitoides como: *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) (Rossoni *et al.* 2014a, 2014b), *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 e *Trichogramma atopovirilia* Oatman e Platner, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Potrich *et al.* 2009a, 2009b; Polanczyk *et al.*

2009, 2010), *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov, 1912) (Hymenoptera: Eulophidae) (Santos Jr. *et al.* 2006b), *Spathius agrili* Yang, 2005 (Hymenoptera: Braconidae) e *Tetrastichus planipennisi* Yang, 2006 (Hymenoptera: Eulophidae) (Dean *et al.* 2012). Sendo *M. anisopliae* inócuo a *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) (Hayashida *et al.* 2012; Rossoni *et al.* 2014a, 2014b), *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 e *Trichogramma atopovirilia* Oatman e Platner, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Potrich *et al.* 2009a, 2009b; Polanczyk *et al.* 2009, 2010), *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov, 1912) (Hymenoptera: Eulophidae) (Santos Jr. *et al.* 2006b), *Spalangia cameroni* Perkins, 1910 (Hymenoptera: Pteromalidae) (Nielsen *et al.* 2005), *Psytalia concolor* (Szépligeti, 1910) e *Psytalia cosyrae* (Wilkinson, 1927) (Hymenoptera: Braconidae) (Ekesi *et al.* 2005) e *Phradis morionellus* (Holmgren, 1860) (Hymenoptera: Ichneumonidae) (Husberg & Hokkanen 2001).

Estudos de seletividade e efeito de fungos entomopatogênicos com parasitoides apresentam resultados bastante diversificados, devido ao fato da variação na virulência de diferentes isolados de uma mesma espécie de entomopatógeno, grandes variações nas concentrações usadas e nas condições dos experimentos, porém, para evitar ou minimizar esses efeitos negativos, torna-se necessário selecionar patógenos específicos para apenas os insetos-alvo (Goettel e Hajek 2001).

OBJETIVO GERAL

Avaliar se os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* prejudicam a sobrevivência de fêmeas adultas e o desenvolvimento de *P. elaeisis*, *T. diatraeae* e *T. howardi*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o período de sobrevivência das fêmeas adultas de *P. elaeisis*, *T. diatraeae* e *T. howardi* quando em contato com *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

Averiguar a capacidade de parasitismo e de emergência de *P. elaeisis*, *T. diatraeae* e *T. howardi* após o contato com *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

Verificar se os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* prejudicam o desenvolvimento de *P. elaeisis*, *T. diatraeae* e *T. howardi* em pupas de *D. saccharalis*.

Constatar a capacidade de parasitismo e de emergência de *P. elaeisis*, *T. diatraeae* e *T. howardi* em pupas de *D. saccharalis* em planta de cana-de-açúcar após a aplicação de *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

HIPÓTESES

1- A exposição das fêmeas de *P. elaeisis*, *T. diatraeae* e *T. howardi* aos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* afeta a longevidade desses parasitoides.

2- Os aspectos biológicos de *P. elaeisis*, *T. diatraeae* e *T. howardi* em pupas de *D. saccharalis* são comprometidos após o contato desses parasitoides com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

3- Após a aplicação de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, os parasitoides *P. elaeisis*, *T. diatraeae* e *T. howardi* parasitam as pupas de *D. saccharalis* em plantas de cana-de-açúcar.

Esta Tese está de acordo com as “Normas para Redação de Dissertações e Teses” do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal da Grande Dourados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. E. M.; ALVES, S. B.; Jr MOINO, A.; LOPES, R. B. Controle do cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* (Hagen) com iscas Termitrap impregnadas com inseticidas e associadas ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Anais da Sociedade Entomológica**, v. 27, p. 639-644, 1998.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: **Controle microbiano de insetos**. ALVES, S. B. (Ed.). Piracicaba: FEALQ, Brasil, p. 289-381, 1998.

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.

ANTIGO, M. R.; OLIVEIRA, H. N.; CARVALHO, G. A.; PEREIRA, F. F. Repelência de produtos fitossanitários usados na cana-de-açúcar e seus efeitos na emergência de *Trichogramma galloi*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, p. 910-916, 2013.

AUNG, O. M.; SOYTONG, K.; HYDE, K. D. Diversity of entomopathogenic fungi in rainforests of Chiang Mai Province, Thailand. **Fungal Diversity**, v. 30, p. 15-22, 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.

BARBOSA, R. H.; KASSAB, S.O.; PEREIRA, F.F.; ROSSONI, C.; COSTA, D.P.; BERNDT, M.B. Parasitismo e aspectos biológicos de *Tetrastichus howardi*

(Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae). **Ciência Rural**, v. 45, p. 185-188, 2015.

BARRERA, J.; CARRASCAL, J.; NUMA, S.; RODRÍGUEZ, D.; CANTOR, F. Compatibilidad de *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) con productos comerciales en condiciones de laboratorio. **Acta Biológica Colombiana**, v. 18, p. 265-270, 2013.

BARRAT, B. I. P.; HOWARTH, F. G.; WITHERS, T. M.; KEAN, J. M.; RIDLEY, G. S. Progress in risk assessment for classical biological control. **Biological Control**, v. 52, p. 245-254, 2010.

BIOSUL. **Associação dos Produtores de Bioenergia de Mato Grosso do Sul**. Produção de açúcar e álcool no Mato Grosso do Sul. Disponíveis em <http://www.biosulms.com.br/>. Acesso 13 out. 2015.

BITTENCOURT, M. A. L.; BERTI FILHO, E. Desenvolvimento dos estágios imaturos de *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera, Eulophidae) em pupas de Lepidoptera. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 48, p. 65-68, 2004.

BORGIO, J. F.; BENCY, B. J. Production and quality control of entomopathogenic fungal pathogens – a review. **Research & Reviews: A Journal of Microbiology & Virology**, v. 1, p. 5-18, 2011.

BOTELHO, P. S. M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: **Controle biológico do Brasil: parasitóides e predadores**. PARRA, J. R. P. et al. (Ed.). São Paulo: Manole, Brasil, p. 409-425, 2002.

BOTELHO, P. S. M. Quinze anos de controle biológico da *Diatraea saccharalis* utilizando parasitóides. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 254-262, 1992.

BOTELHO, P. S. M. **Tabela de vida ecológica e simulação da fase larval de *Diatraea saccharalis* (Fabricius 1794) (Lepidoptera: Pyralidae)**. Tese de Doutorado, Escola Superior “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 110 p. 1985.

BOUCEK, Z. The African and Asiatic species of *Trichospilus* and *Cotterellia* (Hymenoptera, Eulophidae). **Bulletin Entomological Research**, v. 65, p. 669-681, 1976.

BOURNIER, J. P. Sur la reproduction parthénogénétique de *Trichospilus diatraeae* Cher. Et Margab. (Hymenoptera: Chalcidoidea). **Bulletin de la Société Entomologique de France**, v. 80, p. 116-118, 1975.

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F.; SANTOS, A. J. N.; PEREIRA-BARROS, J. L. Ação de alguns produtos fitossanitários para adultos de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, p. 1051-1055, 2006a.

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F.; SANTOS, A. J. N.; PEREIRA-BARROS, J. L. Efeito de herbicida, inseticidas químico, biológico e botânico sobre *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Magistra**, v. 18, p. 21-26, 2006b.

CARVALHO, G. R.; OLIVEIRA, C. O setor sucroalcooleiro em perspectiva. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária** (Circular técnica. 10), 2006.

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

CIRELLI, K. R. N; PENTEADO-DIAS. A. M. Análise da riqueza da fauna de Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) em remanescentes naturais da Área de Proteção Ambiental (APA) de Descalvado, SP. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, p. 89-98, 2003.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Levantamento de safra: apresenta dados sobre projeção e consumo da cana-de-açúcar. Disponíveis em <http://www.conab.gov.br>. Acesso 13 out. 2015.

CORRÊA, P. M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 1, Cap. 13, 1926.

CORRÊA, M. A. **Sinopse histórica do açúcar em São Paulo**. Rio de Janeiro: IAA, p. 153-163, 1935.

DANFA, A.; VAN DER VALK, H. C. H. G. Laboratory Testing of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* on Sahelian Non-target Arthropods. **Biocontrol Science and Technology**, v. 9, p. 187-198, 1999.

DEAN, K. M.; VANDENBERG, J. D.; GRIGGS, M. H.; BAUER, L. S.; FIERKE, M. K. Susceptibility of two hymenopteran parasitoids of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, p. 303-306, 2012.

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

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V.; PERECIN, D. Variabilidade espacial de populações de *Diatraea saccharalis* em canaviais e sugestão de método de amostragem. **Bragantia**, v. 70, p. 577-585, 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.

DOSSI, F. C. A.; CONTE, H.; ZACARO, A. A. Histochemical characterization of the embryonic stages in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Entomological Society of America**, v. 99, p. 1206-1212, 2006.

EKESI, S.; MANIANIA, N. K.; MOHAMED, S. A.; LUX, S. A. Effect of soil application of different formulations of *Metarhizium anisopliae* on African tephritid fruit flies and their associated endoparasitoids. **Biological Control**, v. 35, p. 83-91, 2005.

EMAMI, F.; ALICHI, M.; MINAEI, K. Interaction between the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) and the parasitoid wasp, *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Entomological and Acarological Research**, v. 45, p. 14-17, 2013.

EVANS, H. C. Entomogenous fungi in tropical forest ecosystems: an appraisal. **Ecological Entomology**, v. 7, p. 47-60, 1982.

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

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

FELIX, J.; GONZÁLEZ, A.; OCA, F. N. M. de.; 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.

FUENTES-CONTRERAS, E.; NIEMEYER, H. M. Effect of wheat resistance, the parasitoid *Aphidius rhopalosiphii*, and the entomopathogenic fungus *Pandora neoaphidis*, on population dynamics of the cereal aphid *Sitobion avenae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 97, p. 109-114, 2000.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, Brasil, 920 p. 2002.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D. **Manual de Entomologia Agrícola**. São Paulo: Ceres, Brasil, 649 p. 1988.

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

GLAESER, D. F.; PEREIRA, F. F.; VARGAS, E. L.; CALADO, V. R. F.; FAVERO, K. Reprodução de *Trichospilus diatraeae* em *Diatraea saccharalis* após três gerações em *Tenebrio molitor*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, p. 213-218, 2014.

GOETTEL, M. S.; HAJEK, A. E. Evaluation of non-target effects of pathogens used for management of arthropods. In: **Evaluating indirect ecological effects of biological control**. WAJNBERG, E. *et al.* (Ed.). New York: CAB, United States of America, p. 81-97, 2001.

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, 2003.

GRUNDE-CIMERMAN, N.; ZALAR, P.; JERM, S. Mycoflora of cave cricket *Trogophilus neglectus* cadavers. **Mycopathologia**, v. 144, p. 111-114, 1998.

HAJEK, A. E.; ST. LEGER, R. J. Interactions between fungal pathogens and insect host. **Annual Review of Entomology**, v. 39, p. 293-322, 1994.

HANSSON, C. Eulophidae of Costa Rica, 2. **Memoirs of the American Entomological Institute**, Gainesville, v. 75, p. 537, 2004.

HANSEN, L. S.; STEENBERG, T. Combining larval parasitoids and an entomopathogenic fungus for biological control of *Sitophilus granaries* (Coleoptera: Curculionidae) in stored grain. **Biological Control**, v. 40, p. 237-242, 2007.

HASAN, S. Entomopathogenic Fungi as Potent Agents of Biological Control. **International Journal of Engineering and Technical Research**, v. 2, p. 234-237, 2014.

HAYASHIDA, E. K.; KASSAB, S. O.; FONSECA, P. R. B.; ROSSONI, C.; LOUREIRO, E. S.; AMORIM, L. G. Efeito dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) sobre parasitoide *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae). **Nucleus**, v. 9, p. 1-6, 2012.

HAYASHIDA, E. K.; KASSAB, S. O.; LOUREIRO, E. S.; ROSSONI, C.; BARBOSA, R. H.; SILVA, A. S.; COSTA, D. P. Isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) para Controle de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae). **EntomoBrasilis**, v. 7, p. 20-23, 2014.

HUSBERG, G. B.; HOKKANEN, H. M. T. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the pollen beetle *Meligethes aeneus* and its parasitoids *Phradis morionellus* and *Diospilus capito*. **BioControl**, v. 46, p. 261–273, 2001.

KASSAB, S. O.; LOUREIRO, E. S.; BARBOSA, R. H.; FONSECA, P. R. B.; MOTA, T. A.; ROSSONI, C. Alteração no método de amostragem de *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hem.: Cercopidae) e avaliação da eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 (Hyp.: Clavicipitaceae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, p. 621-625, 2012.

KASSAB, S. O.; LOUREIRO, E. S.; ROSSONI, C.; PEREIRA, F. F.; MOTA, T. A.; BARBOSA, R. H.; COSTA, D. P. Control of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) with entomopathogenic fungus and insecticides using two sampling methods on sugarcane fields. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, p. 803-810, 2015.

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.

KURTTI, T. J.; KEYHANI, N. O. Intracellular infection of tick cell lines by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology**, v. 154, p. 1700-1709, 2008.

LASALLE, J. North American genera of Tetrastichinae (Hymenoptera: Eulophidae). **Journal of Natural History**, v. 28, p. 109-236, 1994.

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

LOUREIRO, E. S.; BATISTA FILHO A.; ALMEIDA, J. E. M.; PESSOA, L. G. A. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok. contra a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 791-798, 2005.

MACEDO, N.; BOTELHO, P. S. M. Controle integrado da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Pyralidae). **Brasil Açucareiro**, v. 160, p. 2-14, 1988.

MARTINS, I. C. F.; SILVA, R. J.; ALENCAR, J. R. D. C. C.; SILVA, K. P.; CIVIDANES, F. J.; DUARTE, R. T.; AGOSTINI, L. T.; POLANCZYK, R. A. Interactions Between the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) and the Aphid Parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Braconidae) on *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). **Journal of Economic Entomology**, v. 107, p. 933-938, 2014.

MÉLO, A. B. P.; PARRA, J. R. P. Exigências térmicas e estimativa do número de gerações anuais da broca da cana-de-açúcar em quatro localidades canavieiras de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 23, p. 691-696, 1988.

MENDONÇA, A. F. **Cigarrinhas da cana-de-açúcar: Controle biológico**. Maceió: Insecta, Brasil, 317 p. 2005.

MUNRO, J. B.; HERATY, J. M.; BURKS, R. A.; HAWKS, D.; MOTTERN, J.; CRUAUD, A.; RASPLUS, J. Y.; JANSTA, P. A. Molecular Phylogeny of the Chalcidoidea (Hymenoptera). **PLoS One**, v. 6, p. e27023, 2011.

NIELSEN, C.; SKOVGÅRD, H.; STEENBERG, T. Effect of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on Survival and Reproduction of the Filth Fly Parasitoid, *Spalangia cameroni* (Hymenoptera: Pteromalidae). **Environmental Entomology**, v. 34, p. 133-139, 2005.

NOYES, J. S. **Universal Chalcidoidea Database**. 2003 [online]. Disponíveis em <http://www.nhm.ac.uk/chalcidoids>. Acesso 26 de out. de 2015.

OLIVEIRA, M. A. P. DE; MARQUES, E. J.; TEIXEIRA, V. W.; BARROS, R. Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). **Acta Scientiarum: Agronomy**, v. 30, p. 220-224, 2008.

OLIVEIRA, H. N.; ANTIGO, M. R.; CARVALHO, G. A.; GLAESER, D. F. Seletividade de herbicidas e reguladores de crescimento de plantas utilizados na cultura da cana-de-açúcar para imaturos de *Trichogramma galloi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Planta Daninha (Impresso)**, v. 32, p. 125-135, 2014.

PARON, M. R. **Bioecologia de *Trichospilus diatraeae* Cherian & Maragabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae), endoparasitóide de Lepidoptera**. Tese Doutorado, Escola Superior “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 53 p. 1999.

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

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, Brasil, 609 p. 2002.

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

PEREIRA, F. F.; ZANUNCIO, J. C.; TAVARES, M. T.; PASTORI, P. L.; JACQUES, G. C. Record of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) as parasitoid of the eucalyptus defoliator *Thyrintea arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) in Brazil. **Phytoparasitica**, v. 36, p. 304-306, 2008a.

PEREIRA, F. F.; ZANUNCIO, T. V.; ZANUNCIO, J. C.; PRATISSOLI, D.; TAVARES, M. T. Species of Lepidoptera Defoliators of Eucalyptus as New Host for the Parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 259-262, 2008b.

PEREIRA, F. F.; ZANUNCIO, J. C.; OLIVEIRA, H. N.; GRANCE, E. 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.

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

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.

PEREIRA, F. F.; KASSAB, S. O.; CALADO, V. R. F.; VARGAS, E. L.; OLIVEIRA, H. N.; ZANUNCIO, J. C. Parasitism and emergence of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) on *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae, pupae and adults. **Florida Entomologist**, v. 98, p. 377-380, 2015.

PINTO, A. S.; CANO, M. A. V.; SANTOS, E. M. A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* In: **Controle de pragas da cana-de-açúcar**. PINTO, A. S. (Ed.). Sertãozinho: Biocontrol, Brasil, p. 15-20, 2006.

POLANCZYK, R. A.; GRECCO, E. D.; ANDRADE, G. S.; CELESTINO, F. N.; BARBOSA, W. F.; FRANCO, C. R.; PRATISSOLI, D. Desempenho de *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) tratados com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, p. 495-499, 2009.

POLANCZYK, R. A.; PRATISSOLI, D.; DALVI, L. P.; GRECCO, E. D.; FRANCO, C. R. Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin nos parâmetros biológicos de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 1412-1416, 2010.

POTRICH, M.; ALVES, L. F. A.; HAAS, J., DA SILVA; E. R. L., DAROS, A.; PIETROWSKI, V.; NEVES, P. M. O. J. Seletividade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* a *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 822-826, 2009a.

POTRICH, M.; CAPPELLARI, C.; COSTA, J. H. B.; ROMAN, J. C.; BONINI, A. K.; SILVA, E. R. L. Ação de Fungos Entomopatogênicos sobre o Parasitismo de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, p. 1995-1998, 2009b.

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.

RÄNNBÄCK, L. M.; COTES, B.; ANDERSON, P.; RÄMERT, B.; MEYLING, N. V. Mortality risk from entomopathogenic fungi affects oviposition behavior in the parasitoid wasp *Trybliographa rapae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 124, p. 78-86, 2015.

RASHKI, M.; KHARAZI-PAKDEL, A.; ALLAHYARI, H.; VAN ALPHEN, J. J. M. Interactions among the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales), the parasitoid, *Aphidius matricariae* (Hymenoptera: Braconidae), and its host, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). **Biological Control**, v. 50, p. 324-328, 2009.

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

ROSSATO, J. A. S.; COSTA, G. H. G.; MADALENO, L. L.; MUTTON, M. J. R.; HIGLEY, L. G.; FERNANDES, A. Characterization and impact of the sugarcane borer on sugarcane yield and quality. **Agronomy Journal**, v. 105, p. 643-648, 2013.

ROSSETO, R. A cana-de-açúcar e a questão Ambiental. In: **Cana-de-açúcar**. DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de; ANDRADE LANDELL, M. G. de. (Ed.). Campinas: Instituto Agronômico, Brasil, p. 869-883, 2008.

ROSSONI, C.; KASSAB, S. O.; LOUREIRO, E. S.; PEREIRA, F. F.; COSTA, D. P.; BARBOSA, R. H.; ZANUNCIO, J. C. *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) are compatible with *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Florida Entomologist**, v. 97, p. 1794-1804, 2014a.

ROSSONI, C.; LOUREIRO, E. S.; PEREIRA, F. F.; KASSAB, S. O.; COSTA, D. P.; BARBOSA, R. H. Selectivity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) on Adults of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Folia Biologica (Kraków)**, v. 62, p. 269-275, 2014b.

ROY, H. E.; COTTRELL, E. Forgotten natural enemies: Interactions between coccinellids and insect-parasitic fungi. **European Journal of Entomology**, v. 105, p. 391-398, 2008.

SANDOVAL, S. S.; SENÔ, K. C. A. Comportamento e controle da *Diatraea saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar. **Nucleus**, v. 7, p. 243-258, 2010.

SANTOS JR., H. J. G.; MARQUES, E. J.; BARROS, R.; GONDIM JR., M. G. C. Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e o Parasitóide *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae) sobre Larvas da Traça-das-Crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, p. 241-245, 2006a.

SANTOS JR., H. J. G.; MARQUES E. J.; BARROS R.; GONDIM JR. M. G. C.; ZAGO H. B.; SILVA C. C. M. Efeito de *Metarhizium anisopliae* (Metsch. Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Sobre adultos de *Oomyzus sokolowskii*

(Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, p. 241-245, 2006b.

SCHAUFF, M. E.; LASALLE, J. L.; COOTE, L. D. Eulophidae. *In: Annotated Key to genera of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera)*. GIBSON, G. A. P.; HUBER, J. T.; WOOLEY, J. B.(Ed.). Ottawa: NCR Research, Canadá, p. 327-429, 1997.

SILVA, I. M.; ZANUNCIO, T. V.; PEREIRA, F. F.; WILCKEN, C. F.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. Reproduction of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) in the Pupae of *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae) of Various Ages. **Florida Entomologist**, v. 98, p. 1025-1029, 2015.

SILVA-TORRES, C. S. A. da.; 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.; LETÍCIA, R. G.; BENTO, J. M. S.; SOLTER, L. F.; DELALIBERA JR., 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.

STOLZ, I.; NAGEL, P.; LOMER, C.; PEVELING, R. Susceptibility of the hymenopteran parasitoids *Apoanagyrus* (=Epidinocarsis) *lopezi* (Encyrtidae) and *Phanerotoma* sp. (Braconidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Biocontrol Science and Technology**, v. 12, p. 349-360, 2002.

SMEETS, E.; JUNGINGER, M.; FAAIJ, A.; WALTER, A.; DOLZAN, P.; TURKENBURG, W. The sustainability of brazilian ethanol – An assesment of the possibilities of certified production. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 781-813, 2008.

TAVARES, W. S.; HANSSON, C.; MIELKE, O. H. H.; SERRAO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. Parasitism of *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle, 1993 on pupae of *Methona themisto* (Hübner, [1818]) reared on two hosts (Lepidoptera: Nymphalidae; Hymenoptera: Eulophidae). **SHILAP Revista de lepidopterología**, v. 41, p. 43-48, 2013.

TÉRAN, F. O.; PRECETTI, A. A. C. M.; DERNEIKA, O. Broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*. In: **Reunião técnica agrônômica: pragas da cana-de açúcar**, 1, **Anais**. Piracicaba: Copersucar, Brasil, p. 4-15, 1983.

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. 135-138, 2011.

VÁZQUEZ L. L. Efecto de *Verticillium lecanii* y *Beauveria bassiana* sobre *Cotesia americanus* (Lepeletier) (Hymenoptera: Braconidae), parasitoide de larvas de la primavera de la yuca (*Erinnyis ello* L.) **Fitosanidad**, v. 6, p. 24-27, 2002.

WENZEL, I. M.; GIOMETTI, F. H. C.; ALMEIDA, J. E. M. Patogenicidade do isolado IBCB 66 de *Beauveria bassiana* à broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* em condições de laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, p. 259-261, 2006.

ZACHÉ, B.; WILCKEN, C. F.; DA COSTA, R. R.; SOLIMAN, E. P. *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae), a new parasitoid of *Melanolophia consimilaria* (Lepidoptera: Geometridae). **Phytoparasitica**, v. 38, p. 355–357, 2010.

ZACHÉ, B.; ZACHÉ, R. R. C.; SOLIMAN, E. P.; WILCKEN, C. F. Evaluation of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) as parasitoid of the eucalyptus

defoliator *Euselasia eucerus* (Lep.: Riodinidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 20, p. 1-5, 2011a.

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

ZACHÉ, B.; ZACHÉ, R. R. C.; WILCKEN, C. F. Evaluation of *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) as Parasitoid of the *Sarsina violascens* Herrich-Schaeffer (Lepidoptera: Lymantriidae). **Journal of Plant Studies**, v. 1, p. 85-89, 2012a.

ZACHÉ, B.; WILCKEN, C. F.; ZACHÉ, R. R. C.; SOUZA, N. M. New occurrence of *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae) as a parasitoid of *Spodoptera cosmioides* Walker, 1858 (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Biota Neotropical**, v. 12, p. 319-322, 2012b.

ZACHÉ, B.; ZACHÉ, R. R. C.; WILCKEN, C. F. Reproduction of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing pupae of *Eupseudosoma involuta* (Lepidoptera: Arctiidae) a lepidopteran defoliator in Brazil. **Revista Chilena de Historia Natural**, v. 86, p. 221-224, 2013.

ZANUNCIO, J. C.; PEREIRA, F. F.; JACQUES, G. C.; TAVARES, M. T.; SERRÃO, J. E. *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae), a new alternative host to rear the pupae parasitoid *Palmistichus elaeisis* Delvare & Lasalle (Hymenoptera: Eulophidae). **The Coleopterists Bulletin**, v. 62, p. 64-66, 2008.

CAPÍTULO I

EFEITO DE *Beauveria bassiana* (CORDYCIPITACEAE) E *Metarhizium anisopliae* (CLAVICIPITACEAE) SOBRE PARASITOIDES EULOFÍDEOS (HYMENOPTERA)

**Efeito de *Beauveria bassiana* (Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae*
(Clavicipitaceae) sobre parasitoides eulofídeos (Hymenoptera)***

C. Rossoni¹, F.F. Pereira, S.O. Kassab, A. Rodrigues, E.S. Loureiro, J.C.

Zanuncio

C. Rossoni¹, F.F. Pereira, A. Rodrigues, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, 79.804-970, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

S.O. Kassab, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, 79.804-970, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

E.S. Loureiro, Campus de Chapadão do Sul, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79.560-000, Chapadão do Sul, Mato Grosso do Sul, Brasil.

J.C. Zanuncio, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

¹Autor de correspondência (e-mail: camilasrossoni@gmail.com).

* Este artigo está nas normas do periódico “The Canadian Entomologist”

1 **Resumo**

2 Os fungos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Cordycipitaceae) e
3 *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Clavicipitaceae) são usados
4 como agentes biológicos e podem afetar *Palmistichus elaeisis* Delvare e LaSalle,
5 *Tetrastichus howardi* (Olliff) e *Trichospilus diatraeae* Cherian e Margabandhu
6 (Hymenoptera: Eulophidae). O objetivo deste trabalho foi avaliar a interação
7 desses agentes de controle biológico. No primeiro experimento, fêmeas de cada
8 espécie de parasitoide foram individualizadas em tubos de vidro, contendo uma
9 superfície de contato de papel filtro tratada com os entomopatógenos nas
10 concentrações de 1×10^9 con. mL⁻¹, 5×10^9 con. mL⁻¹ e 10×10^9 con. mL⁻¹, sendo
11 posteriormente avaliadas as mortalidades diária e confirmada. No segundo
12 experimento, fêmeas das diferentes espécies de eulofídeos com 24 horas de
13 emergência foram expostas as mesmas concentrações dos bioinseticidas por 48
14 horas. Após a exposição, cinco fêmeas dos parasitoides de cada tratamento, foram
15 individualizadas em tubos de ensaio juntamente com uma pupa de *Diatraea*
16 *saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) com 24 horas e o parasitismo
17 foi permitido por mais 24 horas, sendo então avaliado o parasitismo e a
18 emergência. Os fungos entomopatogênicos reduziram a longevidade de fêmeas de
19 *P. elaeisis* e *T. diatraeae* com maior mortalidade para a espécie *T. howardi*. No
20 entanto, este fato não influenciou o parasitismo e a emergência de *P. elaeisis*, *T.*
21 *howardi* e *T. diatraeae* em pupas de *D. saccharalis*.

22

23

Introdução

Parasitoides são importantes inimigos naturais para manter o equilíbrio das populações de insetos-praga em agroecossistemas (Pennacchio e Strand 2006). No Brasil, levantamentos faunísticos de famílias de himenópteros parasitoides ocorreram em diferentes sistemas agrícolas e em áreas protegidas (Pádua *et al.* 2014). A família Eulophidae apresenta 4.472 espécies descritas em todo o mundo (Noyes 2003) e algumas espécies desses himenópteros podem ser utilizados em programas de controle biológico (Pereira *et al.* 2010).

Palmistichus elaeisis Delvare e LaSalle e *Trichospilus diatraeae* Cherian e Margabandhu (Hymenoptera: Eulophidae) parasitam e se desenvolvem em insetos das famílias Riordinidae (Delvare e Lasalle 1993; Zaché *et al.* 2011a), Geometridae (Pereira *et al.* 2008a; Zaché *et al.* 2010; Pereira *et al.* 2011; Pastori *et al.* 2012), Noctuidae (Bittencourt e Berti-Filho 2004; Andrade *et al.* 2010), Arctiidae (Delvare e Lasalle 1993; Zaché *et al.* 2013), Saturniidae (Pereira *et al.* 2008b; Pastori *et al.* 2012), Lymantriidae (Zaché *et al.* 2011b; Zaché *et al.* 2012a), Nymphalidae (Bouček 1976; Zaché *et al.* 2012b; Tavares *et al.* 2013) e Tenebrionidae (Zanuncio *et al.* 2008; Favero *et al.* 2013).

Tetrastichus howardi (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae) foi registrado se desenvolvendo em insetos das famílias Plutellidae, Noctuidae, Pyralidae (La Salle e Polaszek 2007) e Sphingidae (Barbosa *et al.* 2015). Além disso, esses eulofídeos parasitam e se desenvolvem em pupas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae), que os caracterizam como importantes agentes de

47 controle biológico da broca da cana-de-açúcar (González *et al.* 2003; Chichera *et*
48 *al.* 2012; Glaeser *et al.* 2014; Pereira *et al.* 2015).

49 *Diatraea saccharalis* é uma das principais pragas da cana-de-açúcar das
50 Américas e do Brasil, ocorrendo em todos os estágios fenológicos dessa cultura
51 (Pereira *et al.* 2015). As injúrias diretas causadas por *D. saccharalis* se devem às
52 galerias abertas no interior dos colmos da cana-de-açúcar, o que pode reduzir a
53 produtividade das plantas (Pinto *et al.* 2009; Dinardo-Miranda *et al.* 2012).

54 Assim, a utilização de parasitoides é importante para o manejo de *D.*
55 *saccharalis* e o uso de fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Balsamo)
56 Vuillemin (Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin
57 (Clavicipitaceae) pode aumentar a eficiência de controle da broca e,
58 consequentemente, reduzir as infestações dessa praga em plantios de cana-de-
59 açúcar (Wenzel *et al.* 2006; Oliveira *et al.* 2008; Zappelini *et al.* 2010). Além
60 desse último fungo ser amplamente utilizado para controle da cigarrinha das
61 raízes *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) (Kassab *et al.*
62 2015). Estes agentes podem infectar diferentes fases de desenvolvimento dos
63 hospedeiros, como ovos, larvas, pupas e adultos, sendo que a maioria possui um
64 mecanismo de penetração especializado via tegumento, característica vantajosa
65 quando comparados com outros grupos de patógenos que infectam o inseto apenas
66 via oral (Hajek e St. Leger 1994).

67 Dessa forma, estudos relacionados à interação dos agentes de controle
68 como fungos e parasitoides precisam ser realizados para esclarecer a coexistência
69 de ambos no mesmo ambiente, definindo a forma de suas interações, sejam elas

70 sinérgicas ou não (Alves 1998; Santos Jr. *et al.* 2006; Rossoni *et al.* 2014a,
71 2014b). O sucesso do método de controle biológico depende do entendimento
72 mais abrangente possível sobre os organismos envolvidos, tanto pragas como
73 inimigos naturais. Este fato nos motivou a investigar se produtos a base dos
74 fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e de *M. anisopliae* podem causar efeitos
75 negativos sobre a biologia de *P. elaeisis*, *T. diatraeae* e *T. howardi*, parasitoides
76 de *D. saccharalis*.

77 **Materiais e métodos**

78
79 O experimento foi conduzido nos laboratórios de Controle Biológico de
80 insetos (LECOBIOL) e de Microbiologia da Universidade Federal da Grande
81 Dourados (UFGD) em Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

82
83 Produtos comerciais de *B. bassiana* e *M. anisopliae*

84 Os bioinseticidas usados no experimento foram Ballvéria WP[®] (isolado de
85 *B. bassiana* - IBCB 66) e Metiê WP[®] (isolado de *M. anisopliae* - IBCB 425),
86 ambos, fornecidas pela empresa Ballagro Agro Tecnologia Ltda, sendo que os
87 dois obtiveram mais de 95% de viabilidade dos esporos.

88
89 Criação do hospedeiro *D. saccharalis*

90 Ovos de *D. saccharalis* foram retirados da criação do LECOBIOL da
91 UFGD e acondicionados em frascos de vidro (8,5 cm de diâmetro × 13 cm de
92 altura), contendo dieta artificial (ANEXO 1) para alimentação das lagartas recém

93 eclodidas, onde elas permaneceram até o último instar. Essas lagartas foram
94 transferidas para gerbox (6,5 cm de diâmetro × 2,5 cm de altura) com dieta de
95 realimentação (ANEXO 2) até a formação das pupas. As pupas foram recolhidas
96 dos gerbox e colocadas em potes plásticos transparentes (retangular de 500 ml e
97 14,2 × 9,8 × 4,7 cm) onde permaneceram até a fase adulta. Os adultos foram
98 sexados e 50 adultos (30 fêmeas e 20 machos) foram colocados em gaiolas de
99 tubos de PVC (10 cm de diâmetro × 22 de altura), revestidos internamente com
100 folhas de papel sulfite, utilizado como substrato para oviposição dos ovos. Estes
101 tubos foram fechados com folha de papel sulfite e elástico. Os ovos foram
102 coletados diariamente, lavados com solução de sulfato de cobre a 1% e
103 armazenados em sala climatizada à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa
104 (UR) de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. Os procedimentos utilizados na criação
105 de *D. saccharalis* estão de acordo com a metodologia proposta por Parra (2007)
106 (ANEXO 3).

107

108 Criação dos eulofídeos *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae*

109 Populações de *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* foram mantidas
110 separadamente em tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro × 8,5 cm de altura) vedados
111 com algodão e alimentados com gotículas de mel puro. Para manutenção da
112 criação destes parasitoides, pupas de *D. saccharalis* com 24-48 horas de idade
113 foram expostas as fêmeas dos parasitoides. As pupas parasitadas (tanto do
114 hospedeiro natural quanto do hospedeiro alternativo) foram individualizadas em
115 tubos de vidro e mantidas em câmara climatizada a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de

116 umidade relativa e fotofase de 14 horas, até a emergência de adultos (Vargas *et al.*
117 2011; Chichera *et al.* 2012) (ANEXO 3).

118

119 Desenvolvimento experimental

120 Experimento I. Efeito de bioinseticidas à base de *B. bassiana* e *M. anisopliae*
121 sobre adultos dos parasitoides *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae*

122 Neste experimento foi quantificada a mortalidade de fêmeas das três
123 espécies de eulofídeos expostas a diferentes doses de *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

124 Para isto, fêmeas dos parasitoides recém-emergidas de pupas de *D. saccharalis*
125 foram expostas às formulações dos fungos. Os tratamentos utilizados no

126 experimento foram compostos pela 1) Testemunha (não tratada), 2) Metiê® - 1×10^9
127 con. mL⁻¹, 3) Metiê® - 5×10^9 con. mL⁻¹, 4) Metiê® - 10×10^9 con. mL⁻¹, 5)

128 Ballvéria® - 1×10^9 con. mL⁻¹, 6) Ballvéria® - 5×10^9 con. mL⁻¹ e 7) Ballvéria® -
129 10×10^9 con. mL⁻¹. O ensaio experimental foi composto por delineamento

130 inteiramente casualizado com 7 tratamentos e 5 repetições cada uma composta por
131 10 fêmeas dos parasitoides de cada espécie, totalizando 50 insetos por tratamento.

132 As fêmeas foram colocadas em tubos de vidro de fundo chato (2,5 cm × 8,5 cm
133 capacidade de 27 mL) contendo uma gota de mel para a alimentação, das mesmas.

134 Além disso, quadrados de papel filtro (3 cm de largura × 3 cm de comprimento)

135 foram tratados com 1 mL de suspensão fúngica dos produtos, utilizando uma
136 micropipeta, após secarem foram inseridos no interior dos tubos de vidro para que

137 os parasitoides entrassem em contato com o patógeno (Rossoni *et al.* 2014a,
138 2014b). Em seguida, os tubos contendo os parasitoides de cada tratamento e a

139 testemunha foram acondicionados em câmara climatizada tipo BOD a $25 \pm 2^\circ\text{C}$,
140 14 h de fotofase e $70 \pm 10\%$ umidade relativa.

141 A ação dos bioinseticidas foi avaliada diariamente observando-se a
142 mortalidade dos insetos. Cada inseto após a morte foi transferido para microtubos
143 tipo Eppendorf com algodão hidrófilo umedecido com água destilada esterilizada.
144 Os microtubos foram mantidos em câmaras climatizadas (BOD) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com
145 fotofase de 14 horas e $70 \pm 10\%$ de UR, para verificação do crescimento do
146 entomopatógeno e confirmação da mortalidade do inseto ocasionada pelo mesmo.

147 As mortalidades diária e confirmada dos parasitoides (ocasionada pela
148 colonização dos fungos no inseto) foram avaliadas e os dados da mortalidade total
149 (mortalidade diária e confirmada) submetido à análise estatística.

150

151 Experimento II. A exposição de fêmeas de *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* a
152 bioinseticidas compromete o parasitismo e a emergência desses parasitoides?

153 Neste experimento foi verificado o parasitismo e a emergência da progênie
154 de fêmeas das três espécies de eulofídeos após exposição às diferentes doses de *B.*
155 *bassiana* e *M. anisopliae*. Para isto, fêmeas com 24 horas de emergência de *P.*
156 *elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* foram expostas as concentrações de 1×10^9
157 con. mL^{-1} , 5×10^9 con. mL^{-1} , 10×10^9 con. mL^{-1} dos produtos comerciais Metiê® e
158 Ballvéria® por 48 horas. A exposição das fêmeas parasitoides aos produtos foi
159 feita por meio de uma superfície de papel filtro (3 cm de largura $\times$ 3 cm de
160 comprimento) tratada com 1 mL de suspensão fúngica de cada produto, utilizando
161 uma micropipeta, essas superfícies após secarem foram inseridas em um tubo de

ensaio de fundo chato (2,5 cm × 8,5 cm capacidade de 27 mL) contendo uma gotícula de mel para alimentação dos parasitoides e tampado com algodão hidrófilo (Rossoni *et al.* 2014a, 2014b). Os tratamentos foram armazenados em câmara climatizada tipo BOD a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 14 h de fotofase e $70 \pm 10\%$ umidade relativa. O ensaio experimental foi composto por delineamento inteiramente casualizado com 7 tratamentos e 5 repetições cada uma composta por 10 fêmeas dos parasitoides sendo cada espécie individualmente, totalizando 50 insetos por tratamento.

Após o período de 48 horas, cinco fêmeas de cada repetição dos diferentes tratamentos, foram individualizadas em tubos de ensaio, juntamente com uma pupa de *D. saccharalis* de 24 horas e o parasitismo foi permitido por 24 horas. Posteriormente, essas fêmeas foram mortas e as pupas armazenadas até a emergência dos adultos em câmara climatizada tipo BOD a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 14 h de fotofase e $70 \pm 10\%$ umidade relativa até a emergência dos parasitoides adultos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 7 tratamentos e 25 repetições, cada uma composta por 1 pupa parasitada por cada espécie de parasitoide separadamente.

A porcentagem de parasitismo em pupas de *D. saccharalis* por fêmeas expostas aos tratamentos e a porcentagem de emergência dos parasitoides nas pupas parasitadas foram avaliadas.

182

183

184

185 Análise estatística

186 Para se avaliar os dados do experimento I foi utilizada a comparação das
187 médias dos valores de mortalidade total pelo teste de Tukey a 5% de
188 probabilidade, essa avaliação foi feita separadamente para cada espécie de
189 parasitoide expostas as diferentes concentrações dos fungos entomopatogênicos.
190 Não foi feita a interação entre os valores de mortalidade total obtidos com as três
191 espécies de eulofídeos expostas às duas espécies de fungos entomopatogênicos
192 nas diferentes concentrações, pois ocorrem diferenças nos aspectos biológicos,
193 desses indivíduos, o que poderia gerar erro na forma de interpretação dos dados.

194 Da mesma forma, para fazer a análise das médias dos valores de
195 porcentagem de parasitismo e emergência do experimento II foi utilizado o teste
196 de Tukey a 5% de probabilidade, não foi realizada a transformação dos dados e
197 cada análise foi feita, separadamente, para as diferentes espécies de parasitoides e
198 fungos entomopatogênicos, evitando possíveis erros que seriam cometidos na
199 interpretação dos dados.

200

201 **Resultados**

202

203 Experimento I. Efeito de bioinseticidas à base de *B. bassiana* e *M. anisopliae*
204 sobre adultos dos parasitoides *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae*

205 A mortalidade acumulada das fêmeas de *P. elaeisis* expostas a diferentes
206 concentrações do fungo *M. anisopliae* não diferiu da testemunha com 24, 48, 72,
207 96 e 120 horas após exposição (HAE). A concentração de 1×10^9 con. mL⁻¹

208 obteve o menor valor de mortalidade acumulada após 144, 168, 192 e 216 HAE,
209 não diferindo estatisticamente dos valores de mortalidade das outras duas
210 concentrações. Nos períodos de exposição, ou seja, 240, 264, 288 e 312 HAE não
211 houve diferenças estatísticas entre os tratamentos (Tabela 1).

212 As concentrações do fungo entomopatogênico *B. bassiana* não causaram
213 mortalidade nas fêmeas de *P. elaeisis* às 24, 48, 72, 96 e 120 HAE. Além disso, a
214 mortalidade acumulada para a concentração de 10×10^9 con. mL⁻¹, nos períodos
215 de 144, 168, 192 e 216, obteve o menor valor e foi semelhante às outras duas
216 concentrações do fungo. A mortalidade acumulada 240, 264, 288 e 312 HAE
217 foram semelhantes entre os tratamentos (Tabela 1).

218 A exposição de fêmeas de *T. howardi* as concentrações de 1×10^9 con.
219 mL⁻¹, 5×10^9 con. mL⁻¹, 10×10^9 con. mL⁻¹ de *M. anisopliae* não influenciou a
220 mortalidade acumulada nos períodos de 24, 48, 72 e 96 HAE. A menor
221 mortalidade acumulada foi constatada na concentração de 10×10^9 con. mL⁻¹ às
222 120, 144 e 168 HAE. Estes valores foram diferentes estatisticamente da
223 testemunha e semelhante a de mortalidade das outras duas concentrações, com
224 exceção do período de 120 HAE. Após o período de 192 horas de exposição ao
225 patógeno, somente as fêmeas de *T. howardi* da testemunha sobreviveram,
226 persistindo até 312 HAE (Tabela 2).

227 Os períodos de 24, 48, 72, 96 e 120 HAE das fêmeas de *T. howardi* ao
228 fungo entomopatogênico *B. bassiana* não influenciaram na mortalidade desse
229 parasitoide. Foi obtido após 144 HAE, na concentração de 5×10^9 con. mL⁻¹, o
230 menor valor de mortalidade acumulada de fêmeas dos parasitoides (48%)

diferindo estatisticamente da testemunha. A mortalidade acumulada em 168, 192, 216 e 240 HAE foi menor no tratamento 10×10^9 con. mL⁻¹, porém os valores não diferiram estatisticamente das outras concentrações. Após o período de 264 horas de exposição ao patógeno, somente as fêmeas de *T. howardi* da testemunha sobreviveram, persistindo até 312 horas (Tabela 2).

Não houve mortalidade acumulada de fêmeas de *T. diatraeae* quando em contato com *M. anisopliae* a 24, 48 e 72 HAE. A concentração de 10×10^9 con. mL⁻¹ obteve a menor mortalidade acumulada 96 e 120 HAE diferindo estatisticamente dos valores de mortalidade das outras duas concentrações. Nos demais períodos de exposição aos 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288 e 312 HAE, não ocorreram diferenças estatísticas entre os valores de mortalidade acumulada de fêmeas de *T. diatraeae* (Tabela 3).

O contato de fêmeas de *T. diatraeae* com diferentes concentrações de *B. bassiana* não influenciou na mortalidade desse parasitoide até 96 HAE. Após 120, 144 e 168 horas de exposição ao patógeno os valores de mortalidade acumulada foram menores na concentração de 5×10^9 con. mL⁻¹, sendo que a 120 e 168 HAE este valor da mortalidade não diferiu estatisticamente da testemunha e nem da concentração de 1×10^9 con. mL⁻¹ diferindo apenas da concentração 10×10^9 con. mL⁻¹ que obteve os maiores valores de mortalidade acumulada. Nos períodos de 192, 216, 240, 264, 288 e 312 HAE, os valores de mortalidade acumulada das fêmeas estavam todos próximos a 100% não diferindo estatisticamente entre eles e a testemunha em todos os períodos (Tabela 3).

253 Experimento II. A exposição de fêmeas de *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* a
254 bioinseticidas compromete o parasitismo e a emergência desses parasitoides?

255 O parasitismo de fêmeas de *P. elaeisis* expostas as concentrações de *B.*
256 *bassiana* e *M. anisopliae* variou entre 8 e 52% , sendo que o maior valor ocorreu
257 na concentração de 5×10^9 con. mL⁻¹ de *M. anisopliae*. A porcentagem de
258 emergência da progênie variou entre 35 e 80%, a qual foi maior na concentração
259 de 10×10^9 con. mL⁻¹ de *M. anisopliae* (Tabela 4).

260 As fêmeas de *T. howardi* realizaram o parasitismo em 80 a 100% das
261 pupas, não sendo observado efeito das concentrações de *B. bassiana* e *M.*
262 *anisopliae*. A porcentagem de emergência da progênie variou entre 90 e 100%
263 sem diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 4).

264 O parasitismo de *T. diatraeae* expostos a estes fungos entomopatogênicos
265 variou entre 96 e 100%, sem diferença estatística. A porcentagem de emergência
266 da progênie em *T. diatraeae* foram de 100% para todos os tratamentos (Tabela 4).

267

268 **Discussão**

269

270 Experimento I. Efeito de bioinseticidas à base de *B. bassiana* e *M. anisopliae*
271 sobre adultos dos parasitoides *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae*

272 A menor mortalidade acumulada de *P. elaeisis* e *T. diatraeae* demonstra
273 que os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* não interferiram na
274 longevidade de fêmeas desses parasitoides. Por outro lado, as fêmeas do
275 parasitoide *T. howardi* tiveram sua longevidade reduzida quando expostas as

276 diferentes concentrações de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Diferentes espécies de
277 hospedeiros não são igualmente susceptíveis a infecção de uma espécie ou isolado
278 específico de um patógeno. Isto pode ser atribuído às diferenças na composição da
279 parede do corpo dos insetos e no comportamento, ao grau de esclerotização das
280 estruturas da cutícula e a falta de umidade presente no momento da penetração
281 dos entomopatógenos, que podem ser considerados como fatores importantes na
282 mortalidade causada pelos fungos entomopatogênicos nesses indivíduos (Hajek e
283 St. Leger 1994; Alves 1998).

284 Além disso, é importante destacar que a compatibilidade de *B. bassiana* e
285 *M. anisopliae* com *P. elaeisis* e *T. diatraeae* também foi observada para as
286 espécies de parasitoides *Trichogramma atopovirilia* Oatman e Platner,
287 *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e *Cotesia*
288 *flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) (Polanczyk *et al.* 2009; Rossoni
289 *et al.* 2014a, 2014b). Por outro lado, a espécie de parasitoide *T. howardi* foi
290 afetada pelos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, o que contraria os resultados
291 obtidos para espécie *Tetrastichus planipennisi* Yang (Hymenoptera: Eulophidae)
292 que é do mesmo gênero, a qual não foi susceptível à infecção por *B. bassiana* em
293 condições de laboratório (Dean *et al.* 2012).

294 Em outro estudo, o parasitoide *Spathius agrili* Yang (Hymenoptera:
295 Braconidae) foi pouco susceptível ao fungo *B. bassiana* com uma diferença média
296 de 13% a mais de mortalidade nos tratamentos em relação aos grupos controle
297 (Dean *et al.* 2012). Estes resultados são diferentes dos obtidos no nosso estudo,

298 pois o fungo *B. bassiana* causou 100% de mortalidade nas fêmeas de *T. howardi*
299 expostas as concentrações do entomopatógeno.

300 De maneira geral, as espécies de fungos entomopatogênicos *M. anisopliae*
301 e *B. bassiana*, nas concentrações, causaram maior mortalidade nas três espécies de
302 eulofídeos somente 96 horas após a exposição dos parasitoides ao
303 entomopatógeno. Isto é importante, pois esse período (96 horas) é suficiente para
304 que as fêmeas dos eulofídeos parasitem seus hospedeiros, o que não compromete
305 a eficiência biológica desses inimigos naturais, como foi relato por Costa *et al.*
306 (2014) para a espécie *T. howardi* e Pereira *et al.* (2008a, 2008b) para *P. elaeisis* e
307 *T. diatraeae*. Além disso, destaca-se que os parasitoides eulofídeos permaneceram
308 em contato direto com os fungos entomopatogênicos dentro de tubos de ensaio
309 por todo o período de sobrevivência, fato que não ocorre comumente no campo
310 onde, a chance do inseto entrar em contato direto com o entomopatógeno é menor.
311 Assim, acredita-se que, em condições de campo, esses dois métodos de controle
312 podem ter ação sinérgica para o manejo de *D. saccharalis* em cultivos de cana-de-
313 açúcar.

314

315 Experimento II. A exposição de fêmeas de *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* a
316 bioinseticidas compromete o parasitismo e a emergência desses parasitoides?

317 *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae* não influenciaram negativamente o
318 parasitismo das fêmeas e emergência da progênie das três espécies de eulofídeos,
319 o que pode indicar a compatibilidade desses parasitoides com os fungos
320 entomopatogênicos. Isto é importante, pois a compatibilidade desses parasitoides

321 com os fungos entomopatogênicos pode maximizar a eficiência de controle da
322 broca em condições de campo. Além disso, a compatibilidade de parasitoides com
323 entomopatógenos foi confirmado com a espécie *T. atopovirilia*, onde os imaturos
324 desse inimigo natural, presentes no interior dos ovos de *Spodoptera frugiperda*
325 (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) não foram afetados pelo contato com os
326 bioinseticidas Boveril WP PL63 (*B. bassiana*) e Metarril WP E9 (*M. anisopliae*)
327 na concentração 10^7 conídios mL⁻¹ (Polanczyk *et al.* 2010). Autores sugerem que
328 o contato dos fungos com estágios mais avançados do hospedeiro parasitado e/ou
329 com o inimigo natural não reduz a emergência do parasitoide (Mesquita e Lacey
330 2001; Rashki *et al.* 2009).

331 O contato dos entomopatógenos com os parasitoides não afetou o
332 parasitismo e a emergência desses eulofídeos em pupas do hospedeiro *D.*
333 *saccharalis*, isto pode ter relação com os compostos químicos presentes na
334 superfície da cutícula dos insetos, os quais impediram o desenvolvimento do
335 patógeno no hospedeiro e inimigos naturais. Além disso, isto pode ter relação,
336 com presença de água, íons, ácidos graxos e nutrientes encontrados na superfície
337 da cutícula do inseto, os quais são importantes para a germinação dos conídios e,
338 posterior, colonização do fungo no hospedeiro (Latge *et al.* 1987; Hassan *et al.*
339 1989; Shahid *et al.* 2012). No entanto, isto não deve ser generalizado, pois, alguns
340 inimigos naturais podem ter seu parasitismo reduzido quando em contato com *M.*
341 *anisopliae* e *B. bassiana* como relatado para o parasitoide *Oomyzus sokolowskii*
342 (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae) sobre larvas de *Plutella xylostella*

343 (Linnaeus) obtendo redução de 92,7% e 85,1%, respectivamente (Santos Jr. *et al.*
344 2006).

345 Para a espécie de *P. elaeisis* pode-se observar diferenças estatísticas entre
346 os valores encontrados, porém acreditamos que o período de parasitismo (24
347 horas) não foi suficiente. Este fato influenciou nos baixos valores de parasitismo e
348 emergência e acreditamos que o aumento no período de parasitismo seria
349 suficiente para aumentar o parasitismo de *P. elaeisis* em pupas de *D. saccharalis*.
350 Isto foi confirmado para a espécie de eulofídeo *T. howardi* em lagartas de *D.*
351 *saccharalis* em que o maior período de exposição do parasitoide ao hospedeiro
352 favoreceu o aumento do parasitismo e da emergência da progênie (Costa *et al.*
353 2014).

354 A segurança de fungos entomopatogênicos para os seres humanos, o meio
355 ambiente e organismos não-alvo é claramente um critério importante para ser
356 levado em consideração e cada sistema inseto-fungo deve ser revisto e
357 considerado em cada caso (Shahid *et al.* 2012). No entanto, algumas pesquisas
358 existentes sugerem que ocorram efeitos mínimos de fungos entomopatogênicos
359 em insetos não-alvos, sendo eles, uma alternativa mais segura para uso no manejo
360 integrado de pragas (MIP) aos inseticidas químicos (Goettel e Hajek 2000; Pell *et*
361 *al.* 2001).

362 Acredita-se que a exposição dos parasitoides aos fungos
363 entomopatogênicos não comprometa a localização do hospedeiro pelo parasitoide
364 e o reconhecimento prévio do hospedeiro como ideal, etapas que esse inimigo
365 natural realiza antes de parasitar seu hospedeiro. Isto é importante, pois, em

366 condições de campo, o parasitismo por si só é suficiente para impedir a
367 continuação do ciclo de vida de *D. saccharalis*, o que pode contribuir
368 significativamente para a diminuição da densidade populacional dessa praga.

369

370 **Conclusão**

371

372 Fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* reduziram a
373 longevidade de fêmeas de *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae*.

374 A exposição das fêmeas a *B. bassiana* e *M. anisopliae* não comprometeu o
375 parasitismo e a emergência de *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* em pupas de
376 *D. saccharalis*.

377

378 **Agradecimentos**

379

380 As instituições brasileiras Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
381 Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e ao Conselho
382 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo
383 financiamento de projeto aprovado no Edital / Chamada Universal 14/2012 -
384 Faixa A (processo CNPq número 482174/2012-9).

385

386

387

388

Referências

- Alves, S.B. Fungos entomopatogênicos. 1998. *In* Controle microbiano de insetos. Edited by Alves S.B. FEALQ, Piracicaba, Brasil. Pp. 289-381.
- Andrade, G.S., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C., Zanuncio, T.V., Leite, G.L.D., e Polanczyk, R.A. 2010. Immunity of an alternative host can be overcome by higher densities of its parasitoids *Palmistichus elaeisis* and *Trichospilus diatraeae*. PLoS One, **5**: 1–7.
- Barbosa, R.H., Kassab, S.O., Pereira, F.F., Rossoni, C., Costa, D.P., e Berndt, M.B. 2015. Parasitismo e aspectos biológicos de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae). Ciência Rural, **45**: 185-188.
- Bittencourt, M.A.L. e Berti Filho, E. 2004. Desenvolvimento dos estágios imaturos de *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera, Eulophidae) em pupas de Lepidoptera. Revista Brasileira de Entomologia, **48**: 65-68.
- Bouček, Z. 1976. The African and Asiatic species of *Trichospilus* and *Cotterellia* (Hymenoptera: Eulophidae). Bulletin of Entomological Research, **65**: 669-681.
- Chichera, R.A., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Barbosa, R.H., Pastori, P.L., e Rossoni, C. 2012. Capacidade de busca e reprodução de *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Interciência, **37**: 852-856.

- 412 Costa, D.P., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Rossoni, C., Pastori, P.L., e Zanuncio,
413 J.C. 2014. *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) in Different
414 Densities and Periods of Parasitism on *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera:
415 Crambidae) Caterpillars. Annals of the Entomological Society of America,
416 **107**: 961-966.
- 417 Dean, K.M., Vandenberg, J.D., Griggs, M.H., Bauer, L.S., e Fierke, M.K. 2012.
418 Susceptibility of two hymenopteran parasitoids of *Agrilus planipennis*
419 (Coleoptera: Buprestidae) to the entomopathogenic fungus *Beauveria*
420 *bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). Journal of Invertebrate Pathology,
421 **109**: 303-306.
- 422 Delvare, G. e Lasalle, J. 1993. A new genus of Tetrastichinae (Hymenoptera:
423 Eulophidae) from the Neotropical region, with the description of a new
424 species parasitica on key pests of oil palm. Journal of Natural History, **27**:
425 435-444.
- 426 Dinardo-Miranda, L.L., Anjos, I.A., Costa, V.P., e Fracasso, J. V. 2012.
427 Resistance of sugarcane cultivars to *Diatraea saccharalis*. Pesquisa
428 Agropecuária Brasileira, **47**: 1-7.
- 429 Favero, K., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Oliveira, H.N., Costa, D.P., e Zanuncio,
430 J.C. 2013. Biological Characteristics of *Trichospilus diatraeae*
431 (Hymenoptera: Eulophidae) are Influenced by the Number of Females
432 Exposed Per Pupa of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae).
433 Florida Entomologist, **96**: 583-589.

- 434 Glaeser, D.F., Pereira, F.F., Vargas, E.L., Calado, V.R.F., e Favero, K. 2014.
435 Reprodução de *Trichospilus diatraeae* em *Diatraea saccharalis* após três
436 gerações em *Tenebrio molitor*. Pesquisa Agropecuária Tropical, **44**: 213-
437 218.
- 438 Goettel, M.S. e Hajek, A.E. 2000. Evaluation of non-target effects of pathogens
439 used for management of arthropods. In Evaluating indirect ecological
440 effects of biological control. Edited by Wajnberg E., Scott J.K. e Quimby,
441 P.C. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom. Pp.81-97.
- 442 González, J.F.A., Oca, F.N.M., e Ravelo, H.G. 2003. Estudios bioecológicos de
443 *Tetrastichus howardi* Olliff. (Hymenoptera: Eulophidae), parásito pupal de
444 *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) en Cuba. (Primera
445 parte). Centro Agrícola, **30**: 37-41.
- 446 Hajek, A.E. e St. Leger, R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and
447 insect hosts. Annual Review of Entomology, **39**: 293-322.
- 448 Hassan, A.E.M., Dillion, R.J., e Charnley, A.K. 1989. Influence of accelerated
449 germination of Conidia on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for
450 *Manduca sexta*. Journal of Invertebrate Pathology, **54**: 227-279.
- 451 Kassab, S.O., Loureiro, E.S., Rossoni, C., Pereira, F.F., Mota, T.A., Barbosa,
452 R.H., e Costa, D.P. 2015. Control of *Mahanarva fimbriolata* (Stal)
453 (Hemiptera: Cercopidae) with entomopathogenic fungus and insecticides
454 using two sampling methods on sugarcane fields. African Journal of
455 Agricultural Research, **10**: 803-810.

- 456 La Salle, J. e Polaszek, A. 2007. Afrotropical species of the *Tetrastichus howardi*
457 species group (Hymenoptera: Eulophidae). African Entomology, **15**: 45-
458 56.
- 459 Latge, J.P., Sampeoro, L., Brey, P., e Diaquin, M. 1987. Aggressiveness of
460 *Conidiobolus obscurus* against the pea aphid - influence of cuticular
461 extracts on ballistospore germination of aggressive and nonaggressive
462 strains. Journal of Genetics Microbiology, **133**: 1987-1997.
- 463 Mesquita, A.L.M. e Lacey, L.A. 2001. Interactions among the entomopathogenic
464 fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes),
465 the parasitoid, *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae) and their
466 aphid host. Biological Control, **22**: 51-59.
- 467 Noyes, J.S. 2003. Universal Chalcidoidea Database [online]. Disponível em:
468 <http://www.nhm.ac.uk/chalcidoids> [acesso 16 de agosto de 2015].
- 469 Oliveira, M.A.P. de., Marques, E.J., Teixeira, V.W., e Barros, R. 2008. Efeito de
470 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)
471 Sorok. sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F.
472 (Lepidoptera: Crambidae). Acta Scientiarum: Agronomy, **30**: 220-224.
- 473 Pádua, D.G., Zampieron, S.L.M., e Nunes, J.F. 2014. Composition of the Families
474 of Parasitoids Wasp in the Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas
475 Gerais, Brazil. EntomoBrasilis, **7**: 199-206.
- 476 Parra, J.R.P. 2007. Técnicas de criação de insetos para programa de controle
477 biológico. 6ª edição. Editora Esalq/FEALQ, Piracicaba, Brasil.

- 478 Pastori, P.L., Pereira, F.F., Andrade, G.S., Silva, R.O., Zanuncio, J.C., e Pereira,
479 A.I.A. 2012. Reproduction of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera:
480 Eulophidae) in pupae of two lepidopterans defoliators of eucalypt. Revista
481 Colombiana de Entomología, **38**: 91-93.
- 482 Pell, J.K., Eilenberg, J., Hajek, A.E., e Steinkraus, D.C. 2001. Biology, ecology
483 and pest management potential of Entomophthorales. In Fungi as
484 biocontrol agents: progress, problems and potential. Edited by Butt T.M.,
485 Jackson C., e Magan N. CABI International, Wallingford, United
486 Kingdom. Pp.71-153.
- 487 Pennacchio, F. e Strand, M.R. 2006. Evolution of developmental strategies in
488 parasitic Hymenoptera. Annual Review of Entomology, **51**: 233-258.
- 489 Pereira, F.F., Zanuncio, J.C., Tavares, M.T., Pastori, P.L., e Jacques, G.C. 2008a.
490 Record of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) as parasitoid
491 of the eucalyptus defoliator *Thyrintea arnobia* (Lepidoptera:
492 Geometridae) in Brazil. Phytoparasitica, **36**: 304-306.
- 493 Pereira, F.F., Zanuncio, T.V., Zanuncio, J.C., Pratisoli, D., e Tavares, M.T.
494 2008b. Species of Lepidoptera Defoliators of Eucalyptus as New Host for
495 the Parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). Brazilian
496 archives of biology and technology, **51**: 259-262.
- 497 Pereira, F.F., Zanuncio, J.C., Pastori, P.L., Chichera, R.A., Andrade, G.S., e
498 Serrão, J.E. 2010. Reproductive biology of *Palmistichus elaeisis*
499 (Hymenoptera: Eulophidae) with alternative and natural hosts. Zoologia,
500 **27**: 887-891.

- 501 Pereira, F.F., Zanuncio, J.C., Oliveira, H.N., Grance, E.V., Pastori, P. L., e Gava-
502 Oliveira, M.D. 2011. Thermal requirements and estimate number of
503 generations of *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) in
504 different *Eucalyptus* plantations regions. Brazilian Journal of Biology, **71**:
505 431-436.
- 506 Pereira, F.F., Kassab, S.O., Calado, V.R.F., Vargas, E.L., Oliveira, H.N., e
507 Zanuncio, J.C. 2015. Parasitism and emergence of *Tetrastichus howardi*
508 (Hymenoptera: Eulophidae) on *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera:
509 Crambidae) larvae, pupae and adults. Florida Entomologist, **98**: 377-380.
- 510 Pinto, A.S., Botelho, P.S.M., e Oliveira, H.N. de. 2009. Guia ilustrado de pragas e
511 insetos benéficos da cana-de-açúcar. CP2, Piracicaba, Brasil.
- 512 Polanczyk, R.A., Grecco, E.D., Andrade, G.S., Celestino, F.N., Barbosa, W.F.,
513 Franco, C.R., e Pratissoli, D. 2009. Desempenho de *Trichogramma* spp.
514 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *Diaphania hyalinata* (L.)
515 (Lepidoptera: Pyralidae) tratados com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria*
516 *bassiana*. Arquivos do Instituto Biológico, **76**: 495-499.
- 517 Polanczyk, R.A., Pratissoli, D., Dalvi, L.P., Grecco, E.D., e Franco, C.R. 2010.
518 Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae*
519 (Metsch.) Sorokin nos parâmetros biológicos de *Trichogramma*
520 *atopovirilia* Oatman & Platner, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae).
521 Ciência Agrotecnologia, **34**: 1412-1416.
- 522 Rashki, M., Kharazi-Pakdel, A., Allahyari, H., e Van Alphen, J.J.M. 2009.
523 Interactions among the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*

- (Ascomycota: Hypocreales), the parasitoid, *Aphidius matricariae* (Hymenoptera: Braconidae) and its host, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). Biological Control, **50**: 324-328.
- Rossoni, C., Kassab, S.O., Loureiro, E.S., Pereira, F.F., Costa, D.P., Barbosa, R.H., e Zanuncio, J.C. 2014a. *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) are compatible with *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). Florida Entomologist, **97**: 1794-1804.
- Rossoni, C., Loureiro, E.S., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Costa, D.P., e Barbosa, R.H. 2014b. Selectivity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) on Adults of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). Folia Biologica (Kraków), **62**: 269- 275.
- Santos Jr., H.J.G., Marques, E.J., Barros, R., e Gondim Jr., M.G.C. 2006. Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e o Parasitoide *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae) sobre Larvas da Traça-das-Crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). Neotropical Entomology, **35**: 241-245.
- Shahid, A.A., Rao, A.Q., Bakhsh, A., e Husnain, T. 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. Archives of Biological Science, **64**: 21-42.
- Tavares, W.S., Hansson, C., Mielke, O.H.H., Serrão, J.E., e Zanuncio, J.C. 2013. Parasitism of *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle, 1993 on pupae of

- 547 *Methona themisto* (Hübner, [1818]) reared on two hosts (Lepidoptera:
548 Nymphalidae; Hymenoptera: Eulophidae). SHILAP Revista de
549 lepidopterología, **41**: 43-48.
- 550 Vargas, E.L., Pereira, F.F., Tavares, M.T., e Pastori, P.L. 2011. Record of
551 *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Diatraea*
552 sp. (Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane crop in Brazil. Entomotropica,
553 **26**: 143-146.
- 554 Wenzel, I.M., Giometti, F.H.C., e Almeida, J.E.M. 2006. Patogenicidade do
555 isolado IBCB 66 de *Beauveria bassiana* à broca da cana-de-açúcar
556 *Diatraea saccharalis* em condições de laboratório. Arquivos do Instituto
557 Biológico, **73**: 259-261.
- 558 Zaché, B., Wilcken, C.F., Da Costa, R.R., e Soliman, E.P. 2010. *Trichospilus*
559 *diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae), a new parasitoid of *Melanolophia*
560 *consimilaria* (Lepidoptera: Geometridae). Phytoparasitica, **38**: 355–357.
- 561 Zaché, B., Zaché, R.R.C., Soliman, E.P., e Wilcken, C.F. 2011a. Evaluation of
562 *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) as parasitoid of the
563 eucalyptus defoliator *Euselasia eucerus* (Lep.: Riodinidae). International
564 Journal of Tropical Insect Science, **20**: 1-5.
- 565 Zaché, B., Zaché, R.R.C., Souza, N.M., Dias, T.K.R., e Wilcken, C.F. 2011b.
566 New record of *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942
567 (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Sarsina violascens* (Herrich-
568 Schaeffer, 1856) (Lepidoptera: Lymantriidae) in Brazil. Journal of Plant
569 Protection Research (Poland), **51**: 420-422.

- 570 Zaché, B., Zaché, R.R.C., e Wilcken, C.F. 2012a. Evaluation of *Palmistichus*
571 *elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) as Parasitoid of the
572 *Sarsina violascens* Herrich-Schaeffer (Lepidoptera: Lymantriidae). Journal
573 of Plant Studies, **1**: 85-89.
- 574 Zaché, B., Wilcken, C.F., Zaché, R.R.C., e Souza, N.M. 2012b. New occurrence
575 of *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera:
576 Eulophidae) as a parasitoid of *Spodoptera cosmioides* Walker, 1858
577 (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. Biota Neotropical, **12**: 319-322.
- 578 Zaché, B., Zaché, R.R.C., e Wilcken, C.F. 2013. Reproduction of *Trichospilus*
579 *diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing pupae of
580 *Eupseudosoma involuta* (Lepidoptera: Arctiidae) a lepidopteran defoliator
581 in Brazil. Revista Chilena de Historia Natural, **86**: 221-224.
- 582 Zanuncio, J.C., Pereira, F.F., Jacques, G.C., Tavares, M.T., e Serrão, J.E. 2008.
583 *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae), a new alternative
584 host to rear the pupae parasitoid *Palmistichus elaeisis* Delvare & Lasalle
585 (Hymenoptera: Eulophidae). The Coleopterists Bulletin, **62**: 64–66.
- 586 Zappelini, L.O., Almeida, J.E.M., Batista Filho, A., e Giometti, F.H.C. 2010.
587 Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*
588 (Metsch.) Sorok. visando o controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea*
589 *saccharalis* (Fabr., 1794). Arquivos do Instituto Biológico, **77**: 75-82.

Tabela 1. Mortalidade acumulada (% $\pm$ EP) de fêmeas do parasitoide *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) após exposição às concentrações de *Beauveria bassiana* (Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Clavicipitaceae).

<i>Metarhizium anisopliae</i>														
Tratamentos	24 HAE	48 HAE	72 HAE	96 HAE	120 HAE	144 HAE	168 HAE	192 HAE	216 HAE	240 HAE	264 HAE	288 HAE	312 HAE	(n)
Testemunha	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 b	12,00 $\pm$ 2,07 b	40,00 $\pm$ 2,34 b	58,00 $\pm$ 2,43 b	88,00 $\pm$ 3,21 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
1 x 10 ⁹ con.mL ⁻¹	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	2,00 $\pm$ 4,47 a	10,00 $\pm$ 1,56 a	40,00 $\pm$ 1,20 ab	72,00 $\pm$ 2,67 ab	88,00 $\pm$ 3,21 a	96,00 $\pm$ 2,67 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
5 x 10 ⁹ con.mL ⁻¹	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	38,00 $\pm$ 1,99 a	70,00 $\pm$ 2,39 a	96,00 $\pm$ 2,88 ab	98,00 $\pm$ 2,45 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
10 x 10 ⁹ con.mL ⁻¹	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	2,00 $\pm$ 4,47 a	24,00 $\pm$ 1,38 a	74,00 $\pm$ 1,29 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
C.V.	-	-	-	-	-	85,62	53,51	40,81	29,99	-	-	-	-	-
<i>Beauveria bassiana</i>														
Tratamentos	24 HAE	48 HAE	72 HAE	96 HAE	120 HAE	144 HAE	168 HAE	192 HAE	216 HAE	240 HAE	264 HAE	288 HAE	312 HAE	(n)
Testemunha	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 b	12,00 $\pm$ 2,07 b	40,00 $\pm$ 2,34 b	58,00 $\pm$ 2,43 b	88,00 $\pm$ 3,21 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
1 x 10 ⁹ con.mL ⁻¹	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	20,00 $\pm$ 1,34 a	56,00 $\pm$ 2,23 a	78,00 $\pm$ 2,62 a	98,00 $\pm$ 2,54 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
5 x 10 ⁹ con.mL ⁻¹	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	20,00 $\pm$ 1,70 a	50,00 $\pm$ 2,34 a	92,00 $\pm$ 2,94 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
10 x 10 ⁹ con.mL ⁻¹	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	12,00 $\pm$ 3,03 a	26,00 $\pm$ 2,71 b	68,00 $\pm$ 3,21 a	88,00 $\pm$ 2,90 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
C.V.	-	-	-	-	-	117,07	89,91	50,67	28,54	-	-	-	-	-

C.V. – Coeficiente de variação.
HAE – Horas após exposição.
Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
(n) – Número de fêmeas de *Palmistichus elaeisis* utilizadas para avaliar a mortalidade.

Tabela 2. Mortalidade acumulada (% $\pm$ EP) de fêmeas do parasitoide *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) após exposição às concentrações de *Beauveria bassiana* (Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Clavicipitaceae).

<i>Metarhizium anisopliae</i>														
Tratamentos	24 HAE	48 HAE	72 HAE	96 HAE	120 HAE	144 HAE	168 HAE	192 HAE	216 HAE	240 HAE	264 HAE	288 HAE	312 HAE	(n)
Testemunha	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 c	0,00 $\pm$ 0,00 c	0,00 $\pm$ 0,00 b	16,00 $\pm$ 3,10 b	42,00 $\pm$ 1,75 b	66,00 $\pm$ 1,48 b	78,00 $\pm$ 1,83 b	78,00 $\pm$ 1,83 b	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
1 x 10 ⁹ con.mL ⁻¹	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	4,00 $\pm$ 4,00 a	42,00 $\pm$ 3,74 a	58,00 $\pm$ 3,74 ab	76,00 $\pm$ 2,07 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
5 x 10 ⁹ con.mL ⁻¹	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	14,00 $\pm$ 3,79 a	70,00 $\pm$ 1,40 b	100,00 $\pm$ 1,40 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
10 x 10 ⁹ con.mL ⁻¹	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	38,00 $\pm$ 3,32 a	50,00 $\pm$ 3,32 ab	76,00 $\pm$ 1,84 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
C.V.	-	-	-	-	41,25	70,13	34,69	19,36	31,05	26,09	16,09	16,09	-	
<i>Beauveria bassiana</i>														
Tratamentos	24 HAE	48 HAE	72 HAE	96 HAE	120 HAE	144 HAE	168 HAE	192 HAE	216 HAE	240 HAE	264 HAE	288 HAE	312 HAE	(n)
Testemunha	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b	16,00 $\pm$ 3,10 b	42,00 $\pm$ 1,75 b	66,00 $\pm$ 1,48 b	78,00 $\pm$ 1,83 b	78,00 $\pm$ 1,83 b	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
1 x 10 ⁹ con.mL ⁻¹	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	56,00 $\pm$ 1,76 a	86,00 $\pm$ 3,14 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
5 x 10 ⁹ con.mL ⁻¹	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	10,00 $\pm$ 4,32 a	48,00 $\pm$ 2,44 a	66,00 $\pm$ 2,39 a	98,00 $\pm$ 2,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
10 x 10 ⁹ con.mL ⁻¹	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	6,00 $\pm$ 2,07 a	54,00 $\pm$ 2,71 a	64,00 $\pm$ 3,52 a	98,00 $\pm$ 2,00 a	98,00 $\pm$ 2,00 a	98,00 $\pm$ 2,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
C.V.	-	-	-	-	-	95,42	62,04	20,71	31,35	34,65	16,09	16,09	-	

C.V. – Coeficiente de variação.
HAE – Horas após exposição.
Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
(n) – Número de fêmeas de *Tetrastichus howardi* utilizadas para avaliar a mortalidade.

Tabela 3. Mortalidade acumulada (% $\pm$ EP) de fêmeas do parasitoide *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) após exposição às concentrações de *Beauveria bassiana* (Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Clavicipitaceae).

<i>Metarhizium anisopliae</i>														
Tratamentos	24 HAE	48 HAE	72 HAE	96 HAE	120 HAE	144 HAE	168 HAE	192 HAE	216 HAE	240 HAE	264 HAE	288 HAE	312 HAE	(n)
Testemunha	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	2,00 $\pm$ 3,25 b	20,00 $\pm$ 3,25 c	74,00 $\pm$ 2,77 a	76,00 $\pm$ 3,03 a	94,00 $\pm$ 3,34 a	98,00 $\pm$ 3,25 a	98,00 $\pm$ 3,25 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
1 x 10 ⁹ con.mL ⁻¹	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	26,00 $\pm$ 2,13 a	72,00 $\pm$ 2,88 a	88,00 $\pm$ 3,27 a	98,00 $\pm$ 3,25 a	98,00 $\pm$ 3,25 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
5 x 10 ⁹ con.mL ⁻¹	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	26,00 $\pm$ 2,21 a	52,00 $\pm$ 2,24 a	80,00 $\pm$ 3,25 a	80,00 $\pm$ 4,22 a	98,00 $\pm$ 3,25 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
10 x 10 ⁹ con.mL ⁻¹	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 b	40,00 $\pm$ 4,49 b	68,00 $\pm$ 2,48 a	82,00 $\pm$ 2,20 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
C.V.	-	-	-	184,44	104,42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Beauveria bassiana</i>														
Tratamentos	24 HAE	48 HAE	72 HAE	96 HAE	120 HAE	144 HAE	168 HAE	192 HAE	216 HAE	240 HAE	264 HAE	288 HAE	312 HAE	(n)
Testemunha	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	2,00 $\pm$ 3,25 a	20,00 $\pm$ 3,25 b	74,00 $\pm$ 2,77 b	76,00 $\pm$ 3,03 b	94,00 $\pm$ 3,34 a	98,00 $\pm$ 3,25 a	98,00 $\pm$ 3,25 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
1 x 10 ⁹ con.mL ⁻¹	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	6,00 $\pm$ 3,47 a	26,00 $\pm$ 2,71 b	64,00 $\pm$ 1,81 b	78,00 $\pm$ 3,19 b	90,00 $\pm$ 4,14 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
5 x 10 ⁹ con.mL ⁻¹	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	2,00 $\pm$ 3,25 a	14,00 $\pm$ 2,96 b	48,00 $\pm$ 1,75 c	64,00 $\pm$ 1,99 b	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
10 x 10 ⁹ con.mL ⁻¹	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	14,00 $\pm$ 1,38 a	68,00 $\pm$ 2,59 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	50
C.V.	-	-	-	-	116,19	50,09	43,25	-	-	-	-	-	-	-

C.V. – Coeficiente de variação.

HAE – Horas após exposição.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

(n) – Número de fêmeas de *Trichospilus diatraeae* utilizadas para avaliar a mortalidade.

Tabela 4. Parasitismo (% $\pm$ EP) e Emergência (% $\pm$ EP) de parasitoides eulofídeos após o contato com às concentrações dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Clavicipitaceae).

<i>Palmistichus elaeisis</i>				
Tratamentos	Parasitismo	Emergência	Parasitismo	Emergência
	<i>Metarhizium anisopliae</i> (M.a.)		<i>Beauveria bassiana</i> (B.b.)	
Testemunha	8,00 $\pm$ 4,89 b	40,00 $\pm$ 4,49 b	8,00 $\pm$ 4,89 c	40,00 $\pm$ 4,49 b
1 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹	16,00 $\pm$ 1,16 ab	40,00 $\pm$ 4,49 b	28,00 $\pm$ 2,95 ab	70,00 $\pm$ 2,08 a
5 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹	52,00 $\pm$ 3,56 a	79,32 $\pm$ 3,72 a	28,00 $\pm$ 2,95 ab	43,32 $\pm$ 1,55 b
10 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹	28,00 $\pm$ 2,95 ab	80,00 $\pm$ 3,25 a	48,00 $\pm$ 1,16 a	35,00 $\pm$ 2,39 b
C.V.	61,12	66,91	67,43	45,07
<i>Tetrastichus howardi</i>				
Tratamentos	Parasitismo	Emergência	Parasitismo	Emergência
	<i>Metarhizium anisopliae</i> (M.a.)		<i>Beauveria bassiana</i> (B.b.)	
Testemunha	92,00 $\pm$ 3,25 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	92,00 $\pm$ 3,25 a	100,00 $\pm$ 0,00 a
1 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹	100 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	80,00 $\pm$ 1,56 a	90,00 $\pm$ 1,15 a
5 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹	88,00 $\pm$ 4,89 a	96,00 $\pm$ 4,00 a	96,00 $\pm$ 4,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a
10 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹	96,00 $\pm$ 4,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	92,00 $\pm$ 4,89 a	95,00 $\pm$ 5,00 a
<i>Trichospilus diatraeae</i>				
Tratamentos	Parasitismo	Emergência	Parasitismo	Emergência
	<i>Metarhizium anisopliae</i> (M.a.)		<i>Beauveria bassiana</i> (B.b.)	
Testemunha	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a
1 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹	96,00 $\pm$ 4,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a
5 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a
10 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹	96,00 $\pm$ 4,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 a

C.V. – Coeficiente de variação.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO DE EULOFÍDEOS (HYMENOPTERA) EM PUPAS DE
Diatraea saccharalis (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) EXPOSTAS A
FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Desenvolvimento de eulofídeos (Hymenoptera) em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) expostas a fungos entomopatogênicos*

C. Rossoni¹, F.F. Pereira, S.O. Kassab, A. Rodrigues, R.H. Barbosa, J.C.

Zanuncio

C. Rossoni, F.F. Pereira, A. Rodrigues, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, 79.804-970, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

S.O. Kassab, R.H. Barbosa, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, 79.804-970, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

J.C. Zanuncio, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

¹Autor de correspondência (e-mail: camilasrossoni@gmail.com).

* Este artigo está nas normas do periódico “The Canadian Entomologist”

1 **Resumo**

2 *Palmistichus elaeisis* Delvare e LaSalle, *Tetrastichus howardi* (Olliff) e
3 *Trichospilus diatraeae* Cherian e Margabandhu (Hymenoptera: Eulophidae) são
4 promissores no controle de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera:
5 Crambidae). Além disso, os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*
6 (Balsamo) Vuillemin (Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff)
7 Sorokin (Clavicipitaceae) são utilizados para controlar a broca e as cigarrinhas da
8 cana. Este fato nos motivou a investigar se os entomopatógenos comprometem os
9 aspectos biológicos desses eulofídeos. Para isto, pupas de *D. saccharalis* (24 h de
10 idade) foram expostas ao parasitismo de três fêmeas de cada espécie por 72 h.
11 Depois disso, as pupas parasitadas foram acondicionadas, individualmente, em
12 tubos de vidro e tampados com algodão. No interior de cada tubo, foi inserido
13 uma superfície de contato tratada com 1 mL de suspensão fúngica nas
14 concentrações de 1×10^9 con. mL⁻¹, 5×10^9 con. mL⁻¹, 10×10^9 con. mL⁻¹ de *B.*
15 *bassiana* e *M. anisopliae*. Os tubos foram acondicionados em BOD a 25±2°C, 14
16 h de fotofase e 70±10 % U.R. A emergência de *T. howardi* e *T. diatraeae* não foi
17 comprometida pelos fungos entomopatogênicos, porém a espécie *P. elaeisis* foi
18 afetada. A duração do ciclo de vida, progênie e razão sexual de *P. elaeisis* não
19 foram afetadas após exposição. Para as espécies *T. howardi* e *T. diatraeae* ocorreu
20 pouca variação da duração do ciclo de vida, progênie e razão sexual. De maneira
21 geral, a exposição dos eulofídeos aos fungos entomopatogênicos, no interior de
22 pupas de *D. saccharalis*, não compromete os aspectos biológicos desses
23 parasitoides.

Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e as principais pragas dessa cultura são *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) e *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) (Kassab *et al.* 2014, 2015; Rossoni *et al.* 2014a, 2014b). As injúrias diretas causadas por *D. saccharalis* podem ocasionar perda na biomassa e morte das gemas apicais das plantas de cana-de-açúcar (Dinardo-Miranda *et al.* 2011, 2012). O dano indireto deve-se à redução da produção de açúcar e álcool, devido a presença de microrganismos nos colmos atacados (Simões *et al.* 2012; Rossato *et al.* 2013).

Inseticidas químicos são pouco eficazes em controlar *D. saccharalis*, pois as lagartas de primeiro instar, alimentam-se das folhas do cartucho e, posteriormente, migram para o colmo da cana-de-açúcar, ficando protegidas das aplicações (Antigo *et al.* 2013; Oliveira *et al.* 2013). Isso tem motivado a busca por outros métodos de controle, visando reduzir a densidade populacional desse lepidóptero-praga, como a utilização de parasitoides (Rodrigues *et al.* 2013).

Um amplo complexo de microhimenópteros tem sido relacionado como inimigos naturais de *D. saccharalis* e os parasitoides *Palmistichus elaeisis* Delvare e LaSalle, *Tetrastichus howardi* (Olliff) e *Trichospilus diatraeae* Cherian e Margabandhu (Hymenoptera: Eulophidae) podem controlar essa praga (Cruz *et al.* 2011; Chicera *et al.* 2012; Vargas *et al.* 2014; Pereira *et al.* 2015). Além disso, agentes de controle microbiano são utilizados para combater as populações da broca, especialmente, os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*

47 (Balsamo) Vuillemin (Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff)
48 Sorokin (Clavicipitaceae). Este último fungo, anteriormente conhecido como
49 *Entomophthora anisopliae* (basiônimo), é um fungo que cresce naturalmente nos
50 solos em todo o mundo e causa doença em vários insetos (Xu *et al.* 2015).

51 *Diatraea saccharalis* é suscetível a *B. bassiana* e *M. anisopliae* e o contato
52 com esses fungos entomopatogênicos afetam as características biológicas da broca
53 da cana-de-açúcar (Williams *et al.* 2013; Hayashida *et al.* 2014). Além disso, o
54 fungo entomopatogênico *M. anisopliae* é produzido em arroz e aplicado em
55 canaviais do Brasil para reduzir populações de *M. fimbriolata* (Loureiro *et al.*
56 2005).

57 Fungos entomopatogênicos e os parasitoides eulofídeos *P. elaeisis*, *T.*
58 *howardi* e *T. diatraeae* podem ser utilizados no controle de *D. saccharalis* e as
59 interações entre hospedeiro-parasitoide-entomopatógeno podem afetar estes
60 inimigos naturais de forma sinérgica ou antagônica (Roy e Cottrell 2008).

61 Estudos relacionados à interação dos agentes de controle como fungos e
62 parasitoides necessitam de pesquisas para esclarecer a coexistência de ambos no
63 mesmo ambiente, definindo a forma de suas interações (Santos Jr *et al.* 2006;
64 Rossoni *et al.* 2014a, 2014b; Ibrahim 2015). Este fato nos motivou a investigar se
65 os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* comprometem o
66 desenvolvimento de *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* em pupas de *D.*
67 *saccharalis*.

68

69

Materiais e métodos

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Controle Biológico de Insetos (LECOBIOL) e de Microbiologia da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) em Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Obtenção das formulações comerciais à base de *B. bassiana* e *M. anisopliae*

As formulações utilizadas no experimento foram os produtos comerciais Ballvéria WP[®] (isolado de *B. bassiana* - IBCB 66) e Metiê WP[®] (isolado de *M. anisopliae* - IBCB 425), ambas, fornecidas pela empresa Ballagro Agro Tecnologia Ltda. As duas formulações comerciais obtiveram mais de 95% de viabilidade dos esporos.

Multiplicação do hospedeiro *D. saccharalis*

Ovos de *D. saccharalis* foram retirados da criação do LECOBIOL da UFGD e acondicionados em frascos de vidro (8,5 cm de diâmetro × 13 cm de altura), contendo dieta artificial (ANEXO 1) a base de germe de trigo, farelo de soja e levedura de cana (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen; Saccaromycetales: Saccaromycetaceae) para alimentação das lagartas recém eclodidas, onde elas permaneceram até o último instar. Essas lagartas foram transferidas para gerbox (6,5 cm de diâmetro × 2,5 cm de altura) com dieta de realimentação (ANEXO 2) a base de farelo de soja e levedura de cana até a formação das pupas. As pupas foram recolhidas dos gerbox e colocadas em potes

plásticos transparentes (retangular de 500 mL e $14,2 \times 9,8 \times 4,7$ cm) onde permaneceram até a fase adulta. Os adultos foram sexados e 50 adultos (30 fêmeas e 20 machos) foram colocados em gaiolas de tubos de PVC (10 cm de diâmetro $\times$ 22 de altura), revestidos internamente com folhas de papel sulfite, utilizado como substrato para oviposição dos ovos. Estes tubos foram fechados com folha de papel sulfite e elástico. Os ovos foram coletados diariamente, lavados com solução de sulfato de cobre a 1% e armazenados em sala climatizada à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa (UR) de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. Os procedimentos utilizados na criação de *D. saccharalis* estão de acordo com a metodologia proposta por Parra (2007) (ANEXO 3).

103

Multiplicação dos parasitoides *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae*

Populações de *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* foram mantidas separadamente em tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro $\times$ 8,5 cm de altura) vedados com algodão e alimentados com gotículas de mel puro. Para manutenção da criação destes parasitoides, pupas de *D. saccharalis* com 24 a 48 horas de idade foram expostas as fêmeas dos parasitoides por 24 horas. Após esse período as pupas foram individualizadas em tubos de vidro e mantidas em câmara climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14 horas, até a emergência de adultos (Vargas *et al.* 2011; Chichera *et al.* 2012) (ANEXO 3).

113

114

115

116 Desenvolvimento Experimental

117 Pupas de *D. saccharalis* com 24 horas (h) de idade foram expostas ao
118 parasitismo por três fêmeas de cada uma das espécies de parasitoide por 72 h. As
119 fêmeas parasitoides utilizadas no experimento apresentavam 24 h de idade para a
120 espécie *T. howardi* (Pereira *et al.* 2015) e *T. diatraeae* (Pastori *et al.* 2013), 72 h
121 para *P. elaeisis* (Andrade *et al.* 2012) sendo, este o melhor período para a
122 utilização dessas espécies, devido a maior presença de ovócitos. As pupas de *D.*
123 *saccharalis* parasitadas pelos eulofídeos foram acondicionadas, individualmente,
124 em tubos de vidro (1,5 cm de diâmetro × 10 cm de altura) e posteriormente, estes
125 foram tampados com algodão hidrofílico.

126 No interior de cada tubo, foi inserido uma superfície de contato (papel
127 filtro 1 cm de largura × 9 cm de comprimento) tratada com 1 mL de suspensão
128 fúngica, utilizando uma micropipeta (Rossoni *et al.* 2014a, 2014b), nas
129 concentrações de 1×10^9 con. mL⁻¹, 5×10^9 con. mL⁻¹, 10×10^9 con. mL⁻¹ dos
130 produtos comerciais Ballvéria® (*B. bassiana*) e Metiê® (*M. anisopliae*). Em
131 seguida os tubos de ensaio foram acondicionados em câmara climatizada tipo
132 BOD a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 14 h de fotofase e 70 ± 10 % umidade relativa até a emergência
133 dos parasitoides. As superfícies de contato permaneceram nos tubos durante um
134 período de 96 h e então foram retiradas. O experimento foi composto por 6
135 tratamentos e uma testemunha [testemunha (parasitismo sem fungo)] com 10
136 repetições, cada repetição foi composta por 5 pupas de *D. saccharalis*
137 previamente parasitadas pelos inimigos naturais, totalizando 50 pupas por
138 tratamento.

139 A porcentagem de emergência da progênie, progênie (número de
140 parasitoides emergidos por pupa), duração do ciclo de vida (tempo de
141 desenvolvimento do parasitoide imaturo contado a partir do dia do parasitismo até
142 a emergência do adulto), razão sexual (número de fêmeas da progênie dividido
143 pelo número total da progênie) e longevidade em dias dos indivíduos emergidos
144 das pupas de *D. saccharalis* (para a avaliação da longevidade foram selecionados
145 ao acaso 20 fêmeas e 20 machos de cada espécie de parasitoide de cada
146 tratamento) foram avaliadas.

147

148 Análise estatística

149 Para se avaliar os dados do experimento foi utilizada a comparação das
150 médias dos aspectos biológicos pelo teste de Scott-Knott com até 5% de
151 probabilidade, essa avaliação foi feita separadamente para cada espécie de
152 parasitoide expostas às diferentes concentrações dos fungos entomopatogênicos.
153 Não foi realizada a interação entre os valores obtidos (aspectos biológicos) com as
154 três espécies de eulofídeos expostas às duas espécies de fungos
155 entomopatogênicos nas concentrações, pois ocorrem diferenças na biologia,
156 desses eulofídeos, o que poderia gerar erro na forma de interpretação dos dados.

157

158 Resultados

159

160 A emergência de *T. howardi* e *T. diatraeae* não foi afetada pelos fungos *B.*
161 *bassiana* e *M. anisopliae* (Tabela 1). Os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e

162 *M. anisopliae* afetaram a emergência do parasitoide *P. elaeisis*, o que variou de
163 $59,66 \pm 0,26$ a $98,00 \pm 0,47$ respectivamente (Tabela 1). No entanto, a duração do
164 ciclo de vida, progênie e razão sexual de *P. elaeisis* não foram afetadas pelos
165 fungos entomopatogênicos (Tabela 1). A longevidade das fêmeas de *P. elaeisis*
166 não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, porém a longevidade de machos
167 variou entre $9,95 \pm 1,01$ a $14,80 \pm 0,29$ dias (Tabela 1).

168 A duração do ciclo de vida de *T. howardi* em pupas de *D. saccharalis* após
169 contato com os fungos entomopatogênicos variou entre $17,50 \pm 0,04$ e $18,87 \pm$
170 $0,18$ dias (Tabela 1). A progênie de *T. howardi* que foram expostas as
171 concentrações de *B. bassiana* e *M. anisopliae* variou entre $123,80 \pm 2,44$ e $146,82$
172 $\pm 2,84$ indivíduos, sendo o maior valor encontrado na testemunha (Tabela 1). A
173 razão sexual de *T. howardi* variou de $0,82 \pm 0,05$ a $0,92 \pm 0,09$, para todos os
174 tratamentos (Tabela 1). A longevidade de machos e de fêmeas de *T. howardi* foi
175 afetada pelos fungos entomopatogênicos com valores variando de $8,80 \pm 0,53$ a
176 $19,95 \pm 0,78$ dias para as fêmeas e $11,90 \pm 0,90$ a $39,00 \pm 0,97$ dias para os
177 machos (Tabela 1).

178 A duração do ciclo de vida de *T. diatraeae* foi de $17,80 \pm 1,74$ e $19,30 \pm$
179 $0,06$ dias, após a exposição aos fungos entomopatogênicos com diferença
180 estatística entre os tratamentos (Tabela 1). A progênie de *T. diatraeae* em pupas
181 de *D. saccharalis* após contato com os fungos entomopatogênicos variaram de
182 $283,10 \pm 2,88$ a $307,66 \pm 2,89$ indivíduos para todos os tratamentos (Tabela 1). A
183 razão sexual de *T. diatraeae* variou de $0,90 \pm 0,08$ a $0,93 \pm 0,19$, para as
184 concentrações dos fungos entomopatogênicos (Tabela 1). A longevidade de

machos e fêmeas de *T. diatraeae* não foram diferentes estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 1).

Discussão

A menor variação na emergência de *T. howardi* e *T. diatraeae* após o contato com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* sugere que a exposição das pupas parasitadas aos bioinseticidas não afetam essa característica biológica. Este fato foi observado com os parasitoides *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *D. saccharalis* tratados com o isolado IPA 159E (Broglio-Micheletti *et al.* 2006) e com a espécie *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) exposta aos bioinseticidas Biometha WP Plus[®] (*M. anisopliae*), Biovéria G[®] (*B. bassiana*), Metarril WP[®] (*M. anisopliae*), Boverril WP[®] (*B. bassiana*) e Metiê WP[®] (*M. anisopliae*) (Rossoni *et al.* 2014a, 2014b). Os parasitoides *Psyttalia concolor* (Szépligeti) e *Psyttalia cosyrae* (Wilkinson) (Hymenoptera: Braconidae) emergiram com sucesso a partir de *Ceratitis capitata* (Weidemann) e *Ceratitis cosyra* (Walker) (Diptera: Tephritidae) expostos a *M. anisopliae* em solo tratado, a 0 e 183 dias após a aplicação dos tratamentos, indicando que o fungo não teve nenhum efeito adverso sobre o desenvolvimento dos parasitoides (Ekesi *et al.* 2005). Além disso, resultados semelhantes foram observados para o parasitoide *Phradis morionellus* (Holmgren) (Hymenoptera: Ichneumonidae) que se desenvolve em *Meligethes aeneus* (Fabricius) (Coleoptera: Nitidulidae), em que *M. anisopliae* foi eficiente

208 para controlar o besouro praga, mas não afetou o desenvolvimento do inimigo
209 natural (Husberg e Hokkanen 2001). Autores sugerem que a infecção dos fungos
210 entomopatogênicos sobre imaturos de parasitoides, não reduz a emergência dos
211 inimigos naturais, principalmente quando as larvas do parasitoide estão mais
212 desenvolvidas no momento da exposição ao patógeno, pois estas larvas ganham a
213 competição pelo hospedeiro devido a uma baixa susceptibilidade a esta infecção
214 (Mesquita e Lacey 2001; Rashki *et al.* 2009).

215 Por outro lado, as fêmeas do parasitoide *P. elaeisis* tiveram a emergência
216 reduzida quando expostas as concentrações de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. No
217 entanto, isto não deve ser generalizado, pois, outras características biológicas, tais
218 como: duração do ciclo, progênie, razão sexual não foram afetadas pelos fungos
219 entomopatogênicos, sendo semelhante à espécie *C. flavipes* expostas aos fungos
220 *B. bassiana* e *M. anisopliae* (Rossoni *et al.* 2014a, 2014b). Parasitoides podem ser
221 susceptíveis a infecção por fungos entomopatogênicos, mas isto não os impede de
222 se reproduzir, permitindo, assim que fungos e parasitoides sejam usados
223 simultaneamente (Nielsen *et al.* 2005).

224 A duração do ciclo de vida de *T. howardi* e *T. diatraeae* em pupas de *D.*
225 *saccharalis* após a exposição aos fungos entomopatogênicos variou. No entanto, a
226 variação observada nos tratamentos foi pequena, ou seja, de 1,28 dias para a
227 espécie *T. diatraeae* e de 0,78 dias para *T. howardi*, o que pode indicar que essa
228 alteração não tem relação com os entomopatógenos, mas sim com a biologia
229 desses eulofídeos, fato que foi comprovado com estes parasitoides (Rodrigues *et*
230 *al.* 2013; Costa *et al.* 2014a, 2014b; Glaeser *et al.* 2014; Pereira *et al.* 2015). Por

231 outro lado, *Aphidius colemani* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae) teve seu
232 tempo de desenvolvimento diminuído quando seu hospedeiro *Myzus persicae*
233 (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) foi tratado com suspensão de *B. bassiana*
234 (Emami *et al.* 2013).

235 A progênie de *T. howardi* e *T. diatraeae* em pupas de *D. saccharalis* após
236 a exposição aos fungos entomopatogênicos foi influenciada. A variação na
237 progênie foi de aproximadamente, 24 indivíduos entre os tratamentos para estas
238 duas espécies de eulofídeos e acreditamos que isto não tem relação com os fungos
239 entomopatogênicos. Autores sugerem que o número de indivíduos produzidos
240 pode ter relação com a quantidade de ovos e de toxina injetada no momento da
241 oviposição das fêmeas parasitoides, a resposta imunológica e a biomassa do
242 hospedeiro (Andrade *et al.* 2010; Cusumano *et al.* 2010; Harvey *et al.* 2013).
243 Assim, doses inadequadas de toxinas injetadas pelas fêmeas, podem influenciar na
244 menor e/ou maior progênie de parasitoides no hospedeiro (Cusumano *et al.* 2010;
245 Harvey *et al.* 2013). Além disso, os hemócitos do hospedeiro podem encapsular
246 os ovos e larvas de parasitoides e isto pode ter relação com a progênie do inimigo
247 natural, o que pode justificar a variação obtida nesse aspecto biológico nos
248 tratamentos desse estudo (Strand, 2008; Andrade *et al.* 2010). Por outro lado,
249 pequenas variações na biomassa dos hospedeiros utilizados para a multiplicação
250 de parasitoides podem influenciar nas características biológicas de inimigos
251 naturais, o que foi comprovado com a espécie *T. diatraeae* em pupas de *D.*
252 *saccharalis* (Glaeser 2011).

253 A razão sexual de *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* em pupas de *D.*
254 *saccharalis* após o contato com *B. bassiana* e *M. anisopliae*, esteve acima de 0,82
255 e isto é importante, pois o valor de 0,50 é o mínimo exigido no controle de
256 qualidade (Navarro 1998), o que pode sugerir que os fungos entomopatogênicos
257 são inócuos aos parasitoides. Além disso, a elevada razão sexual maximiza a
258 eficiência de parasitismo nas liberações de campo, uma vez que as fêmeas
259 parasitoides são responsáveis pela geração subsequente (Rodrigues *et al.* 2013;
260 Costa *et al.* 2014a, 2014b; Barbosa *et al.* 2015). Por outro lado, a menor razão
261 sexual pode comprometer a eficiência de parasitismo de *T. howardi*, pelo menor
262 número de fêmeas produzidas (Pereira *et al.* 2009a, 2009b, 2010, 2011). Assim,
263 acreditamos que a variação da razão sexual dos eulofídeos por pupa observada
264 nesse experimento, pode estar relacionada à disponibilidade de recurso do
265 hospedeiro, como relatado para *T. diatraeae* em pupas de *D. saccharalis* e
266 *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae) (Chichera *et al.* 2012;
267 Favero *et al.* 2013, 2014), *P. elaeisis* em pupas de *Anticarsia gemmatilis* Hubner
268 (Lepidoptera: Erebididae), *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae) e *D.*
269 *saccharalis* (Pereira *et al.* 2009a, 2009b, 2010, 2013; Chichera *et al.* 2012) e *T.*
270 *howardi* em pupas de *D. saccharalis* (Vargas *et al.* 2011; Costa *et al.* 2014a;
271 Pereira *et al.* 2015) e *Erinnyis ello* (Linnaeus) (Lepidoptera: Sphingidae) (Barbosa
272 *et al.* 2015).

273 A longevidade de fêmeas de *P. elaeisis* e *T. diatraeae* em pupas de *D.*
274 *saccharalis* após a exposição aos bioinseticidas não foi influenciada. No entanto,
275 ocorreu a diminuição da longevidade de ambos os sexos de *T. howardi* e machos

276 de *P. elaeisis*. Autores sugerem que essa característica biológica tem uma
277 correlação positiva com o aumento no parasitismo em condições de campo
278 (Pratissoli *et al.* 2007). Dessa forma, a maior longevidade pode aumentar a
279 probabilidade das fêmeas parasitoides encontrar hospedeiros e realizar o
280 parasitismo. No entanto, acredita-se que a diminuição desse aspecto biológico
281 para *T. howardi* e *P. elaeisis* não compromete a cópula e o parasitismo desses
282 inimigos naturais, pois os machos desses indivíduos sobreviveram por 9 e 11 dias
283 nos tratamentos com menores valores para *P. elaeisis* e *T. howardi*,
284 respectivamente e as fêmeas de *T. howardi* sobreviveram por pelo menos 8 dias
285 no tratamento com menor período de vida.

286 De maneira geral, a exposição de pupas parasitadas por *P. elaeisis*, *T.*
287 *howardi* e *T. diatraeae* aos fungos entomopatogênicos não comprometeu o
288 desenvolvimento e as características biológicas desses inimigos naturais, o que é
289 importante, pois, em condições de campo pode ocorrer o contato dos
290 entomopatógenos com pupas parasitadas por esses parasitoides. Como as
291 características (a emergência, duração do ciclo de vida, progênie e razão sexual)
292 têm correlação com a qualidade biológica de parasitoides, acreditamos que esses
293 inimigos naturais são compatíveis com os fungos entomopatogênicos *B. bassiana*
294 e *M. anisopliae*.

295

296

297

298

Conclusão

A exposição de pupas de *D. saccharalis* parasitadas por *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* aos fungos entomopatogênicos não comprometeram o desenvolvimento desses parasitoides.

Fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* permitiram a emergência, duração do ciclo de vida, progênie, razão sexual e longevidade de *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* em pupas de *D. saccharalis*.

Agradecimentos

As instituições brasileiras Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento de projeto aprovado no Edital / Chamada Universal 14/2012 - Faixa A (processo CNPq número 482174/2012-9).

Referências

Andrade, G.S., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C., Zanuncio, T.V., Leite, G.L.D., e Polanczyk, R.A. 2010. Immunity of an alternative host can be overcome by higher densities of its parasitoids *Palmistichus elaeisis* and *Trichospilus diatraeae*. PLoS One, 5: 1-7.

- 322 Andrade, G.S., Sousa, A.H., Santos, J.C., Gama, F.C., Serrão, J.E., e Zanuncio,
323 J.C. 2012. Oogenesis pattern and type of ovariole of the parasitoid
324 *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). Anais da Academia
325 Brasileira de Ciências, **84**: 767-774.
- 326 Antigo, M.R., Oliveira, H.N., Carvalho, G.A., e Pereira, F.F. 2013. Repelência de
327 produtos fitossanitários usados na cana-de-açúcar e seus efeitos na
328 emergência de *Trichogramma galloi*. Revista Ciência Agronômica, **44**:
329 910-916.
- 330 Barbosa, R.H., Kassab, S.O., Pereira, F.F., Rossoni, C., Costa, D.P., e Berndt,
331 M.A. 2015. Parasitism and biological aspects of *Tetrastichus howardi*
332 (Hymenoptera: Eulophidae) on *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae)
333 pupae. Ciência Rural, **45**: 185-188.
- 334 Broglio-Micheletti, S.M.F., Santos, A.J.N., e Pereira-Barros, J.L. 2006. Ação de
335 alguns produtos fitossanitários para adultos de *Trichogramma galloi*
336 Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Ciência e
337 Agrotecnologia, **30**: 1051-1055.
- 338 Chichera, R.A., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Barbosa, R.H., Pastori, P.L., e
339 Rossoni, C. 2012. Capacidade de busca e reprodução de *Trichospilus*
340 *diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de
341 *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Interciência, **37**: 852-856.
- 342 Costa, D.P., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Rossoni, C., Favero, K., e Barbosa, R.H.
343 2014a. Reprodução de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae)
344 em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) de diferentes

- 345 idades. Revista de Ciências Agrárias / Amazonian Journal of Agricultural
346 and Environmental Sciences, **57**: 67-71.
- 347 Costa, D.P., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Rossoni, C., Pastori, P.L., e Zanuncio,
348 J.C. 2014b. *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) in Different
349 Densities and Periods of Parasitism on *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera:
350 Crambidae) Caterpillars. Annals of the Entomological Society of America,
351 **107**: 961-966.
- 352 Cruz, I., Redoan, A.C., Silva, R.B., Figueiredo, M.L.C., e Penteado-Dias, A.M.
353 2011. New record of *Tetrastichus howardi* (Olliff) as a parasitoid of
354 *Diatraea saccharalis* (Fabr.) on maize. Scientia Agricola, **68**: 252-254.
- 355 Cusumano, A., Peri, E., Bradleigh, V.S., e Colazza, S. 2010. Interspecific
356 extrinsic and intrinsic competitive interactions in egg parasitoids.
357 Biological Control, **57**: 719-734.
- 358 Dinardo-Miranda, L.L., Fracasso, J.V., e Perecin, D. 2011. Variabilidade espacial
359 de populações de *Diatraea saccharalis* em canaviais e sugestão de método
360 de amostragem. Bragantia, **70**: 577-585.
- 361 Dinardo-Miranda, L.L., Anjos, I.A., Costa, V.P., e Fracasso, J.V. 2012. Resistance
362 of sugarcane cultivars to *Diatraea saccharalis*. Pesquisa Agropecuária
363 Brasileira, **47**: 1-7.
- 364 Ekesi, S., Maniania, N.K., Mohamed, S.A., e Lux, S.A. 2005. Effect of soil
365 application of different formulations of *Metarhizium anisopliae* on African
366 tephritid fruit flies and their associated endoparasitoids. Biological
367 Control, **35**: 83-91.

- 368 Emami, F., Alich, M., e Minaei, K. 2013. Interaction between the
369 entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Ascomycota:
370 Hypocreales) and the parasitoid wasp, *Aphidius colemani* Viereck
371 (Hymenoptera: Braconidae). Journal of Entomological and Acarological
372 Research, **45**: e4.
- 373 Favero, K., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Oliveira, H.N., Costa, D.P., e Zanuncio,
374 J.C. 2013. Biological characteristics of *Trichospilus diatraeae*
375 (Hymenoptera: Eulophidae) are influenced by the number of females
376 exposed per pupa of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae).
377 Florida Entomologist, **96**: 583-589.
- 378 Favero, K., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Costa, D.P., e Zanuncio, J.C. 2014. Life
379 and Fertility Tables of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae)
380 With *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) Pupae. Annals of the
381 Entomological Society of America, **107**: 621-626.
- 382 Glaeser, D.F. 2011. Características biológicas e comportamentais de *Trichospilus*
383 *diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) criado em pupa de *Diatraea*
384 *saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Tese (Doutorado em Agronomia) –
385 universidade federal da grande dourados, dourados, Mato Grosso do Sul,
386 Brasil. 89f.
- 387 Glaeser, D.F., Pereira, F.F., Vargas, E.L., Calado, V.R.F., e Favero, K. 2014.
388 Desempenho reprodutivo de *Trichospilus diatraeae* no hospedeiro natural
389 *Diatraea saccharalis* três gerações no hospedeiro alternativo *Tenebrio*
390 *molitor*. Pesquisa Agropecuária Tropical, **44**: 213-218.

- 391 Harvey, J.A., Poelman, E.H., e Tanaka, T. 2013. Intrinsic inter and intraspecific
392 competition in parasitoid wasps. *Annual Review of Entomology*, **58**: 333-
393 351.
- 394 Hayashida, E.K., Kassab, S.O., Loureiro, E.S., Rossoni, C., Barbosa, R.H., Silva,
395 A.S., e Costa, D.P. 2014. Isolados de *Metarhizium anisopliae*
396 (Metchnikoff) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) para Controle de
397 *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae). *Entomobrasilis*,
398 **7**: 20-23.
- 399 Husberg, G.B. e Hokkanen, H.M.T. 2001. Effects of *Metarhizium anisopliae* on
400 the pollen beetle *Meligethes aeneus* and its parasitoids *Phradis*
401 *morionellus* and *Diospilus capito*. *BioControl*, **46**: 261–273.
- 402 Ibrahim, R.A. 2015. Can Entomopathogenic Fungi Clearly Differentiate between
403 Harmful and Beneficial Insects in Nature?. *African Entomology*, **23**: 486-
404 493.
- 405 Kassab, S.O., Loureiro, E.S., Rossoni, C., Pereira, F.F., Barbosa, R.H., Costa,
406 D.P., e Zanuncio, J.C. 2014. Combinations of *Metarhizium anisopliae* with
407 chemical insecticides and their effectiveness in *Mahanarva fimbriolata*
408 (Hemiptera: Cercopidae) control on sugarcane. *Florida Entomologist*, **97**:
409 146-154.
- 410 Kassab, S.O., Loureiro, E.S., Rossoni, C., Pereira, F.F., Mota, T.A., Barbosa,
411 R.H., e Costa, D.P. 2015. Control of *Mahanarva fimbriolata* (Stal)
412 (Hemiptera: Cercopidae) with entomopathogenic fungus and insecticides

- 413 using two sampling methods on sugarcane fields. African Journal of
414 Agricultural Research, **10**: 803-810.
- 415 Loureiro, E.S., Batista Filho, A., Almeida, J.E.M., e Pessoa, L.G.A. 2005. Seleção
416 de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok. contra a cigarrinha
417 da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera:
418 Cercopidae) em laboratório. Neotropical Entomology, **34**: 791-798.
- 419 Mesquita, A.L.M. e Lacey, L.A. 2001. Interactions among the entomopathogenic
420 fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes),
421 the parasitoid, *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae) and their
422 aphid host. Biological Control, **22**: 51-59.
- 423 Navarro, M.A. 1998. *Trichogramma* spp. procucción, uso y manejo en Colombia.
424 Guadalajara de Buga: Imprectec, 176p.
- 425 Nielsen, C., Skovgård, H., e Steenberg, T. 2005. Effect of *Metarhizium anisopliae*
426 (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on survival and reproduction of the
427 filth fly parasitoid, *Spalangia cameroni* (Hymenoptera: Pteromalidae).
428 Environmental Entomology, **34**: 133-139.
- 429 Oliveira, H.N., Antigo, M.R., Carvalho, G.A., Glaeser, D.F., e Pereira, F.F. 2013.
430 Seletividade de inseticidas utilizados na cana-de-açúcar a adultos de
431 *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae).
432 Bioscience Journal, **29**: 1267-1274.
- 433 Parra, J.R.P. 2007. Técnicas de criação de insetos para programa de controle
434 biológico. 6ª edição. Editora Esalq/Fealq. Piracicaba. Brasil, 134p.

- 435 Pastori, P.L., Zanuncio, J.C., Pereira, F.F., Pratissoli, D., Cecon, P.R., e Serrão,
436 J.E. 2013. Temperatura e tempo de refrigeração de pupas de *Anticarsia*
437 *gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) afetam parâmetros biológicos de
438 *Trischospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae)?. Semina. Ciências
439 Agrárias, **34**: 1493-1508.
- 440 Pereira, F.F., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., Patrick, L.P., e Ramalho, F.S. 2009a.
441 Reproductive performance of *Palmistichus elaeisis* Delvare and LaSalle
442 (Hymenoptera: Eulophidae) with previously refrigerated pupae of *Bombyx*
443 *mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Brazilian Journal of Biology, **69**: 631-
444 637.
- 445 Pereira, F.F., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., Oliveira, H.N., Favero, K., e Grance,
446 E.L.V. 2009b. Progenie de *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle
447 (Hymenoptera: Eulophidae) parasitando pupas de *Bombyx mori* L.
448 (Lepidoptera: Bombycidae) de diferentes idades. Neotropical Entomology,
449 **38**: 660-664.
- 450 Pereira, F.F., Zanuncio, J.C., Pastori, P.L., Chichera, R.A., Andrade, G.S., e
451 Serrão, J.E. 2010. Reproductive biology of *Palmistichus elaeisis*
452 (Hymenoptera: Eulophidae) with alternative and natural hosts. Zoologia,
453 **27**: 887-891.
- 454 Pereira, F.F., Zanuncio, J.C., Oliveira, H.N., Grance, E.V., Pastori, P.L., e Gava-
455 Oliveira, M.D. 2011. Thermal requirements and estimate number of
456 generations of *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) in

- different Eucalyptus plantations regions. Brazilian Journal of Biology, **71**: 431-436.
- Pereira, F.F., Zanuncio, J.C., Kassab, S.O., Pastori, P.L., Barbosa, R.H., e Rossoni, C. 2013. Biological characteristics of *Palmistichus elaeisis* Delvare & Lasalle (Hymenoptera: Eulophidae) on refrigerated pupae of *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). Chilean Journal of Agricultural Research, **73**: 08-09.
- Pereira, F.F., Kassab, S.O., Calado, V.R.F., Vargas, E.L., Oliveira, H.N., e Zanuncio, J.C. 2015. Parasitism and emergence of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) on *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae, pupae and adults. Florida Entomologist, **98**: 377-380.
- Pratissoli, D., Polanczyk, R.A., Pereira, C.L.T., Furtado, I.S.A., e Cochetto, J.G. 2007. Influência da fase embrionária dos ovos da traça-das-crucíferas sobre fêmeas de *Trichogramma pretiosum* com diferentes idades. Horticultura Brasileira, **25**: 286-290.
- Rashki, M., Kharazi-Pakdel, A., Allahyari, H., e Van Alphen, J.J.M. 2009. Interactions among the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales), the parasitoid, *Aphidius matricariae* (Hymenoptera: Braconidae) and its host, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). Biological Control, **50**: 324-328.
- Rodrigues, M.A.T., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Pastori, P.L., Glaeser, D.F., Oliveira, H.N., e Zanuncio, J.C. 2013. Thermal requirements and generation estimates of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae)

- 480 in sugarcane producing regions of Brasil. Florida Entomologist, **96**: 154-
481 159.
- 482 Rossato, J.A.S., Costa, G.H.G., Madaleno, L.L., Mutton, M.J.R., Higley, L.G., e
483 Fernandes, O.A. 2013. Characterization and impact of the sugarcane borer
484 on sugarcane yield and quality. Agronomy Journal, **105**: 643-648.
- 485 Rossoni, C., Kassab, S.O., Loureiro, E.S., Pereira, F.F., Costa, D.P., Barbosa,
486 R.H., e Zanuncio, J.C. 2014a. *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria*
487 *bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) are compatible with *Cotesia*
488 *flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). Florida Entomologist, **97**: 1794-
489 1804.
- 490 Rossoni, C., Loureiro, E.S., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Costa, D.P., e Barbosa,
491 R.H. 2014b. Selectivity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria*
492 *bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) on Adults of *Cotesia flavipes*
493 (Hymenoptera: Braconidae). Folia Biologica (Kraków), **62**: 269-275.
- 494 Roy, H.E. e Cottrell, E. 2008. Forgotten natural enemies: Interactions between
495 coccinellids and insect-parasitic fungi. European Journal of Entomology,
496 **105**: 391-398.
- 497 Santos Jr., H.J.G., Marques, E.J., Barros, R., e Gondim Jr., M.G.C. 2006.
498 Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., *Beauveria bassiana*
499 (Bals.) Vuill. e o Parasitoide *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov)
500 (Hymenoptera: Eulophidae) sobre Larvas da Traça-das-Crucíferas,
501 *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). Neotropical
502 Entomology, **35**: 241-245.

- 503 Simões, R.A., Letícia, R.G., Bento, J.M.S., Solter, L.F., e Delalibera Jr. I. 2012.
504 Biological and behavioral parameters of the parasitoid *Cotesia flavipes*
505 (Hymenoptera: Braconidae) are altered by the pathogen *Nosema* sp.
506 (Microsporidia: Nosematidae). *Biological Control*, **63**: 164-171.
- 507 Strand, M. R. 2008. The insect cellular immune response. *Insect Science*, **15**: 1-
508 14.
- 509 Vargas, E.L., Pereira, F.F., Tavares, M.T., e Pastori, P.L. 2011. Record of
510 *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Diatraea*
511 sp. (Lepidoptera: Crambidae) in sugar cane crop in Brazil. *Entomotropica*,
512 **26**: 143-146.
- 513 Vargas, E.L., Pereira, F.F., Calado, V.R.F., Glaeser, D.F., Rodrigues, B.A.C., e
514 Silva, N.V. 2014. Densidade de fêmeas de *Trichospilus diatraeae*
515 (Hymenoptera: Eulophidae) por pupa de *Diatraea saccharalis*
516 (Lepidoptera: Crambidae). *Sitientibus série Ciências Biológicas*, **13**: 1-7.
- 517 Williams, T., Arredondo-Bernal, H., e Rodriguez-Del-Bosque, L.A. 2013.
518 Biological pest control in Mexico. *Annual Review of Entomology*, **58**:
519 119-140.
- 520 Xu, M., Xu, F.Y., Liu, Y.P., Pan, Y.S., e Wu, X.Q. 2015. Assessment of
521 *Metarhizium anisopliae* (Clavicipitaceae) and its vector, *Scleroderma*
522 *guani* (Hymenoptera: Bethylidae), for the control of *Monochamus*
523 *alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *The Canadian Entomologist*, **147**:
524 628-634.
525

Tabela 1. Aspectos biológicos ($\pm$ EP) dos parasitoides eulofídeos emergidos de pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) expostas às concentrações de *Beauveria bassiana* (Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Clavicipitaceae).

<i>Palmistichus elaeisis</i>						
Tratamentos	Emergência (%)	Duração do ciclo de vida (dias)	Progênie (nº de insetos)	Razão Sexual	Longevidade (dias)	
					Machos	Fêmeas
Testemunha	97,50 $\pm$ 0,79 a	21,43 $\pm$ 0,06 a	98,96 $\pm$ 0,09 a	0,92 $\pm$ 2,43 a	11,90 $\pm$ 1,21 b	12,40 $\pm$ 0,97 a
1 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹ de <i>B.b</i>	86,50 $\pm$ 0,60 a	22,16 $\pm$ 0,44 a	93,98 $\pm$ 0,03 a	0,87 $\pm$ 0,92 a	10,55 $\pm$ 1,19 b	12,00 $\pm$ 1,05 a
5 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹ de <i>B.b</i>	59,66 $\pm$ 0,26 c	21,88 $\pm$ 0,28 a	104,50 $\pm$ 0,09 a	0,92 $\pm$ 0,18 a	14,45 $\pm$ 1,12 a	13,40 $\pm$ 0,57 a
10 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹ de <i>B.b</i>	67,49 $\pm$ 0,57 c	21,52 $\pm$ 0,35 a	94,82 $\pm$ 0,20 a	0,89 $\pm$ 2,63 a	13,25 $\pm$ 0,16 a	13,15 $\pm$ 0,44 a
1 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹ de <i>M.a</i>	78,83 $\pm$ 0,28 b	22,70 $\pm$ 0,53 a	88,86 $\pm$ 0,05 a	0,94 $\pm$ 2,01 a	9,95 $\pm$ 1,01 b	11,20 $\pm$ 1,46 a
5 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹ de <i>M.a</i>	91,50 $\pm$ 0,59 a	21,98 $\pm$ 0,30 a	98,50 $\pm$ 0,10 a	0,94 $\pm$ 2,47 a	11,60 $\pm$ 1,57 b	13,40 $\pm$ 0,96 a
10 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹ de <i>M.a</i>	98,00 $\pm$ 0,47 a	21,98 $\pm$ 0,32 a	101,82 $\pm$ 0,15 a	0,91 $\pm$ 2,31 a	14,80 $\pm$ 0,29 a	12,75 $\pm$ 0,10 a
P	0,01	ns	ns	ns	0,05	ns
C.V	19,36	-	-	-	21,53	-
<i>Tetrastichus howardi</i>						
Tratamentos	Emergência (%)	Duração do ciclo de vida (dias)	Progênie (nº de insetos)	Razão Sexual	Longevidade (dias)	
					Machos	Fêmeas
Testemunha	100,00 $\pm$ 0,00 a	17,50 $\pm$ 0,04 c	146,82 $\pm$ 2,84 a	0,86 $\pm$ 0,01 b	39,00 $\pm$ 0,97 a	19,95 $\pm$ 0,78 a
1 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹ de <i>B.b</i>	96,00 $\pm$ 2,66 a	17,96 $\pm$ 0,12 b	137,71 $\pm$ 271 a	0,87 $\pm$ 0,02 b	23,65 $\pm$ 0,50 b	14,90 $\pm$ 0,62 b
5 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹ de <i>B.b</i>	100,00 $\pm$ 0,00 a	18,12 $\pm$ 0,03 b	144,30 $\pm$ 2,84 a	0,92 $\pm$ 0,09 a	31,15 $\pm$ 0,95 a	18,75 $\pm$ 0,53 a
10 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹ de <i>B.b</i>	100,00 $\pm$ 0,00 a	18,28 $\pm$ 0,18 b	141,46 $\pm$ 2,87 a	0,82 $\pm$ 0,05 b	13,85 $\pm$ 1,99 c	8,80 $\pm$ 0,53 b
1 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹ de <i>M.a</i>	100,00 $\pm$ 0,00 a	18,08 $\pm$ 0,20 b	127,77 $\pm$ 2,34 b	0,85 $\pm$ 0,04 b	12,95 $\pm$ 0,60 c	11,40 $\pm$ 0,46 b
5 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹ de <i>M.a</i>	100,00 $\pm$ 0,00 a	17,54 $\pm$ 0,19 c	123,80 $\pm$ 2,44 b	0,92 $\pm$ 0,07 a	11,90 $\pm$ 0,90 c	12,10 $\pm$ 0,79 b
10 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹ de <i>M.a</i>	98,00 $\pm$ 2,00 a	18,87 $\pm$ 0,18 a	139,59 $\pm$ 2,18 a	0,83 $\pm$ 0,05 b	25,00 $\pm$ 1,62 b	18,80 $\pm$ 0,39 a
P	ns	0,01	0,01	0,05	0,01	0,01
C.V	-	2,71	14,82	9,24	23,28	21,52
<i>Trichospilus diatraeae</i>						
Tratamentos	Emergência (%)	Duração do ciclo de vida (dias)	Progênie (nº de insetos)	Razão Sexual	Longevidade (dias)	
					Machos	Fêmeas
Testemunha	100,00 $\pm$ 0,00 a	19,30 $\pm$ 0,06 a	299,08 $\pm$ 2,04 a	0,93 $\pm$ 0,04 a	9,60 $\pm$ 0,74 a	17,50 $\pm$ 1,90 a
1 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹ de <i>B.b</i>	100,00 $\pm$ 0,00 a	18,76 $\pm$ 0,02 b	283,10 $\pm$ 2,88 b	0,92 $\pm$ 0,02 a	9,90 $\pm$ 0,23 a	13,40 $\pm$ 0,95 a
5 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹ de <i>B.b</i>	100,00 $\pm$ 0,00 a	17,80 $\pm$ 1,74 f	284,16 $\pm$ 2,62 b	0,90 $\pm$ 0,08 b	10,50 $\pm$ 0,52 a	14,95 $\pm$ 1,90 a
10 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹ de <i>B.b</i>	98,00 $\pm$ 2,00 a	18,02 $\pm$ 0,05 e	301,53 $\pm$ 2,48 a	0,91 $\pm$ 0,11 b	9,05 $\pm$ 0,52 a	12,30 $\pm$ 1,50 a
1 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹ de <i>M.a</i>	100,00 $\pm$ 0,00 a	18,44 $\pm$ 0,08 c	302,54 $\pm$ 1,60 a	0,92 $\pm$ 0,06 a	8,00 $\pm$ 0,28 a	15,95 $\pm$ 0,90 a
5 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹ de <i>M.a</i>	100,00 $\pm$ 0,00 a	18,16 $\pm$ 0,97 d	307,66 $\pm$ 2,89 a	0,92 $\pm$ 0,05 a	8,45 $\pm$ 0,59 a	14,65 $\pm$ 1,97 a
10 x 10 ⁹ con. mL ⁻¹ de <i>M.a</i>	100,00 $\pm$ 0,00 a	18,30 $\pm$ 0,06 d	303,18 $\pm$ 2,45 a	0,93 $\pm$ 0,19 a	9,75 $\pm$ 0,54 a	17,50 $\pm$ 1,96 a
P	ns	0,01	0,01	0,05	ns	ns
C.V	-	1,20	12,21	2,01	-	-

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com até 5% de probabilidade.

con. mL⁻¹ – conídios de *B. bassiana* e/ou *M. anisopliae* por mL

C.V. – Coeficiente de variação.

CAPÍTULO III

INTERAÇÕES DE *Beauveria bassiana* (CORDYCIPITACEAE) E *Metarhizium anisopliae* (CLAVICIPITACEAE) COM PARASITOIDES EULOFÍDEOS (HYMENOPTERA) EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Interações de *Beauveria bassiana* (Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Clavicipitaceae) com parasitoides eulofídeos (Hymenoptera) em plantas de cana-de-açúcar*

C. Rossoni¹, F.F. Pereira, S.O. Kassab, A. Rodrigues, E.S. Loureiro, J.C.

Zanuncio

C. Rossoni¹, F.F. Pereira, A. Rodrigues, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, 79.804-970, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

S.O. Kassab, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, 79.804-970, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

E.S. Loureiro, Campus de Chapadão do Sul, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79.560-000, Chapadão do Sul, Mato Grosso do Sul, Brasil.

J.C. Zanuncio, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

¹Autor de correspondência (e-mail: camilasrossoni@gmail.com).

* Este artigo está nas normas do periódico “The Canadian Entomologist”

1 **Resumo**

2 Interações sinérgicas ou antagônicas podem ocorrer entre agentes de controle
3 biológico. O objetivo deste trabalho foi investigar como *Beauveria bassiana*
4 (Balsamo) Vuillemin (Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff)
5 Sorokin (Clavicipitaceae) interagem com os parasitoides *Palmistichus elaeisis*
6 Delvare e LaSalle, *Tetrastichus howardi* (Olliff) e *Trichospilus diatraeae* Cherian
7 e Margabandhu (Hymenoptera: Eulophidae) em planta de cana-de-açúcar. Pupas
8 de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) foram
9 individualizadas e inseridas em orifícios pré-perfurados em colmos de cana.
10 Posteriormente, os mesmo foram fixados nas plantas e as formulações foram
11 pulverizadas separadamente na concentração de $5,5 \times 10^9$ con. mL⁻¹ e então a
12 touceira de cana foi coberta, individualmente, com uma gaiola de “voil”, nas quais
13 foram liberadas 102 fêmeas dos parasitoides por pupa. O parasitismo foi
14 permitido por 96 horas, então as pupas foram retiradas dos colmos e levadas ao
15 laboratório para avaliação. Não ocorreu diferença estatística no parasitismo para
16 nenhuma das três espécies em nenhum dos tratamentos e não foi observada
17 emergência em nenhum dos tratamentos para *P. elaeisis*, porém *T. howardi* obteve
18 50% e *T. diatraeae* 25% de emergência das pupas no tratamento com *B. bassiana*.
19 As demais características avaliadas como ciclo de vida, progênie e razão sexual
20 possuiu valores semelhantes àqueles encontrados em trabalhos realizados em
21 laboratório com *T. howardi* e *T. diatraeae* em pupas de *D. saccharalis* indicando
22 que os fungos não influenciaram o desenvolvimento dos parasitoides.

23

Introdução

A utilização de agentes biológicos tem sido um método bastante explorado no controle das cigarrinhas e broca da cana-de-açúcar em canaviais brasileiros (Almeida *et al.* 2007; Zappellini *et al.* 2010; Kassab *et al.* 2012a; Rossoni *et al.* 2014a). O método de controle biológico tem como finalidade manter as espécies de pragas em níveis tecnicamente aceitáveis através da introdução de um predador natural, parasitoide ou microrganismo que lhe cause doença específica ou morte (Van Driesche e Bellows 1996; Conceição e Silva 2011).

Nos últimos anos, se observou uma crescente demanda pelo uso de inseticidas biológicos, especialmente, aqueles a base de fungos entomopatogênicos, uma vez que podem ser produzidos massalmente, de forma barata e com vida útil relativamente alta, o que facilita o armazenamento e a sua posterior aplicação no campo (Borgio e Bency 2011; Kassab *et al.* 2012b).

Mahanarva fimbriolata (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) destaca-se como um importante inseto-praga na cultura da cana-de-açúcar (Barbosa *et al.* 2011). A mecanização da colheita das áreas destinadas ao cultivo da cana-de-açúcar proporcionou o acúmulo de palhada sobre o solo e os restos culturais, associados à elevada temperatura e umidade favoreceu o desenvolvimento das populações de *M. fimbriolata* (Dinardo-Miranda *et al.* 1999; Dinardo-Miranda *et al.* 2003; Dinardo-Miranda e Gil 2007). Atualmente, o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Clavicipitaceae) é o principal

46 agente de controle biológico desse inseto-praga em cana-de-açúcar (Kassab *et al.*
47 2012a, 2012b).

48 Outra importante praga da cana-de-açúcar é a broca *Diatraea saccharalis*
49 (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae). As perdas provocadas por *D. saccharalis*
50 podem comprometer a produção em 0,25% de açúcar, 0,20% de álcool e 0,77%,
51 isto para cada 1 % da intensidade de infestação da praga em canaviais (Gallo *et al.*
52 2002). No entanto *D. saccharalis* é suscetível a *Beauveria bassiana* (Balsamo)
53 Vuillemin (Cordycipitaceae) e *M. anisopliae* e o contato dos fungos
54 entomopatogênicos com a broca da cana-de-açúcar pode afetar as características
55 biológicas desta praga (Destéfano *et al.* 2004; Wenzel *et al.* 2006; Oliveira *et al.*
56 2008; Williams *et al.* 2013).

57 Além disso, himenópteros parasitoides têm sido relatados como
58 importantes inimigos naturais de *D. saccharalis*, destacando-se os parasitoides
59 *Palmistichus elaeisis* Delvare e LaSalle, *Tetrastichus howardi* (Olliff) e
60 *Trichospilus diatraeae* Cherian e Margabandhu (Hymenoptera: Eulophidae) (Cruz
61 *et al.* 2011; Chicera *et al.* 2012; Rodrigues *et al.* 2013; Costa *et al.* 2014; Pereira
62 *et al.* 2015).

63 Dessa forma, as interações podem ocorrer em condições de campo entre os
64 parasitoides e fungos entomopatogênicos. No entanto, essas interações podem ser
65 sinérgicas (quando agregam valores ao controle do inseto-praga) ou antagônicas
66 (quando estes organismos competem e prejudicam o controle biológico) (Alves
67 1998; Fuentes-Contreras e Niemeyer 2000; Stolz *et al.* 2002; Roy e Cottrell 2008;
68 Rossoni *et al.* 2014b). Este fato nos levou a investigar como os agentes biológicos

69 *B. bassiana* e *M. anisopliae* interagem com os parasitoides *P. elaeisis*, *T. howardi*
70 e *T. diatraeae* em plantas de cana-de-açúcar.

71

72 **Materiais e métodos**

73

74 As multiplicações dos insetos foram conduzidas no laboratório de Controle
75 Biológico de Insetos (LECOBIOL) da Universidade Federal da Grande Dourados
76 (UFGD) e o experimento foi conduzido em plantios comerciais de cana-de-açúcar
77 da Usina São Fernando Açúcar e Álcool, com a variedade SP81-3250 em
78 Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, no ano de 2014.

79

80 Obtenção dos bioinseticidas *B. bassiana* e *M. anisopliae*

81 Os fungos utilizados no experimento foram os produtos comerciais
82 Ballvéria WP[®] (isolado de *B. bassiana* - IBCB 66) e Metiê WP[®] (isolado de *M.*
83 *anisopliae* - IBCB 425), fornecidos pela empresa Ballagro Agro Tecnologia Ltda.
84 Os dois obtiveram mais de 95% de viabilidade dos esporos.

85

86 Multiplicação de *D. saccharalis*

87 Ovos de *D. saccharalis* foram acondicionados em frascos de vidro (8,5 cm
88 × 13 cm), contendo dieta artificial (ANEXO 1) a base de germe de trigo, farelo de
89 soja e levedura de cana para alimentação das lagartas recém eclodidas, onde elas
90 permaneceram até o último instar. Essas lagartas foram transferidas para gerbox
91 (6,5 cm de diâmetro × 2,5 cm de altura) com dieta de realimentação (ANEXO 2)

92 a base de farelo de soja e levedura de cana até a formação das pupas. As pupas
93 foram recolhidas dos gerbox e colocadas em potes plásticos transparentes
94 (retangular de 500 mL e $14,2 \times 9,8 \times 4,7$ cm) onde permaneceram até a fase
95 adulta. Os adultos foram sexados e 50 adultos (30 fêmeas e 20 machos) foram
96 colocados em gaiolas de tubos de PVC (10 cm de diâmetro $\times$ 22 de altura),
97 revestidos internamente com folhas de papel sulfite, utilizado como substrato para
98 oviposição dos ovos. Estes tubos foram fechados com folha de papel sulfite e
99 elástico. Os ovos foram coletados diariamente, lavados com solução de sulfato de
100 cobre a 1% e armazenados em sala climatizada à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$,
101 umidade relativa (UR) de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. Os procedimentos
102 utilizados na criação de *D. saccharalis* estão de acordo com a metodologia
103 proposta por Parra (2007) (ANEXO 3).

104

105 Multiplicação de *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae*

106 Populações de *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* foram mantidas
107 separadamente em tubos de vidro (2,5 cm $\times$ 8,5 cm) vedados com algodão e
108 alimentados com gotículas de mel puro. Para manutenção da criação destes
109 parasitoides, pupas de *D. saccharalis* com 24 a 48 horas de idade foram expostas
110 as fêmeas dos parasitoides. As pupas parasitadas foram individualizadas em tubos
111 de vidro e mantidas em câmara climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade
112 relativa e fotofase de 14 horas, até a emergência de adultos (Chichera *et al.* 2012;
113 Costa *et al.* 2014) (ANEXO 3).

114

115 Desenvolvimento Experimental

116 Três pupas de *D. saccharalis*, com biomassa entre 160 e 220 mg (Glaeser
117 2011) e com até 24 horas de idade foram individualizadas e inseridas em 3
118 orifícios pré-perfurados em um colmo (cana-de-açúcar 30 cm) amarrado na
119 planta de cana-de-açúcar (ANEXO 4 A, B). Após a inserção das pupas, foram
120 pulverizadas formulações de bioinseticidas a base de *B. bassiana* e *M. anisopliae*
121 separadamente com um pulverizador costal na concentração de $5,5 \times 10^9$ con. mL⁻¹
122 ¹ (média das recomendações mais utilizada em campo). A touceira de cana foi
123 coberta, individualmente, com uma gaiola de (4,0 × 0,75 × 0,75 metros),
124 confeccionada com tela de “voil”, sendo posteriormente liberadas 102 fêmeas de
125 *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* por pupa com 24 h de idade separadamente
126 (ANEXO 4 C, D). O número de fêmeas parasitoides usadas no experimento de
127 semi campo foi padronizado e o mesmo foi baseado nos estudo de Barbosa *et al.*
128 (2014), que encontrou como sendo a melhor densidade em plantios de cana-de-
129 açúcar para a espécie *T. howardi* em pupas de *D. saccharalis*. O parasitismo foi
130 permitido por quatro dias (96 horas) com a média da temperatura máxima de
131 31,3°C, média da temperatura mínima de 20,5°C e média da umidade relativa de
132 77% nestes dias (Fig. 2) e, após esse período, as pupas foram retiradas dos colmos
133 e levadas ao laboratório e mantidas em câmara climatizada (BOD) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 70
134 $\pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14 horas, até a emergência de adultos
135 para a avaliação da porcentagem de parasitismo. Os tratamentos foram: 1) PeMa
136 (*P. elaeisis* com *M. anisopliae*), 2) PeBb (*P. elaeisis* com *B. bassiana*), 3) Pe (*P.*
137 *elaieisis* parasitismo sem fungo), 4) ThMa (*T. howardi* com *M. anisopliae*), 5)

138 ThBb (*T. howardi* com *B. bassiana*), 6) Th (*T. howardi* parasitismo sem fungo),
139 7) TdMa (*T. diatraeae* com *M. anisopliae*), 8) TdBb (*T. diatraeae* com *B.*
140 *bassiana*), 9) Td (*T. diatraeae* parasitismo sem fungo) e 10) Testemunha do
141 hospedeiro. Cada tratamento foi representado por 5 touceiras com três pupas cada,
142 totalizando 15 pupas (repetições). O delineamento amostral foi DBC
143 (delineamento em blocos ao acaso).

144 A porcentagem de parasitismo (descontando-se a mortalidade natural do
145 hospedeiro), a porcentagem de emergência, o ciclo de vida (tempo de
146 desenvolvimento do parasitoide dentro do hospedeiro), progênie (número de
147 parasitoides emergidos das pupas) e a razão sexual (número total de fêmeas
148 dividido pelo número total da progênie) foram avaliadas. Os dados originais
149 (parasitismo (%)) foram transformados em raiz de $(x + 0,5)$, submetidos à análise
150 de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade,
151 porém para uma melhor visualização dos resultados os dados originais foram
152 mantidos na figura (Fig. 1 A, B, C). As demais características biológicas (a
153 emergência, a duração do ciclo de vida, progênie e a razão sexual) dos
154 parasitoides eulofídeos são apenas apresentadas, pois, os dados foram
155 insuficientes para a condução das análises estatísticas.

156

157 **Resultados**

158

159 A porcentagem de parasitismo realizado pelas fêmeas de *P. elaeisis* foi de
160 14% na testemunha e de 20% nos demais tratamentos. Os parasitismo de *T.*

161 *diatraeae* foi de 13,33% na testemunha, 26,64% no tratamento com *B. bassiana* e
162 13,40% no tratamento com *M. anisopliae*. As fêmeas de *T. howardi* parasitaram
163 14% das pupas nos três tratamentos. No entanto, não foi observada diferença
164 estatística entre os valores da porcentagem de parasitismo entre a testemunha e os
165 tratamentos com *B. bassiana* e *M. anisopliae* para nenhuma das espécies de
166 parasitoides (Fig. 1 A, B, C).

167 Nas pupas parasitadas por *P. elaeisis* não foi observada emergência de
168 parasitoides. No entanto, ocorreu à emergência de adultos de *T. howardi* em 50%
169 das pupas e em 25% das pupas para *T. diatraeae*, ambos no tratamento com *B.*
170 *bassiana* (Tabela 1).

171 As características biológicas dos parasitoides que emergiram do tratamento
172 com *B. bassiana* foram avaliadas, nos demais tratamentos não foi observada
173 emergência. A duração do ciclo de vida de *T. howardi* foi de 18 dias e de *T.*
174 *diatraeae* foi de 19 dias. O número de indivíduos da progênie foi de 190 adultos
175 de *T. howardi*, sendo 172 fêmeas e 18 machos e 270 adultos de *T. diatraeae*,
176 sendo 248 fêmeas e 22 machos. A razão sexual foi de aproximadamente, 0,90 para
177 ambas as espécies de parasitoides (Tabela 1).

178

179 **Discussão**

180

181 O parasitismo de *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* não foi afetado
182 pelos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. No entanto, os
183 valores de parasitismo foram baixos (entre 13 e 26%) e isto pode estar relacionado

184 à fatores abióticos como temperatura, radiação solar e chuvas (Elzen *et al.* 1987;
185 Dinardo-Miranda *et al.* 2014) e bióticos como a idade do parasitoide (Oliveira *et*
186 *al.* 2012), o número de fêmeas liberadas por hospedeiro (Sampaio *et al.* 2001) e a
187 capacidade deste inimigo natural localizar este hospedeiro. Além disso, a
188 densidade de fêmeas de parasitoides por hospedeiro utilizada neste experimento
189 pode não ter sido adequada e as características biológicas dos parasitoides
190 também pode ter influenciado nestes resultados. Esse fato foi comprovado e
191 autores sugerem que a densidade inadequada de parasitoides por hospedeiro pode
192 afetar a progênie (Foerster *et al.* 2001; Chong e Oetting 2006), razão sexual da
193 progênie (Choi *et al.* 2001), duração do ciclo de vida (ovo-adulto) (Barbosa *et al.*
194 2008, 2010), longevidade de adultos (Silva-Torres e Matthews 2003), bem como
195 a capacidade de busca e a dispersão dos inimigos naturais em agroecossistemas
196 (Barbosa 2014).

197 A emergência dos parasitoides *T. howardi* e *T. diatraeae* das pupas de *D.*
198 *saccharalis* em touceiras de cana-de-açúcar tratadas com *B. bassiana* sugere que
199 não foi os fungos entomopatogênicos que diminuiu o parasitismo e o
200 desenvolvimento desses eulofídeos. Sendo importante ressaltar que o sistema
201 imunológico do hospedeiro pode ter encapsulado os ovos dos parasitoides e
202 impedido o desenvolvimento dos imaturos do inimigo natural. Além disso,
203 acreditamos que o fato do número de fêmeas parasitoides por hospedeiro ter sido
204 menor que o necessário pode ter influenciado no menor parasitismo e emergência
205 dos parasitoides eulofídeos, pois a injeção inadequada de toxinas liberadas pelas
206 fêmeas parasitoides no momento da oviposição pode não ter sido suficiente para

207 neutralizar as defesas imunológicas do hospedeiro (Schmid-Hempel 2005; Pastori
208 *et al.* 2012).

209 *Palmistichus elaeisis* foi o único parasitoide que não obteve emergência de
210 progênie das pupas de *D. saccharalis* em nenhum dos tratamentos. Ele é um
211 parasitoide preferencialmente de lepidópteros desfolhadores e foi registrado em
212 pupas de *Thyrintina arnobia* (Stoll) (Lepidoptera: Geometridae) na cidade de
213 Viçosa (MG) (Pereira *et al.* 2008a; Rodrigues *et al.* 2013), onde a média das
214 temperaturas anuais são menores que as registradas em Dourados (MS), o que
215 pode ter influenciado na emergência desse inimigo natural. Além disso, apesar de
216 trabalhos conduzidos em laboratório demonstrarem a capacidade deste inimigo
217 natural parasitar e emergir das pupas de *D. saccharalis* (Bittencourt e Berti Filho
218 1999, 2004; Chichera *et al.* 2012), não existem informações de estudos que
219 atestem o parasitismo e o desenvolvimento de *P. elaeisis* neste lepidóptero em
220 condições de campo, o que pode justificar a baixa porcentagem de parasitismo e a
221 falta de emergência nas pupas parasitadas pelo eulofídeo.

222 As demais características avaliadas como ciclo de vida, progênie e razão
223 sexual apresentou valores semelhantes aqueles encontrados em trabalhos
224 realizados em laboratório com *T. howardi* e *T. diatraeae* em pupas de *D.*
225 *saccharalis* (Costa *et al.* 2014; Vargas *et al.* 2014; Rossoni *et al.* 2016), indicando
226 que os fungos não influenciaram o desenvolvimento dos parasitoides. Este fato
227 pode estar relacionado à maior aclimação desses inimigos naturais para as
228 condições de campo. O parasitoide *T. howardi* foi registrado em Dourados (MS)
229 (Vargas *et al.* 2011) e o inimigo natural *T. diatraeae* apresenta distribuição

230 cosmopolita, encontrado em várias localidades do Brasil (Pereira *et al.* 2008b;
231 Melo *et al.* 2011; Zaché *et al.* 2011, 2012).

232 As menores taxas de parasitismo, nas condições de campo, registradas com
233 as três espécies quando comparadas com as obtidas em laboratório podem ter
234 relação com os fatores abióticos como o vento, a chuva, a baixa umidade relativa
235 do ar e alta temperatura que podem afetar o voo dos parasitoides, os níveis de
236 parasitismo e a longevidade (Li *et al.* 2006; Chapman *et al.* 2009). Além disso,
237 outro fato que influenciou os resultados desse experimento foi a elevada taxa de
238 predação das pupas de *D. saccharalis* durante o experimento de campo, o que
239 pode ter reduzido a concentração de cairomônios emitidos por estas pupas e
240 influenciado a percepção do número de hospedeiros à disposição, dificultando a
241 localização deles e o parasitismo (Pastori *et al.* 2013).

242 Os resultados demonstraram que os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*
243 na concentração de $5,5 \times 10^9$ con. mL⁻¹ não prejudicaram o parasitismo de *D.*
244 *saccharalis* por *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae*, pois os valores desta
245 característica biológica não variaram quando comparado a testemunha, sendo
246 assim, existe compatibilidade entre esses agentes biológicos fato que foi
247 comprovado em trabalhos de laboratório (Rossoni *et al.* 2016). Trabalhos de
248 compatibilidade entre agentes de controle biológico constituem-se como uma
249 etapa importante quando se pretende estabelecer um programa de controle de
250 pragas dentro de uma cultura, como estes três eulofídeos estão sendo estudados
251 para controle da broca da cana *D. saccharalis*, os resultados são relevantes para o
252 uso e/ou aprimoramento do programa de controle biológico da broca da cana.

Conclusão

Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* na concentração de $5,5 \times 10^9$ con. mL⁻¹ não prejudicaram o parasitismo de pupas de *D. saccharalis* pelos parasitoides *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae*, sendo assim, estes agentes de controle biológico podem ser usados simultaneamente em cultivos de cana-de-açúcar.

Agradecimentos

As instituições brasileiras Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento de projeto aprovado no Edital / Chamada Universal 14/2012 - Faixa A (processo CNPq número 482174/2012-9).

Referências

Almeida, J.E.M., Batista Filho, A., e Da Costa, E.A.D. 2007. Efeito de adjuvantes em associação com Thiamethoxam 250 WG e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). Arquivos do Instituto Biológico, **74**: 135-140.

- 276 Alves, S.B. Fungos entomopatogênicos. 1998. *In* Controle microbiano de insetos.
277 *Edited by* Alves S.B. FEALQ, Piracicaba, Brasil. Pp. 289-381.
- 278 Barbosa, L.S., Couri, M.S., e Coelho, V.M.A. 2008. Desenvolvimento de *Nasonia*
279 *vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas de
280 *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae),
281 utilizando diferentes densidades do parasitoide. *Biota Neotropica*, **8**: 49-
282 54.
- 283 Barbosa, L.S., Couri, M.S., e Coelho, V.M.A. 2010. Desempenho do parasitoide
284 *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) utilizando
285 como hospedeiro *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera:
286 Calliphoridae), sob diferentes tempos de exposição. *Revista Brasileira de*
287 *Entomologia*, **54**: 125-129.
- 288 Barbosa, R.H., Kassab, S.O., Fonseca, P.R.B., Rossoni, C., e Silva, A.S. 2011.
289 Associação de *Metarhizium anisopliae* (Hyp.: Clavicipitaceae) e
290 thiamethoxam para o controle da cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar.
291 *Ensaios e Ciência*, **15**: 41-51.
- 292 Barbosa, R.H. 2014. Capacidade de dispersão e parasitismo de *Tetrastichus*
293 *howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Diatraea saccharalis*
294 (Lepidoptera: Crambidae) na cultura da cana-de-açúcar. Dissertação
295 (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade),
296 Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do
297 Sul, Brasil. 52f.

- 298 Bittencourt, M.A.L. e Berti Filho, E. 1999. Preferência de *Palmistichus elaeisis*
299 por pupas de diferentes lepidópteros pragas. Scientia Agricola, **56**: 1281-
300 1283.
- 301 Bittencourt, M.A.L. e Berti Filho, E. 2004. Exigências térmicas para o
302 desenvolvimento de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera, Eulophidae) em
303 pupas de cinco espécies de lepidópteros. Iheringia. Série Zoologia, **94**:
304 321-323.
- 305 Borgio, J.F. e Bency, B.J. 2011. Production and quality control of
306 entomopathogenic fungal pathogens – a review. Research & Reviews: A
307 Journal of Microbiology & Virology, **1**: 5-18.
- 308 Chapman, A.V., Kuhar, T.P., Schultz, P.B., e Brewster, C.C. 2009. Dispersal of
309 *Trichogramma ostrinae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in potato
310 fields. Environmental Entomology, **38**: 677-695.
- 311 Chichera, R.A., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Barbosa, R.H., Pastori, P.L., e
312 Rossoni, C. 2012. Capacidade de busca e reprodução de *Trichospilus*
313 *diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de
314 *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Interciência, **37**: 852-856.
- 315 Choi, W.I., Yoon, T.J., e Ryoo, M.I. 2001. Host-size dependent feeding behaviour
316 and progeny sex ratio of *Anisopteromalus calandrae* (Hym.:
317 Pteromalidae). Journal Applied Entomology, **125**: 71-77.
- 318 Chong, J.H. e Oetting, R.D. 2006. Functional response and progeny production of
319 the Madeira mealybug parasitoid, *Anagyrus* sp. nov. nr. sinope: The effects
320 of host and parasitoid densities. Biological Control, **39**: 320-328.

- 321 Conceição, L.L. e Silva, C.M. 2011. O controle biológico e suas aplicações na
322 cultura de cana-de-açúcar. *Campo Digital*, **6**: 14-25.
- 323 Costa, D.P., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Rossoni, C., Favero, K., e Barbosa, R.H.
324 2014. Reprodução de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae)
325 em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) de diferentes
326 idades. *Revista de Ciências Agrárias / Amazonian Journal of Agricultural
327 and Environmental Sciences*, **57**: 67-71.
- 328 Cruz, I., Redoan, A.C., Silva, R.B., Figueiredo, M.L.C., e Penteado-Dias, A.M.
329 2011. New record of *Tetrastichus howardi* (Olliff) as a parasitoid of
330 *Diatraea saccharalis* (Fabr.) on maize. *Scientia Agricola*, **68**: 252-254.
- 331 Destéfano, R.H.R., Destéfano, S.A.L., e Messias, C.L. 2004. Detection of
332 *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer
333 *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers.
334 *Genetics and Molecular Biology*, **27**: 245-252.
- 335 Dinardo-Miranda, L.L., Figueiredo, P., Landell, M.G.A., Ferreira, J.M.G., e
336 Carvalho, P.A.M. 1999. Estimativa de danos causados pelas cigarrinhas
337 das raízes (*Mahanarva fimbriolata*) a diversos genótipos de cana-de-
338 açúcar. *STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos*, **17**: 48-52.
- 339 Dinardo-Miranda, L.L., Nakamura, G., Zotarelli, L., Braz, B.A., e Euzébio, O.
340 2003. Viabilidade técnica e econômica de Actara 250 WG, aplicado em
341 diversas doses, no controle de cigarrinha-das-raízes. *STAB: Açúcar,
342 Álcool e Subprodutos*, **22**: 39-43.

- 343 Dinardo-Miranda, L.L. e Gil, M.A. 2007. Estimativa do nível de dano econômico
344 de *Mahanarva fimbriolata* (Stål)(Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-
345 açúcar. *Bragantia*, **66**: 81-88.
- 346 Dinardo-Miranda, L.L., Fracasso, J.V., Costa, V.P., e Lopes, D.O.T. 2014.
347 Dispersal of *Cotesia flavipes* in sugarcane field and implications for
348 parasitoid releases. *Bragantia*, **73**: 163-170.
- 349 Elzen, G.W., Williams, H.J., Vinson, S.B., e Powell, J.E. 1987. Comparative light
350 behavior of parasitoids *Campoletis sonorensis* and *Microplitis croceipes*.
351 *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **45**: 175-180.
- 352 Foerster, L.A., Doetzer, A.K., e Avanci, M.R.F. 2001. Parasitoides larvais de
353 *Mythimna (Pseudaletia) sequax* Franclemont e capacidade de parasitismo
354 de *Glyptapanteles muesebecki* (Blanchard) em relação ao tempo de
355 exposição, temperatura e densidade de hospedeiros. *Acta Biologica*
356 *Paranaense*, **30**: 139-149.
- 357 Fuentes-Contreras, E. e Niemeyer, H. M. 2000. Effect of wheat resistance, the
358 parasitoid *Aphidius rhopalosiphi*, and the entomopathogenic fungus
359 *Pandora neoaphidis*, on population dynamics of the cereal aphid *Sitobion*
360 *avenae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **97**: 109-114.
- 361 Gallo, D., Nakano, O., e Silveira Neto, S. 2002. *Entomologia agrícola*. FEALQ,
362 Piracicaba, Brasil.
- 363 Glaeser, D.F. 2011. Características biológicas e comportamentais de *Trichospilus*
364 *diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) criado em pupa de *Diatraea*
365 *saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Tese (Doutorado em Agronomia) –

- 366 Universidade federal da grande dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul,
367 Brasil. 89f.
- 368 Kassab, S.O., Loureiro, E.S., Fonseca, P.R.B., Barbosa, R.H., Mota, T.A., e
369 Rossoni, C. 2012a. *Metarhizium anisopliae* no controle da cigarrinha-da-
370 raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera:
371 Cercopidae). Global Science and Technology, 5: 98–106.
- 372 Kassab, S.O., Loureiro, E.S., Barbosa, R.H., Fonseca, P.R.B., Mota, T.A., e
373 Rossoni, C. 2012b. Alteração no método de amostragem de *Mahanarva*
374 *fimbriolata* (Stål, 1854) (Hem.: Cercopidae) e avaliação da eficiência de
375 *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 (Hyp.:
376 Clavicipitaceae). Arquivos do Instituto Biológico, 79: 621-625.
- 377 Li, J., Yan, F., Coudron, T.A., Pan, W., Zhang, X., Liu, X., e Zhang, Q. 2006.
378 Field release of the parasitoid *Microplitis mediator* (Hymenoptera:
379 Braconidae) for control *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in
380 cotton fields in Northwestern China's Xinjiang Province. Environmental
381 Entomology, 35: 694-699.
- 382 Melo, R.L., Pratissoli, D., Polanczyk, R.A., Tavares, M., Milanez, A.M., e Melo,
383 D.F. 2011. Ocorrência de *Trichospilus diatraeae* (Hym.: Eulophidae) em
384 broca-das-cucurbitáceas, no Brasil. Horticultura Brasileira, 29: 228-230.
- 385 Oliveira, M.A.P. de, Marques, E.J., Teixeira, V.W., e Barros, R. 2008. Efeito de
386 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)
387 Sorok. sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F.
388 (Lepidoptera: Crambidae). Acta Scientiarum: Agronomy, 30: 220-224.

- 389 Oliveira, H.N., Bellon, P.P., e Santana, D.R.S. 2012. Critérios para determinação
390 da idade ideal de liberação de *Cotesia flavipes*. Cadernos de Agroecologia,
391 7: 60-64.
- 392 Parra, J.R.P. 2007. Técnicas de criação de insetos para programa de controle
393 biológico. 6ª edição. Editora Esalq/FEALQ, Piracicaba, Brasil.
- 394 Pastori, P.L., Pereira, F.F., Zanuncio, J.C., Oliveira, H.N., Calado, V.F.R., e Silva,
395 R.O. 2012. Densidade de fêmeas de *Palmistichus elaeisis* Delvare &
396 Lasalle, 1993 (Hymenoptera: Eulophidae) para sua reprodução em pupas
397 de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae).
398 Arquivos do Instituto Biológico, **79**: 525-532.
- 399 Pastori, P.L., Pereira, F.F., Pratissoli, D., Zanuncio, J.C., Oliveira, F.A.L., e
400 Zaidan, U.R. 2013. Dispersão de *Trichospilus diatraeae* Cherian &
401 Margabandhu (Hymenoptera: Eulophidae) em plantio de cana-de-açúcar.
402 Agrária - Revista Brasileira de Ciências Agrárias, **8**: 85-89.
- 403 Pereira, F.F., Zanuncio, T.V., Zanuncio, J.C., Pratissoli, D., e Tavares, M.T.
404 2008a. Species of Lepidoptera defoliators of eucalypt as new hosts for the
405 polyphagous parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae).
406 Brazilian Archives of Biology and Technology, **51**: 259-262.
- 407 Pereira, F.F., Zanuncio, J.C., Tavares, M.T., Pastori, P.L., e Jacques, G.C. 2008b.
408 Record of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) as parasitoid
409 of the eucalypt defoliator *Thyrintina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae)
410 in Brazil. Phytoparasitica, **36**: 304-306.

- 411 Pereira, F.F., Kassab, S.O., Vargas, E.L., Calado, V.R.F., Oliveira, H.N., e
412 Zanuncio, J.C. 2015. Parasitism and emergence of *Tetrastichus howardi*
413 (Hymenoptera: Eulophidae) on the caterpillars, pupae and adults of
414 *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). The Florida
415 Entomologist, **95**: 384-387.
- 416 Rodrigues, M.A.T., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Pastori, P.L., Glaeser, D.F.,
417 Oliveira, H.N., e Zanuncio, J.C. 2013. Thermal requirements and
418 generation estimates of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae)
419 in sugarcane producing regions of Brasil. Florida Entomologist, **96**: 154-
420 159.
- 421 Rossoni, C., Loureiro, E.S., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Costa, D.P., e Barbosa,
422 R.H. 2014a. Selectivity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*
423 (Hypocreales: Clavicipitaceae) on adults of *Cotesia flavipes*
424 (Hymenoptera: Braconidae). Folia Biologica (Kraków), **62**: 269-275.
- 425 Rossoni, C., Kassab, S.O., Loureiro, E.S., Pereira, F.F., Costa, D.P., Barbosa,
426 R.H., e Zanuncio, J.C. 2014b. *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria*
427 *bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) are compatible with *Cotesia*
428 *flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). Florida Entomologist, **97**: 1794-
429 1804.
- 430 Rossoni, C., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Rodrigues, A., Barbosa, R.H., e
431 Zanuncio, J.C. 2016. Development of Eulophidae (Hymenoptera)
432 parasitoids in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) pupae

- 433 exposed to entomopathogenic fungi. Canadian Entomologist, **00**: 1-8
434 (*First-view*).
- 435 Roy, H.E. e Cottrell, E. 2008. Forgotten natural enemies: Interactions between
436 coccinellids and insect-parasitic fungi. European Journal of Entomology,
437 **105**: 391-398.
- 438 Sampaio, M.V., Bueno, V.H.P., e Pérez-Maluf, R. 2001. Parasitismo de *Aphidius*
439 *colemanni* Viereck (Hymenoptera: Aphidiidae) em diferentes densidades de
440 *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Neotropical
441 Entomology, **30**: 81-87.
- 442 Schmid-Hempel, P. 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses.
443 Annual Review of Entomology, **50**: 529-551.
- 444 Silva-Torres, C.S.A. da. e Matthews, R.W. 2003. Development of *Melittobia*
445 *australica* Girault and *M. digitata* Dahms (Parker) (Hymenoptera:
446 Eulophidae) parasiting *Neobellieria bullata* (Parker) (Diptera:
447 Sarcophagidae) puparia. Neotropical Entomology, **32**: 645-651.
- 448 Stolz, I., Nagel, P., Lomer, C., e Peveling, R. 2002. Susceptibility of the
449 hymenopteran parasitoids *Apoanagyrus* (=Epidinocarsis) *lopezi*
450 (Encyrtidae) and *Phanerotoma* sp. (Braconidae) to the entomopathogenic
451 fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Deuteromycotina:
452 Hyphomycetes). Biocontrol Science and Technology, **12**: 349-360.
- 453 Van Driesche, R.G. e Bellows, T. S. 1996. Biological control. Springer,
454 Massachusetts, Estados Unidos da America.

- 455 Vargas, E.L., Pereira, F.F., Tavares, M.T., e Pastori, P.L. 2011. Record of
456 *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Diatraea*
457 sp. (Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane crop in Brazil. Entomotropica,
458 **26**: 135-138.
- 459 Vargas, E.L., Pereira, F.F., Calado, V.R.F., Glaeser, D.F., Rodrigues, B.A.C., e
460 Silva, N.V. 2014. Densidade de fêmeas de *Trichospilus diatraeae*
461 (Hymenoptera: Eulophidae) por pupa de *Diatraea saccharalis*
462 (Lepidoptera: Crambidae). Sitientibus série Ciências Biológicas, **13**: 1-7.
- 463 Wenzel, I.M., Giometti, F.H.C., e Almeida, J.E.M. 2006. Patogenicidade do
464 isolado IBCB 66 de *Beauveria bassiana* à broca da cana-de-açúcar
465 *Diatraea saccharalis* em condições de laboratório. Arquivos do Instituto
466 Biológico, **73**: 259-261.
- 467 Williams, T., Arredondo-Bernal, H., e Rodriguez-Del-Bosque, L.A. 2013.
468 Biological pest control in Mexico. Annual Review of Entomology, **58**:
469 119-140.
- 470 Zaché, B., Zaché, R.R.C., Souza, N.M., Dias, T.K.R., e Wilcken, C.F. 2011. New
471 record of *Trichospilus diatraeae* margabandhu & cherian, 1942
472 (hymenoptera: eulophidae) parasitizing *Sarsina violascens* (herrich-
473 schaeffer, 1856) (lepidoptera: lymantriidae) in brazil. Journal of Plant
474 Protection Research, **51**: 420-422.
- 475 Zaché, B., Wilcken, C.F., Zaché, R.R.C., e Souza, N.M. 2012. Novo registro de
476 *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera:

477 Eulophidae), como parasitóide de *Spodoptera cosmioides* Walker, 1858
478 (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. Biota Neotropica, **12**: 319-322.

479 Zappelini, L.O., Almeida, J.E.M., Batista Filho, A., e Giometti, F.H.C. 2010.
480 Seleção de isolados do fungo entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae*
481 (Metsch.) Sorok. visando o controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea*
482 *saccharalis* (Fabr., 1794). Arquivos do Instituto Biológico, **77**: 75-82.

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

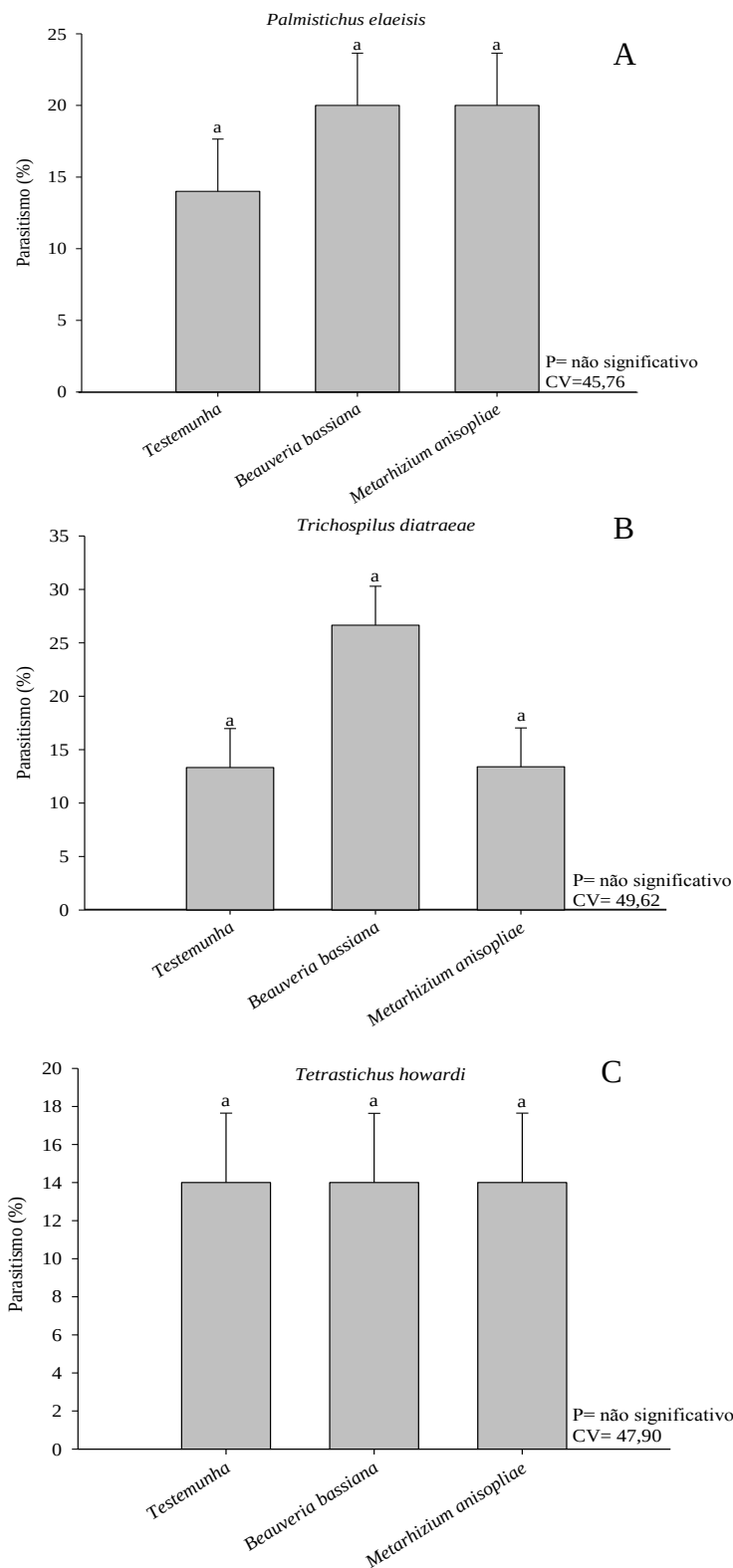


Figura 1. Porcentagem de parasitismo dos eulofídeos em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) com exposição a fungos entomopatogênicos em cana-de-açúcar. Dourados/MS, 2014.

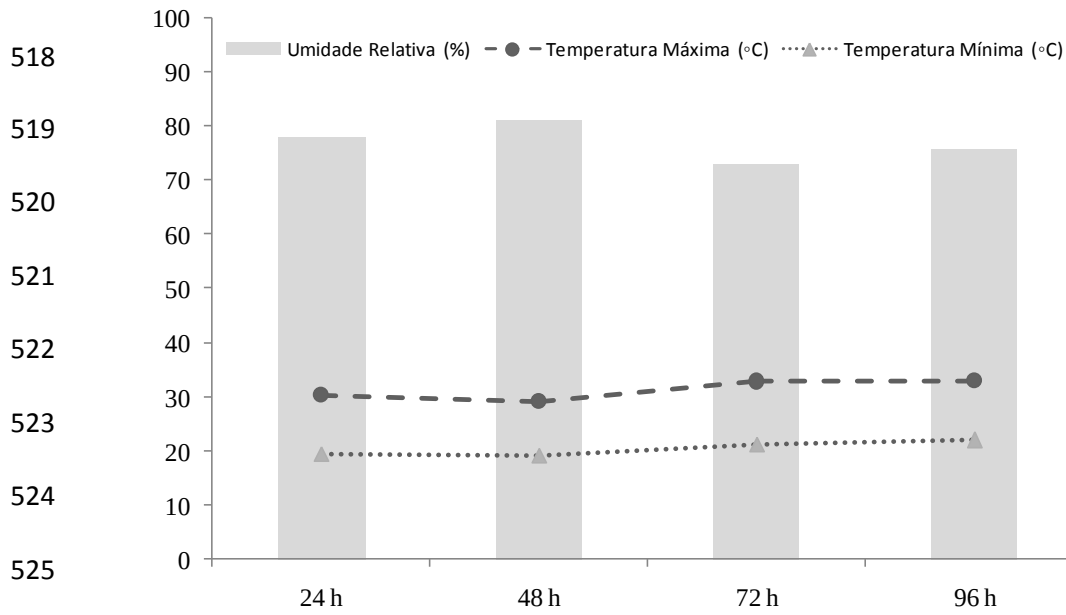


Figura 2. Umidade relativa (%), Temperatura mínima (°C) e Temperatura máxima (°C) registradas durante o desenvolvimento do experimento. Fonte: Estação meteorológica da Embrapa Agropecuária Oeste. Dourados/MS, 2014.

Tabela 1. Aspectos biológicos dos parasitoides eulofídeos emergidos de pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) expostas a *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) em cana-de-açúcar.

Características biológicas	<i>P. elaeisis</i>	<i>T. diatraeae</i> <i>B. bassiana</i> ($5,5 \times 10^9$ con. mL ⁻¹)	(n)	<i>T. howardi</i> <i>B. bassiana</i> ($5,5 \times 10^9$ con. mL ⁻¹)	(n)
Emergência (%)	-	25		50	
Ciclo de vida (dias)	-	19		18	
Progenie (indivíduos)	-	270	1	190	1
Fêmeas (indivíduos)	-	248		172	
Machos (indivíduos)	-	22		18	
Razão Sexual (0,00 - 1,00)	-	0,92		0,90	

(n) – corresponde a número de pupas parasitadas com emergência em cada tratamento.

CONCLUSÕES GERAIS

Os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* reduziram a longevidade de fêmeas de *P. elaeisis* e *T. diatraeae* com maior mortalidade para a espécie *T. howardi*. No entanto, isto não comprometeu o parasitismo e a emergência destes eulofídeos em pupas de *D. saccharalis*.

A exposição das pupas de *D. saccharalis* parasitadas por *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* a estes entomopatógenos não comprometeram o desenvolvimento desses parasitoides e permitiu a emergência, duração do ciclo de vida, progênie, razão sexual e longevidade destes inimigos naturais.

Beauveria bassiana e *M. anisopliae* na concentração de $5,5 \times 10^9$ con. mL⁻¹ não prejudicaram o parasitismo de pupas *D. saccharalis* pelos parasitoides *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* em plantios de cana-de-açúcar.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição dos parasitoides eulofídeos aos fungos entomopatogênicos não compromete a localização do hospedeiro pelo parasitoide e o reconhecimento prévio do hospedeiro como ideal, etapas que esse inimigo natural realiza antes de parasitar seu hospedeiro. Isto é importante, pois, em condições de campo, o parasitismo por si só é suficiente para impedir a continuação do ciclo de vida de *D. saccharalis*, o que pode contribuir significativamente para a diminuição da densidade populacional dessa praga.

O contato de pupas parasitadas por *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* com os fungos entomopatogênicos não comprometeu o desenvolvimento e as características biológicas desses inimigos naturais, o que é importante, pois, em condições de campo pode ocorrer o contato dos entomopatógenos com pupas parasitadas por esses parasitoides. Como as características (a emergência, duração do ciclo de vida, progênie e razão sexual) têm correlação com a qualidade biológica de parasitoides, acreditamos que esses inimigos naturais são compatíveis com os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

Os resultados obtidos, nesse trabalho, incrementam o conhecimento relacionado ao controle biológico de *D. saccharalis* em cana-de-açúcar. Além disso, a maior contribuição, desse estudo, é a possibilidade da associação dos parasitoides eulofídeos com os bioinseticidas a base de *M. anisopliae* e *B. bassiana* para o manejo das populações da broca em canaviais, pois evidenciamos que em laboratório e semi campo o contato desses dois agentes biológicos não prejudica a eficiência dos parasitoides.

ANEXOS

ANEXO 1. Dieta artificial de alimentação modificada de Parra (2007) para a criação de lagartas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae).

Ingredientes	Quantidade*	Finalidade
Farelo de soja	300 g	Proteína
Germe de trigo	150 g	Proteína
Levedura de cana	225 g	Proteína
Açúcar	205 g	Carboidrato
Nipagin	15 g	Conservante
Ácido ascórbico	8 g	Vitamina
Cloreto de colina	2 g	Vitamina
Sais de wesson	15 g	Sais minerais
Caragenato	65 g	Espessante
Vita gold	3 mL	Solução vitamínica
Solução vitamínica	40 mL	Solução vitamínica
Formol	6 mL	Anticontaminante
Tetraciclina	1 comprimido	Anticontaminante
Wintomylon	1 comprimido	Anticontaminante
Água destilada	3,8 L	Solvente

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

Fonte: Tese de Doutorado em Agronomia, Costa D.P. 2013.

ANEXO 2. Dieta artificial de realimentação modificada de Parra (2007) para a criação de lagartas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae).

Ingredientes	Quantidade*	Finalidade
Farelo de soja	540 g	Proteína
Levedura de cana	400 g	Proteína
Açúcar	360 g	Carboidrato
Nipagin	40 g	Conservante
Ácido ascórbico	8 g	Vitamina
Cloreto de colina	8 g	Vitamina
Caragenato	150 g	Espessante
Vita gold	7 mL	Solução vitamínica
Solução vitamínica	40 mL	Solução vitamínica
Ácido acético	65 mL	Anticontaminate
Formol	14 mL	Anticontaminante
Tetraciclina	1 comprimido	Anticontaminante
Wintomylon	1 comprimido	Anticontaminante
Água destilada	6,4 L	Solvente

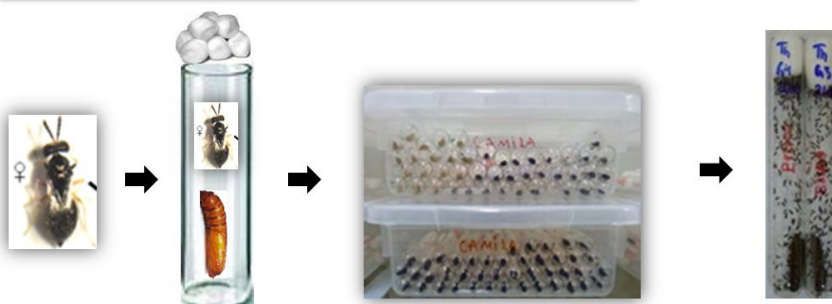
* Quantidade de ingredientes para 7 bandejas (capacidade de 1000 mL)

Fonte: Tese de Doutorado em Agronomia, Costa D.P. 2013.

Diatraea saccharalis (Lepidoptera: Crambidae)



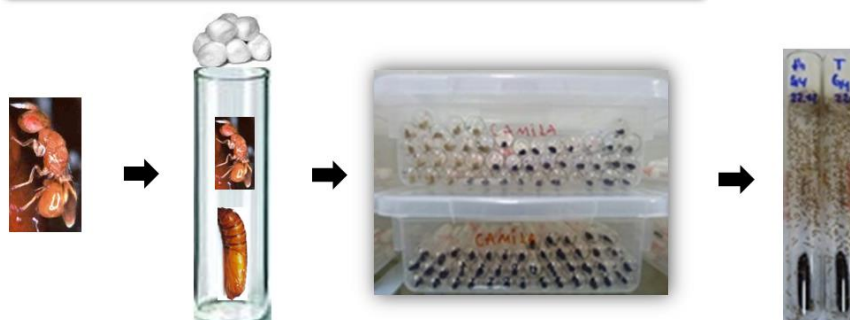
Tetrastichus howardi (Hymenoptera: Eulophidae)



Palmistichus elaeisis (Hymenoptera: Eulophidae)



Trichospilus diatraeae (Hymenoptera: Eulophidae)



ANEXO 3. Multiplicação do hospedeiro *D. saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) e dos parasitoides *P. elaeisis*, *T. howardi* e *T. diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae).



ANEXO 4. Experimento semi campo “Interações de *Beauveria bassiana* (Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Clavicipitaceae) com parasitoides eulofídeos (Hymenoptera) em plantas de cana-de-açúcar”. Dourados/MS, 2014. (A – Colmo perfurado para inserção das pupas; B – Unidade de parasitismo e liberação, na planta de cana-de-açúcar; C e D – Gaiola de tecido “voil” cobrindo a planta de cana-de-açúcar).

ANEXO 5. Normas do periódico “The Canadian Entomologist”, escolhido para a possível publicação dos artigos da Tese.

The Canadian Entomologist

Instructions to authors

General

Articles for publication in The Canadian Entomologist are accepted in either English or French. Manuscripts from all disciplines of entomology will be considered, unless they have been submitted for prior or simultaneous publication elsewhere. Manuscripts must contain significant new findings of fundamental and (or) general entomological interest. Low priority is given to confirmatory studies, such as investigations of local interest, techniques (unless of broad application), range extensions, and new records. Authors should deposit voucher specimens, documenting the identity of the organisms studied, in recognised institutions and to note these repositories in their papers. Information on voucher specimens is available at: <http://www.biology.ualberta.ca/bsc/briefs/brvouchers.htm>.

Types of paper

Reviews (10–15 printed pages) should deal with topics of general interest or current importance, and should be synthetic rather than comprehensive in emphasis. Reviews will be solicited by the Editor-in-Chief. Proposal for unsolicited reviews should be emailed to the Editor-in-Chief and will be considered following the procedure detailed here: <http://www.esc-sec.ca/canent/review-articles.pdf>.

Articles should report the results of original observations or research in any aspect of entomology. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. Non-analytical items such as lists of specimens or bibliographies will normally not be considered.

Notes (1–3 printed pages) are concise but complete descriptions of an investigation, limited in scope, that will not be included in a later paper; therefore, they may not be used for publishing preliminary data. They should be as completely documented as a standard paper, both by reference to the literature and

by description of the experimental procedures employed. An abstract is required, but other usual subheadings, such as Introduction, Discussion, etc., should not be included.

Forum (3–6 printed pages) articles should be short, providing a chance for suggesting hypotheses, challenging current thinking on issues, discussing new ideas or ways of interpreting existing information, or responding to forums previously published in *The Canadian Entomologist*.

Submission of manuscripts for review

Manuscripts should be submitted using the ScholarOne Manuscripts system, found at the following web-site address: <http://mc.manuscriptcentral.com/tce>. Manuscripts should be prepared as a Microsoft Word document in advance of logging on and uploading to the ScholarOne Manuscripts system. For peer-review purposes, Figures may be embedded in the document following the list of figure captions, or Figures can be uploaded separately. Figures in a Word document should be inserted as JPEG (JPG) or GIF files. Do not insert uncompressed files (e.g., BMP, TIFF) and do not “cut” the images from other applications and “paste” them into the document, as this can result in an excessively large file. Reduced resolution is recommended for the review process. All text should use True Type fonts. Please contact the Editor-in-Chief if you are unable to submit a manuscript using ScholarOne Manuscripts.

Copyright transfer

Before an accepted manuscript can be published, all authors are required to complete and sign a “Journal Transfer of Copyright” form assigning all rights to the Entomological Society of Canada:

http://journals.cambridge.org/images/fileUpload/documents/TCE_ctf.pdf.

Letters of permission for any “personal communication” cited by the authors must also be emailed to the Editor-in-Chief prior to final manuscript acceptance. These must state clearly that the originator of the personal

communication has read the text, agrees with its wording, and gives permission to cite it.

Open Access

Authors also have the option to publish their manuscripts via Open Access. The Open Access Copyright Transfer form can be accessed here: http://journals.cambridge.org/images/fileUpload/documents/TCE_ctf_oa.pdf.

Peer review / evaluation

In the ScholarOne Manuscripts system, authors are asked to suggest appropriate reviewers; this is strongly encouraged to help with the review process. Each submission is assigned by the Editor-in-Chief, based on its topic, to a Subject Editor, who is responsible for the peer-review process of the article. Authors may indicate a preferred Subject Editor during the submission process. The Subject Editor selects at least two reviewers and does not disclose their names unless explicitly authorised to do so by the reviewer. Information on the status of a submission can be checked directly by the authors through the ScholarOne Manuscripts system or by contacting the Editor-in-Chief. Depending on the reviewers' reports, a manuscript will be returned to the author(s) for revision or considered unsuitable.

Submission of accepted manuscripts

Accepted manuscripts are uploaded to ScholarOne Manuscripts and continue to production directly from the ScholarOne Manuscripts system. Formatting must be in the manner indicated below. Specific details for final figure preparation are in the section 'Illustrations for accepted manuscripts'.

Cambridge Journals Language Editing Service

Cambridge recommends that authors have their manuscripts checked by an English language native speaker before submission; this will ensure that submissions are judged at peer review exclusively on academic merit. We list a

number of third-party services specialising in language editing and / or translation, and suggest that authors contact as appropriate. Use of any of these services is voluntary, and at the author's own expense.
<http://journals.cambridge.org/action/stream?pageId=8728&level=2&menu=Authors&pageId=3608>

Manuscript format

General

Manuscripts that do not conform to the requirements outlined below will be returned to the author(s) for modification. The Editor-in-Chief will assess the English/French language quality and substandard papers will be returned to authors. Manuscripts should be double-spaced throughout (including footnotes, captions, synonymies, and reference lists), should contain only 12-point font, and all margins should be at least 35 mm. The first page of the manuscript should have only the title and the authors' names, affiliations, telephone numbers, and email addresses. Each page of the manuscript should have the first author's name and the page number in the upper right-hand corner. Pages should be numbered sequentially to the very last page, including pages with tables, figures, and appendices. Line numbers are requested, and should be numbered sequentially from page 2 (Abstract). Spelling of English words should conform to the usage recommended in the Oxford English Dictionary. Canadian/British spellings should be used (e.g., labelled not labeled, acknowledgements not acknowledgments, colour not color, minimised not minimized, etc.). Use The Torre-Bueno Glossary of Entomology (1989 or later) as a reference for definitions of entomological terms. Dates in the text should be written as 1 April 1991, 28 June 2003, etc. Dates in Type material or Material examined sections of taxonomic papers should be written 1.iv.1991, 28.vi.2003, etc., except when in quotes. In the text, figures are cited as "(Fig. 1)", "(Figs. 1–5)", etc. Footnotes should be kept to an absolute minimum. Where essential, they should be typed at the bottom of the page to which they refer and separated from the text by a line.

All genus-level and species-level taxa should include scientific authorities when mentioned first in the abstract and in the body of the text (but not in the title). For arthropods they should be followed by the order and family placement (e.g., “the genus *Strobilomyia* Michelsen (Diptera: Anthomyiidae), including *Strobilomyia varia* (Huckett)”), whereas for plants they should be followed only by family placement (e.g., “*Quercus velutina* Lamarck (Fagaceae)”). The Missouri Botanical Garden Tropicos website should be used as an authority file for plant names: <http://www.tropicos.org/>. When using common names for insects, the official Entomological Society of Canada list (Common Names of Insects in Canada, available from <http://www.esc-sec.ca/ee/index.php/cndb>) should be followed.

Abbreviations and symbols for words, phrases, and terms are in general those recommended in *Scientific Style and Format: The CBE Style Manual for Authors, Editors, and Publishers*, Sixth Edition (1994) (Council of Biology Editors, Inc., Chicago, Illinois 60603, United States of America). The *Système international d’unités* (SI) for measurements and weights should be used. This system is explained and other useful information is given in the *Metric Practice Guide* (2000), published by the Canadian Standards Association (178 Rexdale Boulevard, Toronto, Ontario, Canada M9W 1R3).

Taxonomic papers must conform to requirements of the *International Code of Zoological Nomenclature*:

<http://www.nhm.ac.uk/hosted-sites/iczn/code/>. Authors are urged to regroup pertinent information on newly described or revised taxa under the following main sections (if applicable), which preferably should be introduced in the order given here: Synonyms, Type material or Material examined, Diagnosis, Description, Variation, Etymology, Natural history, Hosts and distribution, and Discussion (Comments or Remarks). When describing a new taxon (species or genus), authors are to place the taxon in proper context by providing a key or a modified couplet of an existing key, where possible. Single species descriptions, without significant value-added components (e.g., richly illustrated key, phylogenetic analyses), will not be considered. When proposing formal

supraspecific taxa, authors must justify these using cladistic methods. Ideally a formal cladistic analysis will be conducted, but in exceptional cases a list of synapomorphic character states with documentation of plesiomorphic character states in the outgroup(s) will be acceptable. Authors are encouraged to provide information on primary types as it appears on labels. Primary types must be deposited in prominent institutional collections unless there are exceptional circumstances. It is strongly recommended that authors deposit secondary types among different institutional collections so they are easily accessible by the scientific community.

Title and abstract

When the name of an organism is given in the title, use either its common name or its scientific name (without scientific authority), not both. All types of papers must be preceded by an abstract no longer than 200 words. Abstracts are only required in the language in which a paper has been submitted; i.e., either English or French. Should authors wish to submit a translation of their abstract they are welcome to do so.

Acknowledgements

These should be restrained and grouped in a separate paragraph at the end of the text.

References

Citation of references in the text should be in the form “Klimaszewski (2003) showed”, “(Klimaszewski 2003)”, “(Walker 1976, 1978)”, “(Walker 1976; Allen 1977)”, or “(Walker 1976; Allen 1977a, 1977b)”. The reference list should be in alphabetical order of authors at the end of the manuscript. The names of serials and periodicals cited should be **written out in full**. The full title for each reference and the complete pagination for all items except books must be given. Pages or figures should not be cited in the Reference list but, if necessary, in the

text as “(Nealis and Turnquist 2003, p. 906, Fig. 1)”. Use the following formats for listing references.

Article:

Truman, J.W. and Riddiford, L.M. 2002. Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects. *Annual Review of Entomology*, **47**: 467–500.

Book:

Layberry, R.A., Hall, P.W., and Lafontaine, J.D. 1998. *The butterflies of Canada*. University of Toronto Press, Toronto, Canada.

Conference:

Knudson, A. 1996. Evaluation of the biosprayer for the application of *Trichogramma* to cotton. *In* Proceedings of the Beltwide Cotton Conference, Nashville, Tennessee, 9–12 January 1996. *Edited by* P. Dugger and D. Richter. National Cotton Council, Memphis, Tennessee, United States of America. Pp. 788–791.

Chapter in a book:

Marshall, S.A., Buddle, C.M., Sinclair, B.J., and Buckle, D.J. 2001. Spiders, flies and some other arthropods of the Fathom Five National Marine Park islands and the upper Bruce Peninsula. *In* Ecology, culture and conservation of a protected area: Fathom Five National Marine Park, Canada. *Edited by* S. Parker and M. Munawar. Backhuys Publishers, Leiden, the Netherlands. Pp. 191–229.

Journal article with DOI:

Wahlberg, N., Oliveira, R., and Scott, J.A. 2003. Phylogenetic relationships of *Phyciodes* butterfly species (Lepidoptera: Nymphalidae): complex mtDNA variation and species delimitations. *Systematic Entomology*, **28**: 257–273. doi:10.1046/j.1365-3113.2003.00212.x.

Journal article with URL:

Wahlberg, N., Oliveira, R., and Scott, J.A. 2003. Phylogenetic relationships of *Phyciodes* butterfly species (Lepidoptera: Nymphalidae): complex mtDNA variation and species delimitations. *Systematic Entomology*, **28**: 257–273. Available from <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1046/j.1365-3113.2003.00212.x> [accessed 28 October 2005].

Journal article available online only (with DOI):

Lambshead, P.J.D., Brown, C.J., Ferrero, T.J., Hawkins, L.E., Smith, C.R., and Mitchell, N.J. 2003. Biodiversity of nematode assemblages from the region of the Clarion–Clipperton Fracture Zone, an area of commercial mining interest [online]. *BMC Ecology*, **3**: 1. doi:10.1186/1472-6785-3-1.

Web site citation:

Peck, S.B. and Newton, A.F. 2001. The leioidid beetles of Costa Rica [online]. Available from <http://www.inbio.ac.cr/papers/leiudidae/index.html> [accessed 29 October 2012].

Authors may not refer to their own unpublished information as “submitted” or “in preparation” but need simply state what was found. Do not cite “unpublished data” and “personal communications” in the Reference list.

Tables

The title of each table should follow the Journal’s conventions for capitalisation and punctuation, and should adequately explain the contents of the table. Tables should be numbered in Arabic numerals and grouped at the end of the text (*i.e.*, after the list of references), **each on a separate page**. Each table footnote should be labelled with a typographic symbol keyed to the title, boxhead, or entry of the table. Descriptive material not requiring a specific footnote should be placed under the table as a general note rather than in the title of the table.

Figure captions

Captions for all illustrations should be numbered consecutively and typed double-spaced in order at the end of the manuscript, immediately preceding the illustrations. Captions must be self-explanatory. **Captions must not be attached to illustrations.**

Supplementary Material

There will normally be one of the following reasons for you to be supplying supplementary material to accompany the online version of your article:

1. You wish to link to additional information which due to its nature does not lend itself to print media (examples- full data sets, movie or sounds files etc...)
2. The Editor of the Journal has requested that you extract certain information from the original article in order to allow for space constraints of the print version.
3. You have requested additional material to be available to accompany an article that does not normally allow such material to be included (example – tables to accompany a correspondence article).

N.B. Please note that no copyediting or quality assurance measures will be undertaken on supplementary material (other than to ensure that the file is intact). The authors therefore warrant that the supplementary material that they submit is in a suitable format for publication in this manner. The material shall be published online in exactly the form that it is supplied.

Submission

Please follow the following instructions to supply supplementary material to accompany the online version of your article:

1. Each supplementary file must be supplied as a separate file. Do not supply this material as part of the file destined for publication in the print journal.
2. Each supplementary file must have a clear title (e.g., Supplementary Figure 1).
3. Provide a text summary for each file of no more than 50 words. The summary should describe the contents of the file. Descriptions of individual figures or tables should be provided if these items are submitted as separate files. If a group of figures is submitted together in one file, the description should indicate how many figures are contained within the file and provide a general description of what the figures collectively show.
4. The file type and file size in parentheses.
5. Ensure that each piece of supplementary material is clearly referred to at least once in the print version of the paper at an appropriate point in the text, and is also listed at the end of the paper before the reference section.

Format and file size

- File sizes should be as small as possible in order to ensure that users can download them quickly.
- Images should be a maximum size of 640 x 480 pixels at a resolution of 72 pixels per inch.
- Authors should limit the number of files to under ten, with a total size not normally exceeding 3 MB. Sound/movie files may be up to 10 MB per file; colour PDFs/PowerPoint may be up to 5 MB per file; all other general file types may be up to 2 MB per file but most files should be much smaller.
- We accept files in any of the following formats (if in doubt please enquire first):

MS Word document (.doc) , Adobe Acrobat (.pdf), Plain ASCII text (.txt), Rich Text Format (.rtf), WordPerfect document (.wpd), HTML document (.htm), MS Excel spreadsheet (.xls), GIF image (.gif), JPEG image (.jpg), TIFF image (.tif),

MS PowerPoint slide (.ppt), QuickTime movie (.mov), Audio file (.wav), Audio file (.mp3), MPEG/MPG animation (.mpg)

If your file sizes exceed these limits or if you cannot submit in these formats, please seek advice from the Subject Editor handling your manuscript.

Illustrations for accepted manuscripts

Cambridge University Press requires the submission of separate electronic illustration files for accepted manuscripts. To ensure that your figures are reproduced to the highest possible standards, Cambridge Journals recommends the following formats and resolutions for supplying electronic figures.

Please ensure that your figures are saved at final publication size and are in our recommended file formats. Following these guidelines will result in high quality images being reproduced in both the print and the online versions of the journal.

Line artwork

Format: tif or eps

Colour mode: black and white (also known as 1-bit) Resolution: 1200 dpi

Combination artwork (line/tone)

Format: tif or eps

Colour mode: greyscale (also known as 8-bit) Resolution: 800 dpi

Black-and-white halftone artwork

Format: tif

Colour mode: greyscale (also known as 8-bit) Resolution: 300 dpi

Colour halftone artwork

Format: tif

Colour mode: CMYK colour

Resolution: 300 dpi

All lines must be sufficiently thick (0.5 points minimum) to reproduce well, and all symbols, superscripts, subscripts, and decimal points must be in good proportion to the rest of the drawing and large enough to allow for any necessary reduction without loss of detail. Avoid small open symbols; these tend to fill in upon reproduction. Lettering produced by dot matrix printers or typewriters, or by hand, is not acceptable. The same font style and lettering sizes should be used for all figures of similar size.

All **terms, abbreviations, and symbols** (see above) must correspond with those in the text. Only essential labelling should be used, with detailed information given in the caption. **Scale bars must be provided for line drawings of insects and all micrographs. Maps must indicate latitudes and longitudes and a scale.** All place names and geographic features on Québec maps must be in French, with proper accents and capitalisation, except those that are considered areas of pan-Canadian significance. For a complete list of areas of pan-Canadian significance, see *Le guide du rédacteur*: <http://www.termiumplus.gc.ca/redac-chap?lang=eng&lettr=chapsect11&info0=11>.

Permission to reprint material published in *The Canadian Entomologist*

Requests for permission to republish a paper, in whole or in part, should be sent to the Entomological Society of Canada, 393 Winston Avenue, Ottawa, Ontario, Canada K2A 1Y8 (email:entsoc.can@bellnet.ca)

***First-view* and Publication charges**

Under publication with Cambridge University Press, Authors will be able to access their accepted paper online as a "First-view" paper prior to print publication. Authors will also receive a PDF version of their final paper free of charge.

Revised March 2014.