**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Mudanças genéticas e fenotípicas associadas à criação de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) nos hospedeiros natural e alternativo e os efeitos da hibridização intraespecífica no seu *fitness*

Aline Bertin

Tese apresentada para obtenção do título
de Doutora em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2016**

Aline Bertin
Licenciada em Ciências Biológicas

Mudanças genéticas e fenotípicas associadas à criação de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) nos hospedeiros natural e alternativo e os efeitos da hibridização intraespecífica no seu *fitness*

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ ROBERTO POSTALI PARRA**

Tese apresentada para obtenção do título
de Doutora em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Bertin, Aline

Mudanças genéticas e fenotípicas associadas à criação de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) nos hospedeiros natural e alternativo e os efeitos da hibridização intraespecífica no seu *fitness* / Aline Bertin. - - Piracicaba, 2016. 86 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Mudanças fenotípicas 2. Fitness 3. Herdabilidade 4. Hibridização intraespecífica
5. Controle biológico I. Título

CDD 595.79
B544m

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*Aos meus pais, Aléssio Bertin e Maria Madalena Müller Bertin,
e a minha irmã, Juliana Bertin, pelo carinho e apoio.*

*Ao meu noivo, Vitor Antonio Corrêa Pavinato,
pelo companheirismo e incentivo.*

DEDICO

*Ao meu noivo, Vitor Antonio Corrêa Pavinato,
pelo amor e confiança.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, pela orientação ao longo destes seis anos na Pós-Graduação, pelos ensinamentos, pela oportunidade concedida e por confiar no meu trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ/USP pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento da ESALQ/USP, em especial ao Prof. Dr. José Baldin Pinheiro, pela infraestrutura oferecida para realização de uma etapa deste trabalho.

À empresa BUG Agentes Biológicos pelo fornecimento de linhagens de *Trichogramma galloi* utilizadas neste projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu noivo Vitor Antonio Corrêa Pavinato, pelo incentivo, apoio e valiosa ajuda em grande parte deste projeto, pelas enriquecedoras discussões biológicas, genéticas e evolutivas e, por todo o carinho a mim sempre dedicado.

À amiga e colega de turma Jaci Mendes Vieira, pela amizade e auxílio na identificação e confirmação da espécie estudada.

À Neide Graciano Zério, pela amizade, pelos ensinamentos e pelo auxílio na criação da broca da cana-de-açúcar.

A todos os colegas e amigos de turma da Pós-Graduação em Entomologia pelo convívio, companheirismo e por tornar estes quatro anos de doutorado mais agradáveis, em especial: Jaci Mendes Vieira, Johanna Gisela Bajonero Cuervo, Aline Cristina Pereira da Rocha e Marisol Giraldo Jaramillo.

Aos colegas do Laboratório de Biologia de Insetos, pelo convívio, pelos ensinamentos, pelas conversas no cafezinho e pelos momentos agradáveis.

À amiga e colega de apê Paula Gabriella Surdi, pela valiosa amizade, companheirismo e pela agradável convivência ao longo destes anos em Piracicaba.

À Laurinha, minha querida afilhadinha, que um dia compreenderá a razão da minha ausência.

A todas minhas amigas do Rio Grande do Sul: Ana Paula, Daiane, Franciela, Marina, Marquele e Silmara, pelos momentos de diversão e descontração e, por mesmo distante estarem sempre presentes.

A todos meus familiares e aqueles que contribuíram indiretamente para a realização deste trabalho.

“Todo mundo ama um dia

Todo mundo chora

Um dia a gente chega

No outro vai embora

Cada um de nós compõe a sua história

Cada ser em si

Carrega o dom de ser capaz

De ser feliz.”

Tocando em frente, Almir Sater.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
REFERÊNCIAS	17
 2 MUDANÇAS BIOLÓGICAS ASSOCIADAS À CRIAÇÃO DE <i>TRICHOGRAMMA GALLOI</i> ZUCCHI, 1988 EM LABORATÓRIO E OS EFEITOS DA CRIAÇÃO EM HOSPEDEIRO ALTERNATIVO	21
Resumo	21
Abstract	21
2.1 Introdução	22
2.2 Material e Métodos	24
2.2.1 Manutenção do parasitoide	24
2.2.2 <i>Fitness</i> de <i>Trichogramma galloi</i> ao longo das gerações	26
2.2.2.1 <i>Fitness</i> de <i>Trichogramma galloi</i> criado no hospedeiro natural, <i>Diatraea saccharalis</i>	26
2.2.2.2 <i>Fitness</i> de <i>Trichogramma galloi</i> criado no hospedeiro alternativo, <i>Anagasta kuehniella</i>	27
2.2.3 Análise estatística	27
2.3 Resultados	28
2.4 Discussão	37
2.5 Conclusão	43
Referências	43
 3 QUANTIFICAÇÃO DA VARIAÇÃO GENÉTICA EM CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE <i>TRICHOGRAMMA GALLOI</i> ZUCCHI, 1988	49
Resumo	49
Abstract	49
3.1 Introdução	50
3.2 Material e Métodos	51
3.2.1 Herdabilidade de caracteres ligados ao <i>fitness</i> em <i>Trichogramma galloi</i>	51
3.2.2 Influência do hospedeiro na expressão do fenótipo em <i>Trichogramma galloi</i>	52
3.2.3 Quantificação da variação genética na fecundidade de <i>Trichogramma galloi</i>	53

3.2.4 Resposta à seleção para a fecundidade em <i>Trichogramma galloi</i>	54
3.3 Resultados.....	54
3.4 Discussão	57
3.5 Conclusão	59
Referências	60
 4 HIBRIDIZAÇÃO INTRAESPECÍFICA E A RECUPERAÇÃO DO <i>FITNESS</i> EM <i>TRICHOGRAMMA GALLOI</i> ZUCCHI, 1988.....	63
Resumo	63
Abstract	64
4.1 Introdução	65
4.2 Material e Métodos.....	66
4.2.1 Populações de <i>Trichogramma galloi</i> utilizadas nos cruzamentos	66
4.2.2 Detecção de <i>Wolbachia</i> em populações de <i>Trichogramma galloi</i>	67
4.2.2.1 Extração do DNA genômico	67
4.2.2.2 Detecção de <i>Wolbachia</i>	67
4.2.2.3 Produção de linhagens aposimbiontes	68
4.2.3 Cruzamentos intraespecíficos entre três populações de <i>Trichogramma galloi</i>	69
4.2.3.1 Avaliação do grau de isolamento reprodutivo entre três populações de <i>Trichogramma galloi</i>	70
4.2.3.2 <i>Fitness</i> dos híbridos de <i>Trichogramma galloi</i>	70
4.2.3.3 Análises complementares	70
4.3 Resultados.....	71
4.3.1 Detecção de <i>Wolbachia</i> em populações de <i>Trichogramma galloi</i>	71
4.3.2 Cruzamentos intraespecíficos entre três populações de <i>Trichogramma galloi</i>	72
4.4 Discussão	78
4.5 Conclusão	80
Referências	81
 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	85

RESUMO

Mudanças genéticas e fenotípicas associadas à criação de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) nos hospedeiros natural e alternativo e os efeitos da hibridização intraespecífica no seu *fitness*

A criação de inimigos naturais em laboratório pode resultar em mudanças genéticas e fenotípicas drásticas devido às alterações ocasionadas principalmente pela deriva genética, endogamia e seleção natural. Estas alterações podem afetar o *fitness* das populações e reduzir a capacidade adaptativa às condições naturais. Além disto, a criação de inimigos naturais em hospedeiros alternativos pode comprometer a eficiência em campo. Poucos estudos tiveram como objetivo estudar estratégias para minimizar estes efeitos em condições de laboratório. Quantificar a variação genética em características biológicas pode auxiliar a estimar a resposta adaptativa às condições de criação, além de fornecer informações importantes para o melhoramento de agentes de controle biológico. A hibridização intraespecífica, ou seja, o cruzamento entre populações divergentes também pode ser um método relevante e eficaz para aumentar a aptidão biológica de agentes de controle, uma vez que permite a introdução de variação genética externa capaz de recuperar o *fitness* de populações mantidas em laboratório por muito tempo. Desta forma, este trabalho teve como objetivo estudar as mudanças genéticas e fenotípicas associadas à criação de *Trichogramma galloi* nos hospedeiros natural e alternativo, bem como investigar a herdabilidade de caracteres fundamentais para o desempenho do parasitoide e identificar os efeitos da hibridização intraespecífica em populações já estabelecidas em laboratório. Os resultados mostraram que a longevidade, a porcentagem de emergência e o número de parasitoides por ovo do hospedeiro apresentaram um aumento entre gerações para a população mantida no hospedeiro natural, indicando haver sinais de adaptação às condições de criação. No entanto, para a população mantida no hospedeiro alternativo foi observada uma redução na fecundidade e porcentagem de emergência quando oferecido o hospedeiro natural para o parasitismo, indicando haver um custo adaptativo associado à utilização de um novo hospedeiro. Foi possível verificar a existência de variação genética significativa na fecundidade. Em média, 46% da variância fenotípica observada foi determinada pela variância genética aditiva, sendo os demais 54% devido à variância ambiental e componentes genéticos dominantes. Nos cruzamentos intraespecíficos não foram observados casos de heterose, no entanto, foi observada a recuperação do *fitness* em híbridos obtidos a partir da população que apresentava desempenho inferior. Como conclusões deste trabalho, (i) foi possível detectar sinais de adaptação às condições de laboratório na população mantida no hospedeiro natural e uma menor eficiência sobre a praga alvo ao longo das gerações na população mantida no hospedeiro alternativo; (ii) verificou-se variação genética significativa na fecundidade da população estudada e; (iii) a hibridização intraespecífica se mostrou eficaz para amenizar os efeitos da depressão por endogamia em uma das populações de *T. galloi* estudada.

Palavras-chave: Mudanças fenotípicas; Fitness; Herdabilidade; Hibridização intraespecífica; Controle biológico

ABSTRACT

Genetic and phenotypic changes associated with *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) rearing on natural and alternative hosts and the effects of intraspecific hybridization in its fitness

The rearing of natural enemies in laboratory conditions can result in drastic genetic and phenotypic changes due to natural selection, inbreeding, and genetic drift. These changes may affect population fitness and reduce the adaptive potential in natural conditions. Moreover, rearing on alternative hosts may compromise field efficiency. Few studies have focused in strategies to minimize these effects in laboratory conditions. Quantify the genetic variation in biological traits can help estimate the adaptive response to rearing conditions in addition to provide important information for the improvement of biological control agents. Intraspecific hybridization, that is, the crossing between different populations may also be an important and effective method to increase fitness, since it introduces genetic variation able to recover the fitness of populations under laboratory for a long time. Thus, the aims of this work were to: study the genetic and phenotypic changes in laboratory populations of *Trichogramma galloi* on the natural and alternative host, investigate the heritability of fundamental traits to parasitoid success and identify the effects of intraspecific hybridization in populations already established in the laboratory. The results showed that longevity, emergence rate and the number of parasitoids per host egg increased between generations for the population maintained on the natural host, which corresponds to adaptation signs to the rearing conditions. However, the population reared on the alternative host had a reduction in fecundity and emergence rate when exposed to the natural host, indicating that there is a fitness cost associated with the utilization of a new host. It was possible to verify the existence of significant genetic variance in fecundity. On average, 46% of the observed phenotypic variance was determined by the additive genetic variance, with the remaining 54% due to environmental variance and dominant genetic components. In the intraspecific crosses there were no cases of heterosis, however, the recovery of fitness was observed in hybrids obtained from the population with lower performance. In summary, (i) it was possible to detect signs of adaptation to the rearing conditions in the population maintained on the natural host and a reduction in the efficiency on the target pest over the generations in the population reared on the alternative host; (ii) there was significant genetic variation in fecundity of the population studied and (iii) intraspecific hybridization proved to be effective to mitigate the effects of inbreeding depression in one of the populations of *T. galloi* studied.

Keywords: Phenotypic changes; Fitness; Heritability; Intraspecific hybridization; Biological control

1 INTRODUÇÃO

A utilização de parasitoides em programas de controle biológico tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas (PARRA, 2010a). Grande parte deste sucesso se deve à utilização de parasitoides de ovos, principalmente espécies pertencentes ao gênero *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Algumas das características responsáveis pela ampla utilização de espécies deste gênero em programas de controle biológico incluem a grande diversidade de hospedeiros (HASSAN, 1993) e a facilidade de criação em ovos de hospedeiros alternativos (PARRA, 1997; PARRA; ZUCCHI, 2004).

Liberações de *Trichogramma* têm sido realizadas para o controle de pragas em uma grande diversidade de culturas, incluindo culturas economicamente importantes como, soja, milho, tomateiro, cana-de-açúcar, entre outras (HASSAN, 1993; LI, 1994; PARRA; ZUCCHI, 2004; WANG et al., 2014; WU; HOFFMANN; THOMSON, 2015; PARRA et al., 2015). No Brasil, as liberações de parasitoides têm aumentado de maneira significativa, principalmente devido à utilização do parasitoide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) (PARRA; ZUCCHI, 2004; PARRA; BOTELHO; PINTO, 2010).

Atualmente, as espécies do gênero *Trichogramma* são produzidas com base em técnicas convencionais de criação massal já bem conhecidas, principalmente sobre hospedeiros alternativos (PARRA, 2010b). A criação de inimigos naturais em laboratório, no entanto, pode resultar em mudanças genéticas e fenotípicas drásticas como consequência de alterações ocasionadas pela deriva genética, endogamia e seleção natural (HOPPER; ROUSH; POWELL, 1993; TAYEH et al., 2012).

A criação de inimigos naturais em laboratório pode resultar em adaptação às condições artificiais de criação devido à seleção de genótipos particulares, podendo levar à perda de características biológicas desejáveis e à redução da capacidade adaptativa às condições naturais (BIGLER, 1994; HOPPER; ROUSH; POWELL, 1993). Características selecionadas não intencionalmente em condições de laboratório podem ser desvantajosas em condições naturais (ARAKI; COOPER; BLOUIN, 2007; FRANKHAM, 2008). Tayeh et al. (2012) observaram, por exemplo, desempenho inferior em uma população de laboratório de *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) quando comparada às populações naturais avaliadas. Foi observada menor sobrevivência da população de laboratório durante o período de quiescência em baixas temperaturas e, uma maior suscetibilidade à infecção pelo fungo

entomopatogênico *Beauveria bassiana* em comparação às populações nativas e invasoras da espécie (LOMBAERT et al., 2008; TAYEH et al., 2012).

Por outro lado, a seleção artificial pode permitir que a eficiência de agentes de controle biológico seja aprimorada, especialmente em relação à aceitação e adequação do hospedeiro (HENRY et al., 2010; LI et al., 2010). Li et al. (2010) investigaram o potencial de adaptação do parasitoide *Sclerodermus harmandi* (Hymenoptera: Bethyridae) a praga alvo, *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). Após 12 gerações sobre a praga alvo as fêmeas apresentaram uma melhor performance em comparação a fêmeas mantidas no hospedeiro de criação *Saperda populnea* (Coleoptera: Cerambycidae) (LI et al., 2010). Da mesma forma, Henry; Roitberg e Gillespie (2008) demonstraram a capacidade de uma única população do parasitoide *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) se diferenciar baseando-se apenas na utilização de diferentes hospedeiros.

Poucos estudos tiveram como objetivo compreender a trajetória evolutiva de populações mantidas em laboratório, considerando-se as mudanças genéticas e fenotípicas a que estas populações são submetidas (SIMÕES et al., 2007; HENRY; ROITBERG; GILLESPIE, 2008; ZEPEDA-PAULO et al., 2013). Monitorar mudanças adaptativas em parâmetros biológicos ao longo das gerações pode ajudar a compreender os efeitos da criação de inimigos naturais em hospedeiros alternativos. Por meio do controle de qualidade, parâmetros biológicos como fecundidade, longevidade, viabilidade, razão sexual, entre outros, são monitorados ao longo das gerações a fim de se detectarem alterações na qualidade e no desempenho dos insetos produzidos (van LENTEREN, 2003). Além disto, este acompanhamento permite verificar se diferentes hospedeiros atuam como possíveis agentes de seleção direcional em parasitoides, bem como investigar se uma população pode se adaptar ao longo do tempo a um hospedeiro de baixa qualidade inicial.

Estimar a herdabilidade de parâmetros fundamentais para o desempenho do parasitoide é o primeiro passo para a implementação de um programa de seleção artificial e melhoramento de agentes de controle biológico. A associação entre a avaliação de parâmetros biológicos e estimativas de herdabilidade pode auxiliar a determinar quais características fenotípicas estão sob controle genético e são, portanto, passíveis de seleção natural e artificial (HENRY et al., 2010).

A hibridização intraespecífica, por outro lado, também pode ser um método relevante e eficaz para aumentar a aptidão biológica de agentes de controle, uma vez que o cruzamento entre populações divergentes pode levar a heterose (vigor do híbrido) e/ ou ao aumento da variância genética em parâmetros fenotípicos relevantes (BENVENUTO et al., 2012; SZUCS

et al., 2012). Contudo, a utilização desta estratégia em programas de controle biológico precisa ser feita com cautela, pois a introdução de alelos exógenos de efeito deletério pode vir a reduzir o *fitness* da população. A hibridização intraespecífica tem sido pouco estudada e por esta razão é necessário avaliar com maior critério seus efeitos e verificar se estes persistem ao longo das gerações.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo estudar as mudanças biológicas associadas à criação de *T. galloi* em laboratório, bem como investigar a herdabilidade de caracteres fundamentais para o desempenho do parasitoide e, identificar os efeitos da hibridização intraespecífica, visando melhorar a aptidão biológica deste agente de controle.

Para isto, as seguintes etapas foram desenvolvidas: i) estudo das mudanças biológicas associadas à criação de *T. galloi* em laboratório, comparando o desempenho do parasitoide no seu hospedeiro natural e alternativo ao longo das gerações; ii) quantificação da variação genética em caracteres importantes para o desempenho do parasitoide; e (iii) avaliação dos efeitos de cruzamentos intraespecíficos no *fitness* do parasitoide, visando melhorar a aptidão biológica deste agente de controle.

Os estudos foram conduzidos com avaliações periódicas de características biológicas em populações mantidas no hospedeiro natural e alternativo, por meio de cruzamentos entre diferentes populações de *T. galloi* e utilizando-se métodos para quantificar a variação genética em características fenotípicas.

Os dados e conclusões obtidos com o presente trabalho permitem refinar o entendimento sobre aspectos biológicos e evolutivos relacionados à criação de insetos em laboratório, visando maximizar a manutenção de características de interesse dos parasitoides e minimizar efeitos genéticos ao longo das gerações. Além disto, foi possível esclarecer dúvidas quanto aos efeitos da hibridização de linhagens visando ao melhoramento de agentes de controle biológico.

Referências

- ARAKI, H.; COOPER, B.; BLOUIN, M.S. Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild. **Science**, Washington, DC, v. 318, p. 100-103, 2007.
- BENVENUTO, C.; TABONE, E.; VERCKEN, E.; SORBIER, N.; COLOMBEL, E.; WAROT, S.; FAUVERGUE, X.; RIS, N. Intraspecific variability in the parasitoid wasp *Trichogramma chilonis*: can we predict the outcome of hybridization? **Evolutionary Applications**, Hoboken, v. 5, p. 498-510, 2012.

BIGLER, F. Quality control in *Trichogramma* production. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S.A. (Ed.). **Biological control with egg parasitoids**. Wallingford: Cab International, 1994. p. 93-110.

FRANKHAM, R. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. **Molecular Ecology**, Chichester, v. 17, p. 325–333, 2008.

HASSAN, A.S. The mass rearing and utilization of *Trichogramma* to control lepidopterous pests: achievements and outlook. **Pesticide Science**, Chichester, v. 37, p. 387-391, 1993.

HENRY, L.M.; ROITBERG, B.D.; GILLESPIE, D.R. Host-range evolution in *Aphidius* parasitoids: fidelity, virulence and fitness trade-offs on an ancestral host. **Evolution**, Oxford, UK, v. 62, p. 689-699, 2008.

HENRY, L.M.; MAY, N.; ACHEAMPONG, S.; GILLESPIE, D.R.; ROITBERG, B.D. Host-adapted parasitoids in biological control: does source matter? **Ecological Applications**, Washington, DC, v. 20, p. 242-250, 2010.

HOPPER, K.R.; ROUSH, R.T.; POWELL, W. Management of genetics of biological control introductions. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 38, p. 27–51, 1993.

LENTEREN, J.C. van **Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures**. Wallingford: CABI, 2003. 327p.

LI, L. Worldwide use of *Trichogramma* for biological control on different crops: A survey. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S.A. (Eds.). **Biological control with egg parasitoids**. Wallingford: Cab International, 1994. p. 37-51.

LI, L.; WEI, W.; LIU, Z.; SUN, J. Host adaptation of a gregarious parasitoid *Sclerodermus harmandi* in artificial rearing. **BioControl**, Dordrecht, v. 55, p. 465-472, 2010.

LOMBAERT, E.; MALAUSA, T.; DEVRED, R.; ESTOUP, A. Phenotypic variation in invasive and biocontrol populations of the harlequin ladybird *Harmonia axyridis*. **BioControl**, Dordrecht, v. 53, p. 89-102, 2008.

PARRA, J.R.P. Técnicas de criação de *Anagasta kuehniella*, hospedeiro alternativo para produção de *Trichogramma*. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Trichogramma e o Controle Biológico Aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 121–150.

_____. Egg parasitoids commercialization in the New World. In: CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma**. Dordrecht: Springer, 2010a. p. 373–388.

_____. Mass rearing of egg parasitoids for biological control programs. In: CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma**. Dordrecht: Springer, 2010b. p. 267–292.

PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. *Trichogramma* in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. **Neotropical Entomology**, Dordrecht, v. 33, p. 271-281, 2004.

PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; PINTO, A.S. Biological control of pests as a key component for sustainable sugarcane production. In: CORTEZ, L.A.B. (Ed.). **Sugarcane Bioethanol: R&D for productivity and sustainability**. São Paulo: Blucher, 2010. p. 441-450.

PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; COELHO JR., A.; GEREMIAS, L.D.; CÔNSOLI, F.L. *Trichogramma* as a tool for IPM in Brazil. In: VINSON, B.; GREENBERG S.M.; LIU T.; RAO A.; VOLOSCIUK L.F. (Ed.). **Augmentative Biological Control Using *Trichogramma* spp.: Current Status and Perspectives**. Shaanxi: Northwest A&F University Press, *in press*. 2015.

SIMÕES, P.; ROSE, M.R.; DUARTE, A.; GONÇALVES, R.; MATOS, M. Evolutionary domestication in *Drosophila subobscura*. **Journal of Evolutionary Biology**, Chichester, v. 20, p. 758-766, 2007.

SZUCS, M.; EIGENBRODE, S.D.; SCHWARZLÄNDER, M.; SCHAFFNER, U. Hybrid vigor in the biological control agent, *Longitarsus jacobaeae*. **Evolutionary Applications**, Hoboken, v. 5, p. 489-497, 2012.

TAYEH, A.; ESTOUP, A.; LAUGIER, G.; LOISEAU, A.; TURGEON, J.; TOEPFER, S.; FACON, B. Evolution in biocontrol strains: insight from the harlequin ladybird *Harmonia axyridis*. **Evolutionary Applications**, Hoboken, v. 5, p. 481-488, 2012.

WANG, Z.; HE, K.; ZHANG, F.; LU, X.; BABENDREIER, D. Mass rearing and release of *Trichogramma* for biological control of insect pests of corn in China. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 68, p. 136-144, 2014.

WU, L.H.; HOFFMANN, A.A.; THOMSON, L.J. *Trichogramma* parasitoids for control of Lepidopteran borers in Taiwan: species, life-history traits and *Wolbachia* infections. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, doi: 10.1111/jen.12263, 2015.

ZEPEDA-PAULO, F.A.; ORTIZ-MARTINEZ, S.A.; FIGUEROA, C.C.; LAVANDERO, B. Adaptive evolution of a generalist parasitoid: implications for the effectiveness of biological control agents. **Evolutionary Applications**, Hoboken, v. 6, p. 983-999, 2013.

2 MUDANÇAS BIOLÓGICAS ASSOCIADAS À CRIAÇÃO DE *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 EM LABORATÓRIO E OS EFEITOS DA CRIAÇÃO EM HOSPEDEIRO ALTERNATIVO

Resumo

Para garantir a eficiência de um programa de controle biológico é preciso determinar se um inimigo natural, após sucessivas gerações em laboratório, continua eficiente no controle da praga alvo. A criação de inimigos naturais em laboratório pode resultar em mudanças genéticas e fenotípicas drásticas devido à deriva genética, à endogamia e à seleção natural, as quais podem subsequentemente afetar o *fitness* das populações e reduzir a capacidade adaptativa às condições naturais. Testes de laboratório com base em parâmetros biológicos podem ser conduzidos para monitorar a qualidade de inimigos naturais. Neste trabalho, o *fitness* de populações de *Trichogramma galloi* mantidas no hospedeiro natural e alternativo foi monitorado ao longo de 50 e 46 gerações, respectivamente. Os resultados demonstraram que a criação de *T. galloi* em laboratório pode levar à adaptação às condições de criação. Parâmetros como a longevidade, emergência e número de parasitoides por ovo do hospedeiro apresentaram um aumento entre gerações para a população mantida no hospedeiro natural. Os resultados também confirmaram a hipótese de que parasitoides mantidos ao longo das gerações sobre hospedeiros alternativos apresentam um desempenho posteriormente inferior, sobre a praga alvo. Foi observada uma redução nos valores de parâmetros fundamentais para o sucesso do parasitoide, como a fecundidade e a emergência, quando a população mantida no hospedeiro alternativo foi submetida ao parasitismo no hospedeiro natural.

Palavras-chave: Mudanças fenotípicas; fitness; Hospedeiro alternativo; Seleção; Evolução adaptativa; Controle biológico

Abstract

To ensure the efficiency of a biological-control program, we must determine if a natural enemy remains effective in controlling the target pest after successive generations in the laboratory. Artificial rearing can result in drastic genetic and phenotypic changes, due to genetic drift, inbreeding, and selection, which may subsequently affect population fitness and reduce the adaptive potential to natural conditions. Laboratory assays based on biological parameters can be conducted to determine the quality of natural enemies. In this study, we monitored the fitness of *Trichogramma galloi* populations maintained over 50 and 46 generations on the natural and alternative hosts, respectively. The results showed that laboratory rearing of *T. galloi* can result in adaptation to artificial conditions. Traits such as longevity, emergence rate, and the number of parasitoids per host egg increased across generations in the population maintained on the natural host. The results also confirmed the hypothesis that parasitoids maintained for generations on alternative hosts would later have lower fitness on the target pest. Impairment of traits that are essential for parasitoid success,

such as fecundity and emergence rate, was observed in the population maintained on the alternative host when allowed to parasitize the natural host.

Keywords: Phenotypic changes; Fitness; Alternative host; Selection; Adaptive evolution; Biological control

2.1 Introdução

A criação de inimigos naturais em laboratório, para posterior liberação em campo, pode ser comparada com a manutenção de espécies em cativeiro para programas de conservação. Muitas espécies ameaçadas necessitam a criação e reprodução em cativeiro antes de serem reintroduzidas na natureza (FRANKHAM, 2008). O principal objetivo em programas de reprodução e conservação de espécies é minimizar as mudanças genéticas que podem vir a ser observadas em cativeiro, sendo elas, a perda de diversidade genética, depressão por endogamia, acúmulo de mutações deletérias e a adaptação (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2002). Estas mudanças genéticas podem afetar o *fitness* das populações e reduzir a capacidade adaptativa às condições naturais (WOODWORTH et al., 2002; ARAKI; COOPER; BLOUIN, 2007; FRANKHAM, 2008).

Os agentes de controle biológico podem passar pelos mesmos tipos de alterações fenotípicas e genéticas já vistas em outras espécies mantidas em cativeiro (SGRÒ; PARTRIDGE, 2000; LEWIS; THOMAS, 2001; WOODWORTH et al., 2002; HEATH et al., 2003; SIMÕES et al., 2007; FRANKHAM, 2008). Por este motivo, é de fundamental importância compreender as mudanças biológicas e evolutivas relacionadas à criação de agentes de controle biológico, visando sobretudo determinar se um inimigo natural, após sucessivas gerações em laboratório, continua eficiente no controle da praga alvo.

Três principais mecanismos evolutivos explicam as mudanças genéticas observadas em condições artificiais de criação: deriva genética, endogamia e seleção natural (HOPPER; ROUSH; POWELL, 1993; HUFBAUER; RODERICK, 2005). A deriva genética está associada à perda de diversidade alélica e pode ocorrer quando poucos indivíduos são utilizados para se estabelecer uma criação de inimigos naturais em laboratório (efeito fundador) ou quando as populações são mantidas em um tamanho reduzido. A perda de variabilidade genética pode limitar o potencial evolutivo da espécie, impedindo que esta responda positivamente às mudanças que ocorrem no ambiente e reduzindo a probabilidade da população persistir devido à depressão por endogamia (FRANKHAM; BALLOU;

BRISCOE, 2002; ALLENDORF; LUIKART, 2007; FAUVERGUE et al., 2012). O acasalamento entre parentes e o consequente aumento na produção de homozigotos podem afetar negativamente as criações em laboratório, pois permitem que indivíduos homozigotos para uma característica letal ou indesejável sejam gerados (BARTLETT, 1984).

A criação de inimigos naturais em laboratório pode também resultar em adaptação às condições de criação devido à seleção de genótipos particulares, podendo levar à perda de características biológicas desejáveis e à redução da capacidade adaptativa às condições naturais (BIGLER, 1994; HOPPER; ROUSH; POWELL, 1993; TAYEH et al., 2012). A maioria dos casos relatados na literatura relacionados à adaptação às condições de criação e domesticação correspondem a um aumento na fecundidade. Simões et al. (2007) observaram um aumento de 60 a 80% na fecundidade de *Drosophila subobscura* (Diptera: Drosophilidae) ao longo de 50 gerações em laboratório. Já em *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) o *fitness* de uma população experimental dobrou após apenas oito gerações, em comparação com uma população selvagem da espécie (FRANKHAM; LOEBEL, 1992).

A seleção natural tende a ser mais eficaz em populações maiores, enquanto que a deriva genética, afeta principalmente populações de tamanho reduzido (ALLENDORF; LUIKART, 2007; FAUVERGUE et al., 2012). Em um experimento realizado com populações de *D. melanogaster* mantidas em diferentes tamanhos efetivos por 50 gerações, as populações de menor tamanho efetivo apresentaram uma redução no *fitness* devido à depressão por endogamia, enquanto que as populações maiores demonstraram uma rápida adaptação às condições de criação (WOODWORTH et al., 2002). Após a reintrodução destas populações em condições semelhantes ao ambiente selvagem, foi observado um declínio no *fitness* até mesmo na população que apresentou um aumento deste em condições de laboratório (WOODWORTH et al., 2002).

Poucas gerações são suficientes para que os efeitos genéticos das condições artificiais de criação resultem num declínio cumulativo do *fitness* de caracteres de interesse posteriormente no estado selvagem (ARAKI; COOPER; BLOUIN, 2007; FRANKHAM, 2008). Os casos mais surpreendentes podem ser observados em experimentos realizados com peixes (ARAKI; COOPER; BLOUIN, 2007; CHRISTIE et al., 2012), onde uma redução na capacidade adaptativa ao ambiente natural pôde ser observada em apenas uma única geração (CHRISTIE et al., 2012). Em insetos, onde a fecundidade geralmente é muito alta, a seleção natural pode agir de forma muito intensa, especialmente nas primeiras gerações após o

estabelecimento da população em laboratório (FRANKHAM; LOEBEL, 1992, ALLENDORF; LUIKART, 2007).

A utilização de hospedeiros alternativos para a criação de agentes de controle biológico também pode atuar como uma forma de seleção direcional e afetar o *fitness* do parasitoide posteriormente sobre a praga alvo (ANTOLIN; BJORKSTEN; VAUGHN, 2006; HENRY; ROITBERG; GILLESPIE, 2008; LI et al., 2010). Henry; Roitberg e Gillespie (2008) verificaram uma redução no *fitness* de parasitoides mantidos em um novo hospedeiro quando o desempenho foi avaliado no hospedeiro ancestral, evidenciando a presença de *trade-offs* associados à troca e/ou utilização de um novo hospedeiro.

As espécies do gênero *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) são produzidas, em sua maioria, sobre hospedeiros alternativos (PARRA, 2010), no entanto, poucos estudos visam avaliar se parasitoides mantidos nestes hospedeiros continuam eficientes no controle da praga alvo. Devido à sua ampla utilização como agente de controle biológico da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) e devido à sua especificidade, *Trichogramma galloi* Zucchi 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) foi o modelo biológico escolhido para testar a hipótese de que parasitoides mantidos ao longo das gerações sobre hospedeiros alternativos apresentam alterações no desempenho posteriormente sobre a praga alvo. Além disto, mudanças biológicas também foram monitoradas ao longo das gerações em populações mantidas nos hospedeiros natural e alternativo visando verificar possíveis adaptações às condições de criação.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Manutenção do parasitoide

Os parasitoides utilizados foram provenientes de uma população originalmente coletada em campo (Santa Vitória – MG, 18°50'19"S 50°07'17"O). A população selecionada foi mantida e multiplicada em ovos do hospedeiro natural, *D. saccharalis*, e em ovos do hospedeiro alternativo, *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). As populações foram mantidas isoladas no hospedeiro natural por 50 gerações e no hospedeiro alternativo por 46 gerações.

Fêmeas provenientes da população F1 de campo foram individualizadas em tubos de vidro (8,5 X 2,5 cm) para o estabelecimento de isolinhagens, para as quais foram oferecidos

ovos (24h de idade) de *D. saccharalis* para o parasitismo por 48 horas. Após o período de parasitismo, as posturas parasitadas foram colocadas em contato com papel filtro umedecido, em um novo tubo de vidro, para evitar o ressecamento dos ovos (PARRA et al., 1999). Os tubos de vidro foram mantidos em câmara climatizada em condições de temperatura, umidade e fotoperíodo controladas ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas) até a emergência dos adultos, quando novas posturas do hospedeiro foram oferecidas.

Após a confirmação da espécie, dada pela identificação de um macho proveniente da prole de cada isolinhagem (QUERINO; ZUCCHI, 2011), foi realizado o restabelecimento da população através do acasalamento entre a progênie de todas as isolinhas. As posturas parasitadas foram aleatoriamente subdivididas em grupos, as quais foram utilizadas para propagar repetições da população. Foram mantidas dez repetições da população em ovos do hospedeiro natural e dez repetições em ovos do hospedeiro alternativo, das quais cinco foram utilizadas nos experimentos e as demais mantidas como estoque. As repetições de cada população (subpopulações) foram mantidas em tubos de vidro com aproximadamente 200 – 300 indivíduos ao longo de todas as gerações, com a finalidade de limitar os efeitos da deriva genética.

Para as subpopulações mantidas no hospedeiro natural, ovos de *D. saccharalis* provenientes da criação de manutenção foram tratados com uma solução de sulfato de cobre a 1% para evitar o desenvolvimento de microrganismos. Posteriormente, foram submetidos ao parasitismo por um período de 2 horas. No interior dos tubos de vidro, foram colocadas gotículas de mel puro para a alimentação dos parasitoides (BLEICHER; PARRA, 1991).

Após o período de parasitismo, as posturas contendo os ovos foram retiradas e os adultos de *T. galloi*, aderidos a ela, removidos. Para o desenvolvimento dos parasitoides, as posturas retiradas foram colocadas em um novo tubo de vidro, semelhante ao anteriormente descrito. Os tubos de vidro foram mantidos em câmara climatizada em condições controladas (descritas anteriormente).

Para as subpopulações que foram mantidas no hospedeiro alternativo, ovos de *A. kuehniella* foram colados em retângulos de cartolina (6,5 X 1,5 cm) contendo fita dupla face e inviabilizados por exposição sob lâmpada germicida por um período de 45 minutos (STEIN; PARRA, 1987). Depois de inviabilizados, os ovos foram submetidos ao parasitismo por 24 horas. No interior dos tubos de vidro, foram colocadas gotículas de mel puro para a alimentação dos parasitoides. Após o período de parasitismo, os procedimentos foram semelhantes aos descritos para os ovos de *D. saccharalis*.

2.2.2 *Fitness* de *Trichogramma galloi* ao longo das gerações

O *fitness* de parasitoides provenientes da população mantida no hospedeiro natural foi avaliado, ao longo das gerações, sobre este mesmo hospedeiro e sobre o hospedeiro alternativo, da mesma forma, para parasitoides provenientes da população mantida no hospedeiro alternativo o *fitness* foi avaliado em ambos hospedeiros, natural e alternativo. Para a população mantida no hospedeiro natural foram realizadas sete avaliações (gerações: F5, F9, F12, F14, F20, F25 e F50) e oito avaliações para a população mantida no hospedeiro alternativo (gerações: F5, F7, F9, F12, F14, F21, F25 e F46). Todos os experimentos foram realizados em câmaras climatizadas com condições de temperatura, umidade e fotoperíodo controladas ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas).

2.2.2.1 *Fitness* de *Trichogramma galloi* criado no hospedeiro natural, *Diatraea saccharalis*

Foram selecionadas, ao acaso, 10 a 30 fêmeas de cada subpopulação nas gerações F5, F9, F12, F14, F20, F25 e F50 para as quais foram oferecidos ovos de *D. saccharalis* para o parasitismo. Nas gerações F9, F14 e F25 foram selecionadas 10 a 30 fêmeas de cada subpopulação, para as quais foram oferecidos ovos de *A. kuehniella* para o parasitismo.

Para cada geração avaliada, após a emergência dos adultos, foi permitido o acasalamento por um período de 24 horas. Após este período, as fêmeas foram selecionadas aleatoriamente e individualizadas em tubos de vidro contendo gotículas de mel puro para a alimentação. Aproximadamente 75 ovos (24h de idade) de *D. saccharalis* foram oferecidos a cada fêmea por um período de 48 horas, enquanto que para o parasitismo em *A. kuehniella* foram oferecidos aproximadamente 100 ovos (24h de idade) pelo mesmo período de tempo. Após o parasitismo, as posturas foram removidas e colocadas em um novo tubo de vidro para o desenvolvimento dos parasitoides.

O *fitness* das populações de *T. galloi* em cada hospedeiro foi avaliado, observando-se a fecundidade (número de ovos parasitados por fêmea, dado pelo número de ovos do hospedeiro escurecidos, indicativo de que o parasitoide atingiu a fase de pré-pupa), porcentagem de emergência (calculada a partir do número de ovos com orifício de saída do parasitoide pelo número total de ovos escurecidos), número de indivíduos alocados por ovo hospedeiro (dado pela razão entre o número total de adultos e o número de ovos com orifício

de emergência), longevidade (em dias) e razão sexual da progênie produzida ($\text{♀}/\text{♀}+\text{♂}$), por meio do dimorfismo sexual observado nas antenas (BOWEN; STERN, 1966).

2.2.2.2 *Fitness* de *Trichogramma galloi* criado no hospedeiro alternativo, *Anagasta kuehniella*

Foram selecionadas ao acaso 10 a 30 fêmeas de cada subpopulação nas gerações F5, F9, F12, F14, F21, F25 e F46, para as quais foram oferecidos ovos de *A. kuehniella* para o parasitismo. Nas gerações, F7, F9, F14 e F25 foram selecionadas 10 a 30 fêmeas de cada subpopulação, para as quais foram oferecidos ovos de *D. saccharalis* para o parasitismo. Desta forma, foi possível avaliar ao longo das gerações o *fitness* das subpopulações tanto no hospedeiro no qual a espécie estava sendo mantida, quanto no seu hospedeiro natural. Os procedimentos foram semelhantes ao modelo anteriormente descrito para as subpopulações de *T. galloi* mantidas no hospedeiro natural (item 2.2.2.1).

2.2.3 Análise estatística

O *fitness* em cada hospedeiro avaliado foi analisado separadamente para reduzir a complexidade do modelo estatístico. Foram feitas análises entre gerações, em cada hospedeiro avaliado, com o objetivo de avaliar o efeito no *fitness* dos parasitoides ao longo do tempo. Os dados de longevidade, porcentagem de emergência e razão sexual foram analisados por meio de modelos lineares generalizados mistos (GLMM) utilizando-se o pacote *lme4* (BATES; MAECHLER; BOLKER, 2010), sendo que os efeitos no modelo incluíram: geração (efeito fixo) e bloco (efeito aleatório). Os blocos correspondem às repetições de cada população utilizada no experimento e estes foram utilizados com a finalidade de limitar a perda de diversidade genética como consequência da deriva genética. Os dados de porcentagem de emergência e razão sexual foram analisados utilizando-se uma regressão logística com distribuição binomial. Para a longevidade foi utilizada a distribuição de Poisson com uma função de ligação log. A fecundidade e o número de parasitoides por ovo do hospedeiro foram analisados utilizando-se um modelo linear. As comparações entre gerações foram feitas por meio do teste de Tukey ($\alpha=0.05$) utilizando-se o pacote *multcomp* (HOTHORN et al., 2008). Por fim, foram feitas comparações entre a primeira e a última geração avaliadas para cada hospedeiro por meio de um teste t.

Para avaliar se parasitoides mantidos no hospedeiro alternativo continuavam eficientes no controle da praga alvo após 25 gerações em laboratório, foram feitas comparações entre parasitoides mantidos em *D. saccharalis* e *A. kuehniella* e para os quais foram oferecidos ovos de *D. saccharalis* para o parasitismo. Os dados referentes aos parasitoides mantidos nos dois hospedeiros, quando estes receberam ovos de *D. saccharalis* para o parasitismo, foram analisados por meio de modelos lineares generalizados (GLM) utilizando-se o pacote *lme4* (BATES; MAECHLER; BOLKER, 2010), sendo que os efeitos no modelo incluíram: hospedeiro e geração. Os dados de porcentagem de emergência e razão sexual foram analisados utilizando-se uma regressão logística com distribuição binomial (função de ligação *logit*). Para a longevidade foi utilizada a distribuição de Poisson (função de ligação *log*). Os demais parâmetros, fecundidade e número de parasitoides por ovo do hospedeiro, foram analisados utilizando-se a distribuição normal (função de ligação *identidade*). Todos os dados foram analisados utilizando-se o programa R versão 3.2.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015).

2.3 Resultados

Fitness de Trichogramma galloi criado no hospedeiro natural, Diatraea saccharalis

Alguns parâmetros relacionados ao *fitness* na população mantida sobre o hospedeiro natural apresentaram um aumento significativo, como por exemplo, a porcentagem de emergência e o número de parasitoides por ovo do hospedeiro, enquanto outros oscilaram ao longo das gerações e não apresentaram mudanças quando comparadas as gerações F5 e F50 (Tabela 1 e 2).

Ao longo das gerações, a fecundidade apresentou algumas variações (Tabela 1, Figura 1a); no entanto, ao comparar as gerações iniciais com a geração F50 não houve mudanças significativas no número de ovos parasitados por fêmea (Tabela 2). Já a porcentagem de emergência aumentou consideravelmente ao longo das gerações, atingindo 90% na geração F50 (Tabelas 1 e 2, Figura 1b).

O número de parasitoides alocados por ovo do hospedeiro também aumentou de maneira significativa a partir da geração F9 (Tabela 1). A longevidade de parasitoides mantidos no hospedeiro natural variou significativamente entre gerações (Tabela 1, Figura 1c). Ao comparar a longevidade de parasitoides na geração F5 com a longevidade na geração

F50 foi possível verificar um pequeno aumento no tempo de vida de adultos do parasitoide (Tabela 2).

Tabela 1 - Parâmetros biológicos avaliados ao longo das gerações em uma população de *Trichogramma galloi* mantida no hospedeiro natural, *Diatraea saccharalis* (25±1°C, 70±10% UR e fotofase de 14 horas)

<i>Geração</i> ¹	<i>Parâmetros (x ± erro padrão)</i>				
	<i>Fecundidade</i>	<i>Emergência</i>	<i>Longevidade</i>	<i>Parasitoides/ovo</i>	<i>Razão sexual</i>
F5	27.81 ± 0.69 cd	76.63 ± 1.24 c	3.60 ± 0.07 a	1.75 ± 0.01 a	0.9 ± 0.01 d
F9	24.41 ± 1.60 bc	90.5 ± 1.34 ab	7.63 ± 0.50 d	1.87 ± 0.02 b	0.82 ± 0.03 c
F12	22.90 ± 1.53 ab	87.48 ± 2.00 ab	6.80 ± 0.53 d	1.85 ± 0.03 ab	0.72 ± 0.05 a
F14	19.33 ± 0.76 a	90.48 ± 1.01 b	4.72 ± 0.16 b	1.91 ± 0.02 b	0.76 ± 0.02 b
F20	31.24 ± 1.10 d	95.13 ± 0.84 d	6.63 ± 0.42 cd	1.95 ± 0.02 b	0.89 ± 0.01 d
F25	17.34 ± 1.31 a	87.93 ± 1.66 a	5.28 ± 0.39 bc	1.94 ± 0.03 b	0.88 ± 0.01 d
F50	24.88 ± 1.57 bc	90.81 ± 1.28 ab	4.34 ± 0.35 ab	1.9 ± 0.03 b	0.72 ± 0.04 a
<i>gl</i>	6	6	6	6	6
F / χ^2	17.17	537.97	207.09	8.70	1029.8
P	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

¹ Os valores correspondem a avaliações feitas, ao longo das gerações, no hospedeiro natural.

² Para a fecundidade e o número de parasitoides por ovo são apresentados os valores da estatística F, enquanto que, para os demais parâmetros são apresentados os valores de qui-quadrado.

Tabela 2 - Comparações entre parâmetros biológicos avaliados nas gerações F5 e F50 em uma população de *Trichogramma galloi* mantida no hospedeiro natural, *Diatraea saccharalis* (25±1°C, 70±10% UR e fotofase de 14 horas).

<i>Geração</i> ¹	<i>Parâmetros (x ± erro padrão)</i>				
	<i>Fecundidade</i>	<i>Emergência</i>	<i>Longevidade</i>	<i>Parasitoides/ovo</i>	<i>Razão sexual</i>
F5	27.81 ± 0.69	76.63 ± 1.24	3.60 ± 0.07	1.75 ± 0.01	0.90 ± 0.00
F50	24.88 ± 1.57	90.81 ± 1.28	4.34 ± 0.35	1.90 ± 0.03	0.72 ± 0.04
<i>gl</i>	69.4	132.66	52.37	73.81	49.3
t	1.69	-7.75	-2.05	-3.50	3.55
P	0.0942	< 0.001	0.0451	0.0007	0.0008

¹ Os valores correspondem a avaliações feitas no hospedeiro natural.

A razão sexual foi o único parâmetro biológico avaliado em que foi observado um decréscimo entre as gerações F5 e F50 (Tabela 2), devido a um declínio no número de fêmeas na população.

Figura 1 - Parâmetros biológicos avaliados ao longo de 50 gerações em uma população de *Trichogramma galloi* mantida no hospedeiro natural, *Diatraea saccharalis*. a) fecundidade (número médio de ovos parasitados por fêmea); b) porcentagem de emergência; c) longevidade de fêmeas ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas)

Os resultados referentes ao parasitismo no hospedeiro alternativo não são apresentados devido à ausência de resposta das fêmeas.

Fitness de Trichogramma galloi criado no hospedeiro alternativo, Anagasta kuehniella

As avaliações, ao longo das gerações, para a população de *T. galloi* mantida no hospedeiro alternativo, quando submetida ao parasitismo neste mesmo hospedeiro, mostraram um decréscimo na fecundidade do parasitoide a partir da geração F12 (Tabela 3, Figura 2a). Foram observadas variações ao longo das gerações na porcentagem de emergência; no entanto, os valores sempre se mantiveram acima dos 95% (Tabela 3). Além disto, não foram verificadas mudanças significativas neste parâmetro na comparação feita entre as gerações F5 e F46 (Tabela 4).

Tabela 3 - Parâmetros biológicos avaliados ao longo das gerações em uma população de *Trichogramma galloi* mantida no hospedeiro alternativo, *Anagasta kuehniella* (25±1°C, 70±10% UR e fotofase de 14 horas)

<i>Geração</i> ¹	<i>Parâmetros (x ± erro padrão)</i>				
	<i>Fecundidade</i>	<i>Emergência</i>	<i>Longevidade</i>	<i>Parasitoides/ovo</i>	<i>Razão sexual</i>
F5	32.50 ± 2.54 cd	97.19 ± 0.89 bc	7.15 ± 0.59 ce	1.02 ± 0.00 a	0.86 ± 0.01 a
F9	38.10 ± 2.21 d	98.24 ± 0.32 b	8.69 ± 0.57 e	0.99 ± 0.00 a	0.86 ± 0.02 a
F12	20.14 ± 1.12 a	99.14 ± 0.24 a	6.06 ± 0.21 bc	1.00 ± 0.00 a	0.85 ± 0.01 a
F14	26.21 ± 1.41 bc	99.38 ± 0.16 a	7.79 ± 0.35 de	0.99 ± 0.01 a	0.83 ± 0.01 a
F21	24.55 ± 1.12 ac	97.78 ± 0.58 bc	4.97 ± 0.22 ab	0.99 ± 0.00 a	0.85 ± 0.02 a
F25	21.77 ± 1.32 ab	98.40 ± 0.43 ab	4.70 ± 0.15 a	0.99 ± 0.01 a	0.84 ± 0.01 a
F46	22.82 ± 1.18 ab	95.54 ± 0.76 c	6.70 ± 0.32 cd	1.03 ± 0.00 a	0.84 ± 0.00 a
<i>gl</i>	6	6	6	6	6
F/ χ^2	14.39	72.76	92.11	1.97	7.43
P	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.0684	0.2825

¹ Os valores correspondem a avaliações feitas, ao longo das gerações, no hospedeiro alternativo.

² Para a fecundidade e o número de parasitoides por ovo são apresentados os valores da estatística F, enquanto que, para os demais parâmetros são apresentados os valores de qui-quadrado.

O número de parasitoides alocados por ovo do hospedeiro em *A. kuehniella* foi sempre igual a um, enquanto que em ovos de *D. saccharalis* foram observados em média dois parasitoides, devido ao maior tamanho do ovo deste hospedeiro.

A longevidade ao longo das gerações apresentou oscilações, no entanto, em comparações entre a geração F5 e a geração F46 não foram observadas diferenças significativas (Tabela 4, Figura 2c). A razão sexual permaneceu estável ao longo das gerações, sempre apresentando uma maior proporção de fêmeas na população (Tabela 3).

Tabela 4 - Comparações entre parâmetros biológicos avaliados nas gerações F5 e F46 em uma população de *Trichogramma galloi* mantida no hospedeiro alternativo, *Anagasta kuehniella* (25±1°C, 70±10% UR e fotofase de 14 horas)

<i>Geração</i> ¹	<i>Parâmetros (x ± erro padrão)</i>				
	<i>Fecundidade</i>	<i>Emergência</i>	<i>Longevidade</i>	<i>Parasitoides/ovo</i>	<i>Razão sexual</i>
F5	32.50 ± 2.54	97.19 ± 0.89	7.15 ± 0.59	1.02 ± 0.00	0.86 ± 0.01
F46	22.82 ± 1.18	95.54 ± 0.76	6.70 ± 0.32	1.03 ± 0.00	0.84 ± 0.00
<i>gl</i>	27.58	47.92	31.22	64.17	35.54
<i>t</i>	3.44	1.37	0.66	-1.24	0.84
<i>P</i>	0.0018	0.1746	0.5128	0.2168	0.4024

¹ Os valores correspondem a avaliações feitas no hospedeiro alternativo.

(A)

(B)

(C)

Figura 2 - Parâmetros biológicos avaliados ao longo de 46 gerações em uma população de *Trichogramma galloi* mantida no hospedeiro alternativo, *Anagasta kuehniella*. a) fecundidade (número médio de ovos parasitados por fêmea); b) porcentagem de emergência; c) longevidade de fêmeas ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas)

Comparação entre parasitoides mantidos no hospedeiro natural e alternativo, quando o *fitness* foi avaliado no hospedeiro natural

A eficiência de parasitoides mantidos no hospedeiro alternativo em parasitar o hospedeiro natural diminuiu a partir da F14 (Tabela 5). O número de ovos parasitados por fêmea apresentou variação significativa entre as populações mantidas no hospedeiro natural e alternativo, quando avaliadas em ovos de *D. saccharalis* (Tabela 6, Figura 4a e 5a). A fecundidade de parasitoides provenientes do hospedeiro natural foi significativamente maior do que a observada em parasitoides provenientes do hospedeiro alternativo (Tabela 6, Figura 4a).

Tabela 5 - Parâmetros biológicos avaliados ao longo das gerações em uma população de *Trichogramma galloi* mantida no hospedeiro alternativo, *Anagasta kuehniella* (25±1°C, 70±10% UR e fotofase de 14 horas)

<i>Geração</i> ¹	<i>Parâmetros (x ± erro padrão)</i>				
	<i>Fecundidade</i>	<i>Emergência</i>	<i>Longevidade</i>	<i>Parasitoides/ovo</i>	<i>Razão sexual</i>
F7	16.90 ± 0.95 bc	89.69 ± 1.92 c	7.22 ± 0.44 b	1.84 ± 0.03 a	0.67 ± 0.04 a
F9	18.45 ± 0.70 c	81.76 ± 1.45 b	9.87 ± 0.34 c	1.86 ± 0.02 a	0.84 ± 0.01 b
F14	15.14 ± 0.71 b	82.94 ± 2.16 b	7.08 ± 0.35 b	1.84 ± 0.03 a	0.85 ± 0.01 b
F25	10.97 ± 1.03 a	77.36 ± 2.70 a	5.02 ± 0.20 a	1.82 ± 0.07 a	0.88 ± 0.00 b
<i>gl</i>	3	3	3	3	3
F/ χ^2	16.42	45.24	96.88	0.65	183.97
P	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.579	< 0.001

¹ Os valores correspondem a avaliações feitas, ao longo das gerações, no hospedeiro natural.

² Para a fecundidade e o número de parasitoides por ovo são apresentados os valores da estatística F, enquanto que, para os demais parâmetros são apresentados os valores de qui-quadrado.

A porcentagem de emergência também foi influenciada pelo hospedeiro no qual o parasitoide foi mantido, sendo maior para a população mantida no hospedeiro natural, bem como a proporção de fêmeas na população (Tabela 6). Ao longo das gerações foi possível observar um aumento na porcentagem de emergência em parasitoides mantidos no hospedeiro natural, enquanto que para os parasitoides mantidos no hospedeiro alternativo houve um decréscimo ao longo do período avaliado, especialmente a partir da F9 (Tabela 5 e Figura 3).

Figura 3 - Porcentagem de emergência de populações de *Trichogramma galloi* no hospedeiro natural, *Diatraea saccharalis*, nas gerações F5 e F25. Para fins de comparação, a geração F5 avaliada na população mantida no hospedeiro natural foi relacionada com a geração F7 avaliada na população mantida no hospedeiro alternativo ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas)

A longevidade no hospedeiro natural foi, em média, maior para parasitoides provenientes da população mantida no hospedeiro alternativo (Tabela 6, Figura 4b e 5b). No entanto, é possível observar que a longevidade na geração 25 foi equivalente nas duas populações (Figura 5b) devido a um decréscimo de 7.22 ± 0.44 dias na geração F7 para 5.02 ± 0.20 dias na geração F25 na população mantida no hospedeiro alternativo (Tabela 5).

Tabela 6 - Comparações entre parâmetros biológicos avaliados ao longo de 25 gerações em populações de *Trichogramma galloi* mantidas nos hospedeiros natural e alternativo ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas)

População ¹	Parâmetros ($x \pm$ erro padrão)				
	Fecundidade	Emergência	Longevidade	Parasitoides/ovo	Razão sexual
Hospedeiro natural (<i>Diatraea saccharalis</i>)	22.99 ± 0.52	85.08 ± 0.00	4.89 ± 0.13	1.85 ± 0.01	0.84 ± 0.01
Hospedeiro alternativo (<i>Anagasta kuehniella</i>)	16.19 ± 0.45	83.01 ± 0.00	7.94 ± 0.22	1.85 ± 0.01	0.82 ± 0.01
<i>gl</i>	1	1	1	1	1
χ^2	76.32	8.29	230.18	0.0024	27.79
<i>P</i>	< 0.001	< 0.01	< 0.001	0.961	< 0.001

¹ Os valores correspondem a avaliações feitas, ao longo das gerações, no hospedeiro natural.

O número de parasitoides alocados por ovo do hospedeiro não foi influenciado pelo hospedeiro no qual *T. galloi* foi mantido ao longo das gerações ($\chi^2 = 0.0024$, $P = 0.961$).

Além disto, este parâmetro permaneceu estável na população mantida no hospedeiro alternativo ao longo das avaliações (Tabela 5).

A proporção de fêmeas na população foi o único parâmetro biológico que apresentou um aumento significativo na população mantida no hospedeiro alternativo (Tabela 5). A partir da F9 a razão sexual foi predominantemente de fêmeas quando o *fitness* foi avaliado no hospedeiro natural.

Figura 4 - Parâmetros biológicos avaliados ao longo de 25 gerações no hospedeiro natural, em populações de *Trichogramma galloi* mantidas nos hospedeiros natural e alternativo. a) fecundidade (número médio de ovos parasitados por fêmea); b) longevidade de fêmeas ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas)

Figura 5 - Parâmetros biológicos avaliados ao longo de 25 gerações no hospedeiro natural, em populações de *Trichogramma galloi* mantidas nos hospedeiros natural e alternativo. a) fecundidade (número médio de ovos parasitados por fêmea); b) longevidade de fêmeas. Para fins de comparação, a geração F5 avaliada na população mantida no hospedeiro natural foi relacionada com a geração F7 avaliada na população mantida no hospedeiro alternativo ($25\pm 1^\circ\text{C}$, $70\pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas)

2.4 Discussão

A criação de inimigos naturais em laboratório pode resultar em mudanças genéticas e fenotípicas drásticas como consequência de alterações ocasionadas pela deriva genética, endogamia e seleção natural (HOPPER; ROUSH; POWELL, 1993; TAYEH et al., 2012). Neste trabalho, foi demonstrado que a criação de *T. galloi* em laboratório pode levar à adaptação às condições de criação. Foram monitoradas ao longo de 50 e 46 gerações populações no hospedeiro natural e alternativo, respectivamente, sendo que, para a população mantida no hospedeiro natural foi possível detectar sinais de adaptação às condições de criação, enquanto que para a população mantida no hospedeiro alternativo foram observados efeitos adversos devido à mudança de hospedeiro.

A fecundidade e a porcentagem de emergência são alguns dos parâmetros mais importantes para o sucesso de *T. galloi* como agente de controle biológico. Na população mantida no hospedeiro natural, a fecundidade oscilou ao longo das gerações, mas de maneira geral, comparando-se a fecundidade do parasitoide no início do experimento e após 50 gerações em laboratório, este parâmetro se manteve estável (Tabela 1 e 2). Ao longo das gerações, a população mantida no hospedeiro natural apresentou um aumento na porcentagem de emergência, passando de 76% para 90%, da geração F5 para F50. Este aumento na porcentagem de emergência e em demais parâmetros como a longevidade e o número de parasitoides alocados por ovo do hospedeiro, pode ser atribuído a mudanças genéticas devido à seleção direcional, pois respostas consistentes em direção ao longo do tempo são prováveis efeitos da seleção (FRY, 2003).

A maioria dos casos relatados na literatura relacionados à adaptação às condições de criação e domesticação correspondem a um aumento na fecundidade. Simões et al. (2007) observaram um aumento de 60 a 80% na fecundidade de *D. subobscura* ao longo de 50 gerações em laboratório. No entanto, contrário ao esperado, não foi observada resposta direcional evidente em outros parâmetros considerados importantes durante o processo de domesticação, como por exemplo, o tempo de desenvolvimento e a sobrevivência dos estágios imaturos (SIMÕES et al., 2007).

A presença de seleção direcional em laboratório também já foi verificada em outros casos, como por exemplo, o maior sucesso reprodutivo de machos em populações de *H. axyridis*, onde machos da linhagem de laboratório, quando competindo com machos de uma população invasora, foram responsáveis por 75% da prole produzida pelas fêmeas (TAYEH et al., 2012). As fêmeas de *H. axyridis* provenientes da linhagem de laboratório também apresentaram maior fecundidade (± 40 ovos/ dia) em comparação com as populações invasoras (± 28.2 ovos/ dia) e nativas (± 28.6 ovos/ dia) da espécie (TAYEH et al., 2012).

Ainda para a população mantida no hospedeiro natural, foi observado um decréscimo na proporção de fêmeas na população (Tabela 2). Esta redução na razão sexual pode ser influenciada, por exemplo, pela qualidade do hospedeiro, pelo tamanho da massa de ovos oferecida, entre outros fatores (COLAZZA; WAJNBERG, 1998). Entretanto, o valor obtido na geração F50 ainda é considerado adequado segundo os índices utilizados no controle de qualidade de inimigos naturais (van LENTEREN, 2003).

As adaptações às condições de laboratório, como as observadas para a população de *T. galloi* mantida no hospedeiro natural, aumentam o *fitness* das populações neste ambiente; no entanto, tendem a ser desvantajosas em condições naturais (ARNOLD, 1995; BIGLER, 1994;

HOPPER; ROUSH; POWELL, 1993; FRANKHAM, 2008; TAYEH et al., 2012). A reintrodução de espécies ameaçadas ao ambiente natural tem enfrentado limitações principalmente devido ao menor sucesso reprodutivo, sendo a adaptação ao cativeiro uma das razões da baixa taxa de sucesso (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2002). Em experimentos realizados com *D. melanogaster*, em condições controladas, foi observado um aumento no *fitness* das populações com maior tamanho efetivo; porém, após transferidas para condições semelhantes ao ambiente selvagem estas populações apresentaram menor sucesso reprodutivo em comparação às populações selvagens (WOODWORTH et al., 2002). Os mesmos efeitos têm sido observados na introdução de inimigos naturais em um novo ambiente, onde apesar dos esforços, menos da metade dos agentes de controle biológico chega a se estabelecer (HALL; EHRLER, 1979; FAUVERGUE et al., 2012).

É preciso minimizar os efeitos negativos da adaptação às condições de criação na aptidão de populações utilizadas em programas de controle biológico. Reduzir o número de gerações que as populações permanecem em laboratório pode ser uma estratégia viável para reduzir o tempo em que a seleção pode agir sobre a população (LEWIS; THOMAS, 2001; FRANKHAM, 2008; WILLIAMS; HOFFMAN, 2009); entretanto, não é uma opção prática em se tratando de criações massais de inimigos naturais. Os efeitos da seleção também podem ser minimizados se o ambiente no qual os agentes de controle biológico forem mantidos apresentar condições semelhantes ao ambiente natural, no entanto, fatores como ausência de competição e de doenças, tornam esta estratégia de certa forma impraticável (FRANKHAM, 2008). Condições de temperatura alternantes já foram testadas para *T. galloi*, comprovando que o parasitismo da espécie é maior e o tempo de desenvolvimento é menor em temperaturas alternantes que simulam as condições de verão (27 – 21°C) (CÔNSOLI; PARRA, 1995a, b). Por outro lado, outros parâmetros como a longevidade e as exigências térmicas não apresentaram mudanças significativas (CÔNSOLI; PARRA, 1995a, b).

A adaptação às condições de criação também pode ser reduzida por meio da fragmentação da população (MARGAN et al., 1998). Fragmentar populações maiores em populações menores, mas com o mesmo tamanho efetivo pode fazer com que cada população reduza sua diversidade genética ao longo da criação; porém, a variabilidade pode ser reestabelecida com o cruzamento de todas as subpopulações antes da liberação em campo (HOPPER; ROUSH; POWELL, 1993; GUZMÁN-LARRALDE et al., 2014). Este regime de fragmentação pode ser contraditório, uma vez que haverá redução na diversidade genética devido à deriva, podendo resultar em uma maior taxa de endogamia (FRANKHAM;

BALLOU; BRISCOE, 2002). No entanto, o cruzamento ocasional entre as populações pode ajudar a manter a endogamia em níveis aceitáveis (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2002).

Uma estratégia similar comprovou ser eficiente em um experimento realizado com o parasitoide de ovos *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), onde uma população formada a partir de 26 isolinhagens não apresentou mudanças significativas na fecundidade ao longo de 2, 6 e 17 gerações (GUZMÁN-LARRALDE et al., 2014).

A introdução de indivíduos selvagens também pode ajudar a reduzir a taxa de adaptação às condições de criação (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2002; FRANKHAM, 2008), quando um grande número de indivíduos é introduzido após algumas gerações (FRANKHAM; LOEBEL, 1992).

Na população mantida no hospedeiro alternativo também foram observadas alterações no desempenho dos insetos. A fecundidade no hospedeiro alternativo foi diminuindo ao longo das gerações, possivelmente devido à mudança de hospedeiro. Nos demais parâmetros não foram verificadas mudanças significativas entre as gerações F5 e F46, apenas mudanças estocásticas entre gerações para a longevidade e porcentagem de emergência.

Experimentos de seleção, como os realizados neste trabalho, permitem identificar mudanças genéticas e fenotípicas como consequência da troca ou utilização de um novo hospedeiro (FRY, 2003). O monitoramento do *fitness* de populações mantidas no hospedeiro natural (população controle) e de populações mantidas em hospedeiros alternativos pode auxiliar a detectar *trade-offs* associados à mudança de hospedeiro. *Trade-offs* podem vir a ser observados se a adaptação a um novo hospedeiro ocasionar uma redução do *fitness* no hospedeiro ancestral, devido à ação pleiotrópica antagonista de um ou mais genes (FRY, 1996). Segundo esta hipótese, características que aumentam a aptidão em um hospedeiro são prejudiciais em outro (FRY, 1996).

Ao longo das gerações, o *fitness* de *T. galloi* proveniente das populações mantidas no hospedeiro natural e alternativo foi avaliado no hospedeiro natural. Com este delineamento, foi possível identificar efeitos associados à criação em hospedeiros alternativos, uma vez que os principais parâmetros relacionados ao *fitness* (fecundidade, porcentagem de emergência e razão sexual) em *D. saccharalis* foram maiores quando *T. galloi* foi mantido ao longo das gerações neste hospedeiro.

Os resultados também reforçam a presença de *trade-offs* associados à troca e/ou utilização de um novo hospedeiro. Os resultados obtidos ao longo das gerações para a população mantida no hospedeiro alternativo, quando submetida ao parasitismo no hospedeiro

natural, comprovam a redução nos valores de parâmetros fundamentais para o sucesso do parasitoide, como por exemplo, a fecundidade e a emergência (Tabela 5). Foi possível observar uma menor eficiência sobre a praga alvo após apenas sete gerações sobre o hospedeiro alternativo. A utilização de hospedeiros alternativos para criação de inimigos naturais impõe uma pressão de seleção divergente, podendo levar a trajetórias evolutivas diferentes, resultando em adaptação a certos hospedeiros (ANTOLIN; BJORKSTEN; VAUGHN, 2006; HENRY; ROITBERG; GILLESPIE, 2008).

Pesquisas recentes têm avaliado o potencial de inimigos naturais em se adaptar a diferentes hospedeiros (ANTOLIN; BJORKSTEN; VAUGHN, 2006; HENRY; ROITBERG; GILLESPIE, 2008; LI et al., 2010; ZEPEDA-PAULO et al., 2013). Li et al. (2010) demonstraram que a adaptação do parasitoide *S. harmandi* a um determinado hospedeiro ocorreu em menos de doze gerações. Após doze gerações em condições artificiais de criação, fêmeas de *S. harmandi* mantidas no hospedeiro natural (*M. alternatus*) apresentaram melhor desempenho (ex. menor tempo de busca e manuseio, maior preferência para oviposição, menor mortalidade da prole) em comparação com fêmeas mantidas no hospedeiro de substituição (*S. populnea*). Por outro lado, fêmeas mantidas no hospedeiro de substituição ovipositaram com menos frequência no hospedeiro natural, em comparação com o hospedeiro no qual vinham sendo mantidas (LI et al., 2010).

Resultados similares foram obtidos por Henry; Roitberg e Gillespie (2008) ao investigar o potencial de adaptação do parasitoide *A. ervi* a um novo hospedeiro. *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) (pulgão-da-ervilha), denominado ‘hospedeiro ancestral’, é um hospedeiro de alta qualidade e a espécie mais comumente utilizada em criações massais de *A. ervi*, enquanto que o pulgão, *Aulacorthum solani* (Hemiptera: Aphididae), denominado ‘novo hospedeiro’, é um hospedeiro de baixa qualidade e uma praga historicamente difícil de ser controlada com o uso do controle biológico (SANCHEZ; CÁNOVAS; LACASA, 2007). Após 50 gerações em laboratório, o *fitness* do parasitoide no novo hospedeiro aumentou consideravelmente comparado com o número de hospedeiros parasitados por fêmeas mantidas no hospedeiro ancestral (HENRY; ROITBERG; GILLESPIE, 2008). Por outro lado, os autores verificaram uma diminuição no *fitness* de parasitoides mantidos no novo hospedeiro quando o desempenho foi avaliado no hospedeiro ancestral, evidenciando a presença de *trade-offs* associados à utilização de um novo hospedeiro.

Henry et al. (2010) chamaram a atenção para a simplificação do modelo de produção de inimigos naturais através da utilização de hospedeiros alternativos, pois como demonstrado por Henry; Roitberg e Gillespie (2008) existe uma inabilidade por parte dos parasitoides em simultaneamente maximizar o *fitness* em mais de um hospedeiro.

Outros trabalhos associam as diferenças observadas entre hospedeiros à plasticidade fenotípica e não a adaptações locais (ZEPEDA-PAULO et al., 2013; RUIZ-MONTOYA; NÚÑEZ-FARFÁN, 2013). A plasticidade fenotípica é um mecanismo capaz de maximizar o *fitness* em resposta à heterogeneidade ambiental (BAYTHAVONG; STANTON, 2010), já no caso de adaptações locais, um genótipo apresenta melhor desempenho em um hospedeiro, mas não em outro (KAWECKI; EBERT, 2004). Resultados obtidos com o parasitoide *A. ervi* mostram que o parasitoide foi capaz de maximizar o *fitness* tanto no hospedeiro natural quanto no hospedeiro alternativo, fornecendo evidências para a ausência de adaptações locais (ZEPEDA-PAULO et al., 2013). Diversos fatores podem atuar em conjunto a fim de retardar o processo de adaptação, como por exemplo, fluxo gênico, variabilidade genética reduzida, variações ambientais e plasticidade fenotípica (FRY, 1996; CRISPO, 2008).

A longevidade de *T. galloi* no hospedeiro natural foi maior para parasitoides provenientes da população mantida no hospedeiro alternativo. A proporção de fêmeas no hospedeiro natural também aumentou ao longo das gerações para parasitoides mantidos no hospedeiro alternativo. O aumento nestes parâmetros e a redução em outros, pode ser ocasionada devido à ação pleiotrópica antagonista de um ou mais genes, onde um único loco afeta duas ou mais características fenotípicas aparentemente não relacionadas (STEARNS, 2010).

Tendo em vista que a criação de *T. galloi* é realizada sobre seu hospedeiro alternativo, pesquisas futuras envolvendo o cruzamento de populações mantidas no hospedeiro natural e alternativo poderiam avaliar o *fitness* da prole proveniente destes cruzamentos sobre a praga alvo. O cruzamento entre populações divergentes pode levar ao aumento da variância genética em caracteres fenotípicos relevantes para o sucesso do parasitoide. Assim, o cruzamento de populações no hospedeiro natural e alternativo, antes da liberação em campo, poderia ser uma estratégia para aumentar a viabilidade da população e garantir a eficiência do parasitoide sobre a praga alvo.

2.5 Conclusão

Este trabalho suporta a hipótese de que parasitoides mantidos em laboratório podem sofrer alterações fenotípicas devido à adaptação as condições de criação e/ ou à criação em hospedeiros alternativos. A fecundidade de *T. galloi* mantido no hospedeiro natural foi significativamente maior do que a observada em parasitoides mantidos no hospedeiro alternativo, quando o *fitness* foi avaliado sobre o hospedeiro natural, confirmando a hipótese de que parasitoides mantidos ao longo das gerações sobre hospedeiros alternativos apresentam um *fitness* posteriormente inferior sobre a praga alvo.

Referências

ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. 642 p.

ANTOLIN, M.F.; BJORKSTEN, T.A.; VAUGHN, T.T. Host related fitness trade-offs in a presumed generalist parasitoid, *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Aphidiidae). **Ecological Entomology**, Chichester, v. 31, p. 242-254, 2006.

ARAKI, H.; COOPER, B.; BLOUIN, M.S. Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild. **Science**, Washington, DC, v. 318, p. 100-103, 2007.

ARNOLD, S.J. Monitoring genetic variation and evolution in captive populations. In: BALLOU, J.D.; GILPIN, M.; FOOSE, T.J. (Ed.). **Population Management for Survival and Recovery: Analytical Methods and Strategies in Small Population Conservation**. New York: Columbia University Press, 1995. p. 295– 317.

BARTLETT, A.C. Genetic changes during insect domestication. In: KING, E.G.; LEPLA, N.C. (Eds.). **Advances and challenges in insect rearing**. Louisiana: US Department of Agriculture, 1984. p. 2-8.

BATES, D.; MAECHLER, M.; BOLKER, B. lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes. **R package**. Version 0.999375–34. Institute for Statistics and Mathematics, University of Economics and Business, Vienna, 2010. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>.

BAYTHAVONG, B.S.; STANTON, M.L. Characterizing selection on phenotypic plasticity in response to natural environmental heterogeneity. **Evolution**, Oxford, UK, v. 64, p. 2904–2920, 2010.

BIGLER, F. Quality control in *Trichogramma* production. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S.A. (Ed.). **Biological control with egg parasitoids**. Wallingford: Cab International, 1994. p. 93-110.

BLEICHER, E.; PARRA, J.R.P. Efeito do hospedeiro de substituição e da alimentação na longevidade de *Trichogramma* sp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 1845-1850, 1991.

BOWEN, W.R.; STERN, V.M. Effect of temperature on the production of males and sexual mosaics in a uniparental race of *Trichogramma semifumatum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lahan, v. 59, p. 823-834, 1966.

CHRISTIE, M.R.; MARINE, M.L.; FRENCH, R.A.; BLOUIN, M.S. Genetic adaptation to captivity can occur in a single generation. **PNAS**, Washington, DC, v. 109, p. 238-242, 2012.

COLAZZA, S.; WAJNBERG, E. Effects of host egg mass size on sex ratio and oviposition sequence of *Trissolcus basal* (Hymenoptera: Scelionidae). **Environmental Entomology**, Cary, v. 27, p. 329-336, 1998.

CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P. Effects of constant and alternating temperatures on *Trichogramma galloi* Zucchi (Hym., Trichogrammatidae) biology. I. Development and thermal requirements. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 119, p. 415-418, 1995a.

_____. Effects of constant and alternating temperatures on *Trichogramma galloi* Zucchi (Hym., Trichogrammatidae) biology. II. Parasitism capacity and longevity. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 119, p. 667-670, 1995b.

CRISPO, E. Modifying effects of phenotypic plasticity on interactions among natural selection, adaptation and gene flow. **Journal of Evolutionary Biology**, Chichester, v. 21, p. 1460–1469, 2008.

FAUVERGUE, X.; VERCKEN, E.; MALAUSA, T.; HUFBAUER, R.A. The biology of small, introduced populations, with special reference to biological control. **Evolutionary Applications**, Hoboken, v. 5, p. 424-443, 2012.

FRANKHAM, R. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. **Molecular Ecology**, Chichester, v. 17, p. 325–333, 2008.

FRANKHAM, R.; LOEBEL, D.A. Modeling problems in conservation genetics using captive *Drosophila* populations: rapid genetic adaptation to captivity. **Zoo Biology**, Hoboken, v. 11, p. 333–342, 1992.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. 617p.

FRY, J.D. The evolution of host specialization: are trade-offs overrated? **American Naturalist**, Chicago, v. 148, p. S84-S107, 1996.

_____. Detecting ecological trade-offs using selection experiments. **Ecology**, Washington, DC, v. 84, p. 1672-1678, 2003.

GUZMÁN-LARRALDE, A.; CERNA-CHÁVEZ, E.; RODRÍGUEZ-CAMPOS, E.; LOYOLA-LICEA, J.C.; STOUTHAMER, R. Genetic variation and the performance of a mass-reared parasitoid, *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in laboratory trials. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 138, p. 346–354, 2014.

HALL, R.W.; EHLER, L.E. Rate of establishment of natural enemies in classical biological control. **Bulletin of the Entomological Society of America**, Annapolis, v. 25, p. 280–282, 1979.

HEATH, D.D.; HEATH, J.W.; BRYDEN, C.A.; JOHNSON, R.M.; FOX, C.W. Rapid evolution of egg size in captive salmon. **Science**, Washington, DC, v. 299, p. 1738–1740, 2003.

HENRY, L.M.; ROITBERG, B.D.; GILLESPIE, D.R. Host-range evolution in *Aphidius* parasitoids: fidelity, virulence and fitness trade-offs on an ancestral host. **Evolution**, Oxford, UK, v. 62, p. 689–699, 2008.

HENRY, L.M.; MAY, N.; ACHEAMPONG, S.; GILLESPIE, D.R.; ROITBERG, B.D. Host-adapted parasitoids in biological control: does source matter? **Ecological Applications**, Washington, DC, v. 20, p. 242–250, 2010.

HOPPER, K.R.; ROUSH, R.T.; POWELL, W. Management of genetics of biological control introductions. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 38, p. 27–51, 1993.

HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P.; HEIBERGER, R.M. Multcomp: simultaneous inference in general parametric models. **R package**. Version 1.0-0, 2008. URL <http://CRAN.R-project.org>.

HUFBAUER, R.; RODERICK, G. Microevolution in biological control: mechanisms, patterns, and processes. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 35, p. 227–239, 2005.

Kawecki, T.J.; Ebert, D. Conceptual issues in local adaptation. **Ecology Letters**, Chichester, v. 7, p. 1225–1241, 2004.

LENTEREN, J.C. van **Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures**. Wallingford: CABI, 2003. 327p.

LEWIS, O.T.; THOMAS C.D. Adaptations to captivity in the butterfly *Pieris brassicae* (L.) and the implications for ex situ conservation. **Journal of Insect Conservation**, Dordrecht, v. 5, p. 55–63, 2001.

LI, L.; WEI, W.; LIU, Z.; SUN, J. Host adaptation of a gregarious parasitoid *Sclerodermus harmandi* in artificial rearing. **BioControl**, Dordrecht, v. 55, p. 465–472, 2010.

MARGAN, S.H.; NURTHEN, R.K.; MONTGOMERY, M.E.; WOODWORTH, L.M.; LOWE, E.H.; BRISCOE, D.A.; FRANKHAM, R. Single large or several small? Population fragmentation in the captive management of endangered species. **Zoo Biology**, Hoboken, v. 17, p. 467–480, 1998.

PARRA, J.R.P. Mass rearing of egg parasitoids for biological control programs. In: CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on *Trichogramma***. Dordrecht: Springer, 2010. p. 267–292.

PARRA, J.R.P.; MILANO, P.; CÔNSOLI, F.L.; ZERIO, N.G.; HADDAD, M.L. Efeito da nutrição de adultos e da umidade na fecundidade de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 28, p. 49-57, 1999.

QUERINO, R.B.; ZUCCHI, R.A. **Guia de identificação de *Trichogramma* para o Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 103p.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2015. URL <http://www.R-project.org/>.

RUIZ-MONTOYA, L.; NÚÑEZ-FARFÁN, J. Testing local host adaptation and phenotypic plasticity in a herbivore when alternative related host plants occur sympatrically. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, e79070, doi:10.1371/journal.pone.0079070, 2013.

SANCHEZ, J.A.; CÁNOVAS, F.; LACASA, A. Thresholds and management strategies for *Aulacorthum solani* (Hemiptera: Aphididae) in greenhouse pepper. **Journal of Economic Entomology**, Cary, v. 73, p. 183-189, 2007.

SGRÒ, C.M.; PARTRIDGE, L. Evolutionary responses of the life history of wild-caught *Drosophila melanogaster* to two standard methods of laboratory cultures. **The American Naturalist**, Chicago, v. 156, p. 341-353, 2000.

SIMÕES, P.; ROSE, M.R.; DUARTE, A.; GONÇALVES, R.; MATOS, M. Evolutionary domestication in *Drosophila subobscura*. **Journal of Evolutionary Biology**, Chichester, v. 20, p. 758-766, 2007.

STEARNS, F.W. One hundred years of pleiotropy: a retrospective. **Genetics**, Bethesda, v. 186, p. 767–773, 2010.

STEIN, C.P.; PARRA, J.R.P. Uso da radiação ultravioleta para inviabilizar ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) visando estudos com *Trichogramma*. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Dordrecht, v. 16, p. 229-234, 1987.

TAYEH, A.; ESTOUP, A.; LAUGIER, G.; LOISEAU, A.; TURGEON, J.; TOEPFER, S.; FACON, B. Evolution in biocontrol strains: insight from the harlequin ladybird *Harmonia axyridis*. **Evolutionary Applications**, Hoboken, v. 5, p. 481-488, 2012.

WILLIAMS, S.E.; HOFFMAN, E.A. Minimizing genetic adaptation in captive breeding programs: a review. **Biological Conservation**, Amsterdam, v. 142, p. 2388–2400, 2009.

WOODWORTH, L.M.; MONTGOMERY, M.E.; BRISCOE, D.A.; FRANKHAM, R. Rapid genetic deterioration in captive populations: causes and conservation implications. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 3, p. 277–288, 2002.

ZEPEDA-PAULO, F.A.; ORTIZ-MARTINEZ, S.A.; FIGUEROA, C.C.; LAVANDERO, B. Adaptive evolution of a generalist parasitoid: implications for the effectiveness of biological control agents. **Evolutionary Applications**, Hoboken, v. 6, p. 983-999, 2013.

3 QUANTIFICAÇÃO DA VARIAÇÃO GENÉTICA EM CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988

Resumo

Quantificar a variação genética em características biológicas de inimigos naturais é essencial para compreensão do potencial evolutivo de agentes de controle utilizados em programas de controle biológico. Neste trabalho, foram utilizados dois métodos da genética quantitativa para estimar a variação genética e a herdabilidade de parâmetros biológicos do parasitoide de ovos *Trichogramma galloi*. Além disto, foi realizado um teste piloto de seleção artificial para avaliar o potencial de resposta para o aumento da fecundidade. A herdabilidade foi estimada utilizando-se uma regressão do modelo mãe-filha e a variação genética foi estudada utilizando-se uma análise entre famílias. Foi possível verificar a existência de variação genética intra-populacional significativa na fecundidade da população estudada. As estimativas de herdabilidade mostraram que 46% da variabilidade fenotípica da fecundidade e 29% da longevidade estão sob controle genético aditivo. Os resultados preliminares de seleção artificial mostraram um aumento no número de ovos parasitados na população selecionada. Com este trabalho foi possível determinar quais características fenotípicas apresentam variação genética aditiva significativa bem como, identificar o potencial de seleção para o aumento da fecundidade, visando maximizar o potencial deste agente de controle biológico. Este estudo constitui um passo inicial na compreensão de estratégias que possam ser utilizadas no melhoramento genético de *T. galloi*.

Palavras-chave: Variação genética; Herdabilidade; Seleção artificial; Fenótipo; Parasitoide de ovos; Controle biológico

Abstract

Measuring the level of genetic variation in biological traits of natural enemies is essential to understand the evolutionary potential of beneficial organisms used in biological control programs. In this study, two quantitative genetic methods were employed to estimate the genetic variation and heritability of biological features of the egg parasitoid *Trichogramma galloi*. In addition, a pilot test of artificial selection was conducted to evaluate the selection potential for increased fecundity in this parasitoid. Heritability was estimated using a parent-offspring regression and the genetic variation was studied using an analysis between families. It was possible to verify the existence of significant intra-population genetic variation in the fecundity within the population studied. Heritability estimates showed that 46% of the phenotypic variation in fecundity and 29% in longevity are under additive genetic control. Preliminary results of artificial selection showed an increase in the number of parasitized eggs in the selected population. It was possible to determine which phenotypic characteristics showed significant additive genetic variation as well as identify the selection potential of fecundity in order to maximize the reproductive potential of this biological

control agent. This study is an initial step to understand the strategies that can be used in the genetic improvement of *T. galloi*.

Keywords: Genetic variation; Heritability; Artificial selection; Phenotype; Egg parasitoid; Biological control

3.1 Introdução

Quantificar a variação genética em características biológicas de inimigos naturais pode ajudar a estimar a resposta adaptativa às condições artificiais de criação, bem como fornecer informações importantes para a implementação de um programa de seleção artificial de agentes de controle biológico (HOPPER; ROUSH; POWELL, 1993; WAJNBERG, 1991; WAJNBERG, 1994). No entanto, a utilização deste método em programas de controle biológico ainda é pouco explorada.

Grande parte da variação fenotípica observada nas populações está sob controle genético e pode, portanto, ser moldada por seleção natural. A variabilidade fenotípica (V_P) observada entre indivíduos de uma população é o resultado de interações do genótipo (V_G) de cada organismo e o ambiente (V_E) no qual vivem e pode ser expressa, de maneira simplificada, da seguinte forma: $V_P = V_G + V_E$. Os componentes da variância genética é que determinam a proporção em que os caracteres respondem à seleção e estes podem ser subdivididos em componentes genéticos aditivos, dominantes e epistáticos ($V_P = V_A + V_D + V_I + V_E$). O interesse na decomposição da variância genética se deve ao fato da variância genética aditiva representar a parte da variabilidade fenotípica que é efetivamente transmitida aos descendentes. Sendo assim, a variância genética aditiva define o valor genético das características (WAJNBERG, 2004).

Em espécies do gênero *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), poucos estudos foram realizados com a finalidade de estimar a variação genética intrapopulacional em parâmetros importantes para o desempenho do parasitoide. A grande maioria dos trabalhos tem se concentrado em estudar a variação inter e intraespecífica, por meio de comparações entre espécies e/ou populações a fim de selecionar a mais adequada para utilização em campo (PRATISSOLI; PARRA, 2001; SAOUR, 2004; TABONE et al., 2010; KO et al., 2014; WU; HOFFMANN; THOMSON, 2015). Dentre os trabalhos mais recentes de variação intrapopulacional, Wajnberg; Curty e Jervis (2012) estudaram o padrão temporal de maturação de ovos de *Trichogramma brassicae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e

observaram uma variação significativa entre as famílias estudadas, verificando que alguns genótipos originam fêmeas com uma maior proporção de ovos maduros antes da emergência (sinovigenia).

Alguns parâmetros biológicos apresentam maior variação genética que outros, sendo que aqueles que afetam o *fitness* tendem a apresentar uma menor variação devido à seleção natural (FISHER, 1930; FALCONER, 1981; MOUSSEAU; ROFF, 1987; ROFF; MOUSSEAU, 1987). Ainda assim, mesmo sob seleção, a variação genética em caracteres ligados ao *fitness* pode ser mantida devido a diversos fatores como, mutações, variações ambientais e interações antagonicas entre características (ROFF; MOUSSEAU, 1987).

A herdabilidade de uma característica, ou seja, a proporção da variação fenotípica que corresponde à variação genética entre indivíduos de uma população, pode ser estimada comparando-se a similaridade fenotípica de indivíduos com diferentes graus genéticos de parentesco (ALLENDORF; LUIKART, 2007). Estimar a herdabilidade de parâmetros fundamentais para o desempenho de agentes de controle biológico é o primeiro passo para a implementação de um programa de seleção artificial e melhoramento genético. Estas estimativas podem auxiliar a determinar quais características fenotípicas estão sob controle genético e podem, portanto, serem moldadas por seleção artificial.

Assim, o objetivo deste trabalho foi estimar a variação genética intrapopulacional em caracteres ligados ao *fitness* em *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae), por meio de estimativas de herdabilidade entre mães e filhas e análise entre famílias. Além disto, foi avaliada a resposta à seleção para a fecundidade, visando identificar o potencial de seleção desta característica para o melhoramento de agentes de controle biológico.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Herdabilidade de caracteres ligados ao *fitness* em *Trichogramma galloi*

A herdabilidade de uma característica pode ser estimada por meio do coeficiente de regressão linear (b) obtido entre a média da prole *versus* a média dos pais ($h^2 = b$) (FALCONER, 1981). Neste caso, apenas mães e filhas foram utilizadas nos experimentos, uma vez que a maioria das características avaliadas somente podem ser medidas nas fêmeas. Sendo assim, uma regressão do modelo mãe-filha foi utilizada para determinar a

herdabilidade (h^2) de cinco parâmetros relacionados ao *fitness* de *T. galloi* (fecundidade, porcentagem de emergência, longevidade, número de parasitoides por ovo do hospedeiro e razão sexual da progênie) por duas gerações sucessivas. As estimativas de herdabilidade foram estimadas para o desempenho no hospedeiro natural, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), a partir de fêmeas provenientes da população mantida neste hospedeiro.

Fêmeas de *T. galloi* ($n = 36$) provenientes da população mantida em ovos de *D. saccharalis* foram submetidas ao parasitismo em ovos (24h de idade) deste mesmo hospedeiro por um período de 48 horas. Após a emergência, foi permitido o acasalamento entre a progênie de cada fêmea, por um período de 24 horas, a fim de se reduzir a variabilidade genética. Após o acasalamento, duas fêmeas provenientes de cada prole foram selecionadas aleatoriamente e o *fitness* foi estimado no hospedeiro natural.

O experimento foi realizado em condições controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas) e a herdabilidade foi determinada utilizando-se mães e filhas amostradas no mesmo hospedeiro para que a variação observada fosse apenas um componente genético (controle ‘ambiental’). Os dados foram transformados logaritmicamente para atender os pressupostos da normalidade. Foi utilizada uma análise de *Bootstrap* (10.000 reamostragens) para calcular o intervalo de confiança (95%) das estimativas de herdabilidade e valor de p foi calculado por meio de permutações (10.000 iterações) no programa R versão 3.2.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015).

3.2.2 Influência do hospedeiro na expressão do fenótipo em *Trichogramma galloi*

Para determinar se a expressão de um fenótipo é influenciada pelo hospedeiro foi feita uma comparação a partir de irmãs de uma mesma família, as quais foram submetidas ao parasitismo em hospedeiros diferentes (Figura 1). Fêmeas de *T. galloi* ($n = 10$) provenientes da população mantida em *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) foram submetidas ao parasitismo em ovos (24h de idade) deste mesmo hospedeiro por um período de 48 horas. Após a emergência, foi permitido o acasalamento entre a progênie de cada fêmea, por um período de 24 horas, a fim de se reduzir a variabilidade genética. Após o acasalamento, quatro fêmeas provenientes de cada prole foram selecionadas aleatoriamente e o *fitness* foi estimado em ambos hospedeiros (duas fêmeas no hospedeiro natural e duas fêmeas no hospedeiro alternativo). Neste experimento, o número total de descendentes que emergiram foi utilizado como medida do *fitness*. O número total de ovos parasitados não foi utilizado, pois este

número seria influenciado pelo tamanho do ovo do hospedeiro, uma vez que o número de ovos alocados por ovo do hospedeiro por *T. galloi* é de um para *A. kuehniella* e de dois para *D. saccharalis*. O experimento foi realizado em câmara climatizada com condições de temperatura, umidade e fotoperíodo controladas ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas). A relação entre irmãs mantidas em hospedeiros diferentes foi analisada utilizando-se uma regressão linear, onde a média de irmãs mantidas em *A. kuehniella* foi plotada contra a média de irmãs mantidas em *D. saccharalis*, utilizando-se o programa R versão 3.2.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015).

Figura 1 - Delineamento experimental utilizado para comparar o desempenho de irmãs de uma mesma família que foram submetidas ao parasitismo em diferentes hospedeiros. As fêmeas acasaladas foram escolhidas aleatoriamente na população. As filhas acasalaram com os próprios irmãos a fim de aumentar a relação genética entre a geração das mães e filhas. No total foram formadas 10 famílias e avaliadas quatro filhas por família, totalizando 40 filhas

3.2.3 Quantificação da variação genética na fecundidade de *Trichogramma galloi*

Posteriormente, uma abordagem complementar foi utilizada para quantificar a variação genética no parâmetro fecundidade. Por meio do método de isolinhas (*isofemale line* ou *family analysis*), a variação na fecundidade foi comparada entre a progênie proveniente de fêmeas (mães) acasaladas aleatoriamente. Foram utilizados os dados obtidos no experimento de herdabilidade (regressão mãe-filha), para um total de 35 famílias e 70 filhas (duas filhas por família) (Figura 2); porém, uma amostra foi retirada da análise por se tratar de um *outlier*.

A análise da variância (one-way ANOVA) foi utilizada para avaliar diferenças significativas entre os valores médios das diferentes famílias estudadas, por meio do programa R versão 3.2.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015).

Figura 2 - Delineamento experimental utilizado para quantificar a variação genética na fecundidade. Foram utilizadas fêmeas acasaladas aleatoriamente. Foi permitido o acasalamento entre a progênie de cada fêmea. No total foram formadas 35 famílias e avaliadas duas filhas por família, totalizando 70 filhas

3.2.4 Resposta à seleção para a fecundidade em *Trichogramma galloi*

Foi realizado um estudo piloto para determinar a resposta à seleção para a fecundidade de fêmeas de *T. galloi*. Para isto, 50 fêmeas de *T. galloi* provenientes da população mantida em *A. kuehniella* foram submetidas ao parasitismo em ovos (24h de idade) deste mesmo hospedeiro por um período de 48 horas. As fêmeas foram acasaladas aleatoriamente com machos da mesma população e após o parasitismo, 20% das fêmeas que apresentaram os maiores valores de fecundidade foram selecionadas para dar origem à próxima geração. Foi permitido o acasalamento entre a prole destas fêmeas por 24 horas e após este período, foram selecionadas novamente 50 fêmeas para avaliar a resposta à seleção. Foram oferecidos ovos (24h de idade) de *A. kuehniella* por um período de 48 horas. Após este período foi determinada a fecundidade da progênie da população selecionada. O experimento foi realizado em condições de temperatura, umidade e fotoperíodo controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas).

3.3 Resultados

Herdabilidade de caracteres ligados ao fitness em *Trichogramma galloi*

As estimativas de herdabilidade foram obtidas para o desempenho no hospedeiro natural (*D. saccharalis*) a partir de fêmeas provenientes da população mantida neste hospedeiro. Dentre os cinco parâmetros relacionados ao *fitness* avaliados neste experimento, apenas para o parâmetro fecundidade a regressão modelo mãe-filha foi significativa, ou seja, a hipótese testada de que as médias das mães podem prever as médias das filhas foi

significativa (Tabela 1, Figura 3a). Os maiores valores de herdabilidade foram observados para a fecundidade ($h^2 = 0.46 \pm 0.20$, $P = 0.02$), seguido da longevidade ($h^2 = 0.29 \pm 0.16$, $P = 0.07$). Ainda que a estimativa da longevidade não tenha sido significativa, a herdabilidade é considerada alta (ROFF; MOUSSEAU, 1987) (Figura 3b).

Tabela 1 - Estimativas de herdabilidade (h^2) da regressão modelo mãe-filha, utilizando mães e filhas de *Trichogramma galloi* mantidas no hospedeiro natural, *Diatraea saccharalis*

<i>Parâmetro</i>	<i>$h^2 \pm$ erro padrão</i>	<i>P</i>	<i>IC¹</i>
Fecundidade	0.46 ± 0.20	0.0232	(0.04 – 0.81)
Emergência	-0.08 ± 0.20	0.6431	(-0.53 – 0.30)
Longevidade	0.29 ± 0.16	0.071	(-0.06 – 0.60)
Parasitoides/ovo	-0.27 ± 0.23	0.8812	(-0.80 – 0.09)
Razão sexual	-0.03 ± 0.32	0.5152	(-0.83 – 0.44)

¹ Intervalo de confiança.

(A)

(B)

Figura 3 - Regressão modelo mãe-filha dos parâmetros fecundidade (a) e longevidade (b) para parasitoides provenientes da população de *Trichogramma galloi* mantida no hospedeiro natural, *Diatraea saccharalis*. Cada ponto no gráfico representa uma família, com a fecundidade ou a longevidade das mães no eixo x e a média da fecundidade ou longevidade da progênie de suas duas filhas no eixo y

Influência do hospedeiro na expressão do fenótipo em *Trichogramma galloi*

Não foi detectada nenhuma relação entre irmãs de uma mesma família mantidas em hospedeiros diferentes ($F_{1,8} = 0.2298$, $r^2 = -0.09$, $P = 0.6445$).

Quantificação da variação genética na fecundidade de *Trichogramma galloi*

Foi encontrada variação significativa na fecundidade entre as diferentes famílias avaliadas ($F_{1,68} = 4.121$, $P = 0.0463$) (Figura 4). Estes resultados juntamente como os resultados obtidos para a herdabilidade deste parâmetro confirmam a existência de um componente genético aditivo significativo na variabilidade fenotípica observada.

Figura 4 – Número de ovos parasitados por fêmea ($\pm$ erro padrão) em 35 “famílias” de *Trichogramma galloi* sobre o hospedeiro natural *Diatraea saccharalis*

Resposta à seleção para a fecundidade em *Trichogramma galloi*

Após selecionar 20% das fêmeas que apresentaram maior fecundidade para formar a próxima geração, pôde-se observar que houve um deslocamento na frequência do número de ovos parasitados (Figura 5). É possível observar que um maior número de fêmeas da população selecionada apresentou fecundidade entre 35 e 45 ovos parasitados, enquanto que na população original a maior frequência foi observada entre 15 e 35 ovos parasitados (Figura 5). No entanto, após a seleção imposta um grande número de fêmeas não parasitou.

O número médio de ovos parasitados na população original foi de 22.34 ± 1.32 , não levando-se em consideração sete fêmeas que não parasitaram. Por outro lado, a fecundidade da população selecionada, neste caso das 26 fêmeas que parasitaram, foi de 37.07 ± 2.04 ovos parasitados.

Figura 5 - Frequência do número de ovos do hospedeiro alternativo parasitados pela população original (azul) e pela população selecionada (cinza) de *Trichogramma galloi*.

3.4 Discussão

A variação genética em populações de inimigos naturais utilizadas em programas de controle biológico ainda é pouco estudada. Para aumentar a probabilidade de estabelecimento e controle em campo é preciso que as populações liberadas apresentem uma variabilidade genética significativa (WAJNBERG, 1991).

As estimativas de herdabilidade em populações dependem da divisão da variação fenotípica observada em fatores genéticos e ambientais (VISSCHER; HILL; WRAY, 2008). A herdabilidade é uma estimativa específica para a população e o ambiente que está sendo analisado, e ela indica a proporção da variação fenotípica que é resultado de fatores genéticos (VISSCHER; HILL; WRAY, 2008). Mais especificamente, a herdabilidade no sentido restrito (h^2) indica a porcentagem de semelhança devido à variação genética em locos com efeitos aditivos.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram haver variância genética aditiva significativa na fecundidade de *T. galloi* (Tabela 1). É possível afirmar que, em média, 46% da variância fenotípica na característica fecundidade é determinada pela variância genética

aditiva, sendo os outros 54% devido à variância ambiental e componentes genéticos dominantes. Já para a longevidade, ainda que a herdabilidade não tenha sido estatisticamente significativa, 29% da variância fenotípica pode ser explicada pela variância genética aditiva, sendo os demais 71% devido a variações ambientais e componentes genéticos dominantes. Estes valores podem ser considerados altos, uma vez que, na maioria dos casos, parâmetros relacionados ao *fitness* apresentam herdabilidade entre 0.1 - 0.3 (ROFF; MOUSSEAU, 1987; VISSCHER; HILL; WRAY, 2008). No entanto, alguns trabalhos têm registrado alta herdabilidade para parâmetros como fecundidade (LONG et al., 2009; HENRY et al., 2010), fertilidade e tempo de desenvolvimento larval (QUEZADA-GARCÍA; BAUCE, 2014) em insetos, indicando que apesar da seleção direcional atuar em populações de laboratório é possível que certa variação genética seja mantida (LONG et al., 2009), seja por mutações, seja por interações antagônicas entre características (ROFF; MOUSSEAU, 1987).

Para os demais parâmetros avaliados não foram observados valores significativos, indicando que estas características podem ser determinadas principalmente pelas condições ambientais, ou ainda, que estas características sofram influência materna ou tenham atingido a fixação de alelos via seleção direcional ou seleção contra alelos deletérios (*background selection*) (Tabela 1).

A relação entre irmãs de uma mesma família, avaliadas em diferentes hospedeiros, nos permite investigar a influência do ambiente (neste caso o hospedeiro) na expressão do fenótipo. Os resultados indicaram não haver nenhuma relação entre parasitoides mantidos em diferentes hospedeiros, ou seja, não houve influência do hospedeiro na expressão do fenótipo e nem foram observados *trade-offs*. Uma correlação negativa foi observada para o parasitoide *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae), onde foi possível detectar *trade-offs* na capacidade do parasitoide parasitar, com sucesso, duas espécies de pulgões (HENRY et al., 2010).

A comparação entre diferentes famílias mostrou haver variação significativa na fecundidade. A variabilidade fenotípica observada na fecundidade é resultado, em grande parte, de fatores genéticos, como também pôde ser observado pela estimativa de herdabilidade deste parâmetro.

Variação significativa em características relacionadas ao sucesso reprodutivo de espécies do gênero *Trichogramma* foram observadas em alguns estudos, entre elas a variação no número de ovos parasitados, na razão sexual e alocação da progênie (WAJNBERG; PIZZOL; BABAUT, 1989, CHASSAIN; BOULÉTREAU, 1991; WAJNBERG, 1991, 1994).

A existência de variação genética significativa na fecundidade faz com que seja possível avaliar a resposta à seleção neste caráter. Experimentos de seleção são mecanismos essenciais para a compreensão da evolução de características biológicas e nos permitem observar os padrões evolutivos de variação sob condições controladas (SCHEINER, 2002; FULLER; BAER; TRAVIS, 2005).

Em experimentos de seleção artificial, os indivíduos que darão origem à próxima geração, são escolhidos com base em valores específicos para uma determinada característica. Neste trabalho, apenas 20% das fêmeas com maior valor de fecundidade foram escolhidas para constituir a próxima geração. Com este delineamento, foi possível observar um deslocamento na frequência do número de ovos parasitados da população selecionada em comparação à população original (Figura 5), reforçando a hipótese de que a variação fenotípica observada está sob controle genético significativo. Esta mudança observada nas médias da fecundidade constitui um passo inicial para programas de melhoramento de agentes de controle biológico. Porém, para obtenção de resultados mais precisos é necessário aumentar o esforço amostral tanto para as estimativas de herdabilidade quanto para experimentos de seleção, a fim de diminuir o erro experimental. Além disto, é preciso que sejam feitas avaliações em condições de campo, visando confirmar se populações selecionadas em laboratório apresentam maior eficiência em condições naturais.

Efeitos negativos da seleção podem ter sido o motivo pelo qual muitas fêmeas não parasitaram. Possivelmente devido ao menor tamanho efetivo da população selecionada, a fixação de alelos deletérios e outras interações podem ter resultado na baixa taxa de resposta das fêmeas. Estudos mais aprofundados são necessários para se investigar respostas adversas da seleção artificial.

3.5 Conclusão

Apesar de a seleção direcional atuar em populações de laboratório, como visto no capítulo anterior (capítulo 2), uma quantidade substancial de variação genética foi encontrada para a fecundidade de *T. galloi* no presente estudo. A variação genética observada e os resultados preliminares de seleção artificial demonstram o potencial deste método em selecionar características ligadas ao *fitness* em parasitoides, podendo assim aumentar a eficiência destes agentes em programas de controle biológico. Além disto, a seleção de uma determinada característica pode servir de base para estudos em características correlacionadas.

Referências

- ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. 642p.
- CHASSAIN, C.; BOULÉTREAU, M. Genetic variability in quantitative traits of host exploitation in *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Genetica**, Dodrecht, v. 83, p. 195-202, 1991.
- FALCONER, D.S. **Introduction to Quantitative Genetics**. 2nd .ed. New York: Longman, 1981. 340p.
- FISHER, R.A. **The Genetical Theory of Natural Selection**. Oxford: Clarendon Press, 1930. 272p.
- FULLER, R.C.; BAER, C.F.; TRAVIS, J. How and when selection experiments might actually be useful. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, UK, v. 45, p. 391- 404, 2005.
- HENRY, L.M.; MAY, N.; ACHEAMPONG, S.; GILLESPIE, D.R.; ROITBERG, B.D. Host-adapted parasitoids in biological control: does source matter? **Ecological Applications**, Washington, DC, v. 20, p. 242-250, 2010.
- HOPPER, K.R.; ROUSH, R.T.; POWELL, W. Management of genetics of biological control introductions. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 38, p. 27–51, 1993.
- KO, K.; LIU, Y.; HOU, M.; BABENDREIER, D.; ZHANG, F.; SONG, K. Evaluation for potential *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) strains for control of the striped stem borer (Lepidoptera: Crambidae) in the greater Mekong subregion. **Journal of Economic Entomology**, Cary, v. 107, p. 955–963, 2014.
- LONG, T.A.; MILLER, P.M.; STEWART, A.D.; RICE, W.R. Estimating the heritability of female lifetime fecundity in a locally adapted *Drosophila melanogaster* population. **Journal of Evolutionary Biology**, Chichester, v. 22, p. 637-643, 2009.
- MOUSSEAU, T.A.; ROFF, D.A. Natural selection and the heritability of fitness components. **Heredity**, London, v. 59, p. 181-197, 1987.
- PRATISSOLI, D.; PARRA, J.R.P. Seleção de linhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera, Trichogrammatidae) para o controle das traças *Tuta absoluta* (Meyrick) e *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical Entomology**, Dordrecht, v. 30, p. 277 – 282, 2001.
- QUEZADA-GARCIA, R.; BAUCE, E. Heritability of life-history traits in the spruce budworm. **Entomological Science**, Richmond, v. 17, p. 111–117, 2014.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2015. URL <http://www.R-project.org/>.

ROFF, D.A.; MOUSSEAU, T.A. Quantitative genetics and fitness: lessons from *Drosophila*. **Heredity**, London, v. 58, p. 103-118, 1987.

SAOUR, G. Efficacy assessment of some *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in controlling the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zell. (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 77, p. 229-234, 2004.

SCHEINER, M.S. Selection experiments and the study of phenotypic plasticity. **Journal of Evolutionary Biology**, Chichester, v. 15, p. 889–898, 2002.

TABONE E.; BARDON, C.; DESNEUX, N.; WAJNBERG, E. Parasitism of different *Trichogramma* species and strains on *Plutella xylostella* L. on greenhouse cauliflower. **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 83, n. 3, p. 251-256, 2010.

VISSCHER, P.M.; HILL, W.G.; WRAY, N.R. Heritability in the genomics era – concepts and misconceptions. **Nature Review Genetics**, London, v. 9, n. 4, p. 255–266, 2008.

WAJNBERG, E. Quality control of mass-reared arthropods: a genetical and statistical approach. In: BIGLER, F. (Ed.) **Proceedings of the 5th Workshop on Quality Control of Mass-reared Arthropods**. Wageningen, 1991. p. 15-25.

_____. Intra-population genetic variation in *Trichogramma*. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S.A. (Ed.). **Biological control with egg parasitoids**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 245-271.

_____. Measuring genetic variation in natural enemies used for biological control. Why and How? In: EHLE, L.; SFORZA, R.; MATEILLE, T. (Ed.). **Genetics, Evolution and Biological Control**. Wallingford: CAB International, 2004. p. 19–37.

WAJNBERG, E.; PIZZOL, J.; BABAU, M. Genetic variation in progeny allocation in *Trichogramma maidis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Chichester, v. 53, p. 177-187, 1989.

WAJNBERG E.; CURTY, C.; JERVIS, M. Intra-Population genetic variation in the temporal pattern of egg maturation in a parasitoid wasp. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, e45915, doi:10.1371/journal.pone.0045915, 2012.

WU, L.H.; HOFFMANN, A.A.; THOMSON, L.J. *Trichogramma* parasitoids for control of Lepidopteran borers in Taiwan: species, life-history traits and *Wolbachia* infections. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, doi: 10.1111/jen.12263, 2015.

4 HIBRIDIZAÇÃO INTRAESPECÍFICA E A RECUPERAÇÃO DO *FITNESS* EM *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)

Resumo

A hibridização intraespecífica pode ser um método relevante e eficaz para aumentar a aptidão biológica de agentes de controle biológico. O cruzamento entre indivíduos provenientes de populações geneticamente distintas pode gerar descendentes que apresentam maior *fitness* que seus genitores (heterose/ vigor do híbrido). Além disto, o cruzamento entre populações divergentes proporciona um aumento na variância genética de parâmetros fenotípicos relevantes, podendo contribuir para aumentar a variabilidade genética passível de seleção artificial em programas de melhoramento genético. Por outro lado, a hibridização intraespecífica pode causar a perda da combinação de alelos únicos (genótipos) que existem em cada população, os quais, por sua vez, podem ser importantes para adaptações às condições particulares de cada ambiente. Como consequência da introdução de alelos exógenos na população, um decréscimo no *fitness* dos híbridos em relação à geração parental não híbrida pode vir a ser observado (depressão por exogamia). Neste trabalho, foram investigados os efeitos da hibridização intraespecífica cruzando reciprocamente três populações do parasitoide *Trichogramma galloi*, um agente de controle biológico utilizado para o controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*. Os cruzamentos foram realizados entre populações provenientes da Bahia (BA) e Minas Gerais (população MG e população Santa Vitória – SV). O número de cruzamentos que produziram filhas viáveis não foi afetado pelo tipo de cruzamento. Cruzamentos homotípicos, aqueles onde ambos os pais pertencem à mesma população produziram, em média, 94% de filhas viáveis, enquanto que, cruzamentos heterotípicos, ou seja, entre parentais de diferentes populações produziram, em média, 92%. Os valores de I_{PSI} e IA_{PSI} , índices utilizados para detectar isolamento sexual e assimetria nos acasalamentos, respectivamente, não foram significativos, demonstrando não haver incompatibilidade nos acasalamentos nem barreiras reprodutivas entre as populações. No entanto, observou-se um baixo valor de *fitness* (estimador W) para fêmeas da população SV, o que combinado com sua baixa fecundidade, suportam a hipótese de que a população sofra de depressão por endogamia. Os resultados também fornecem evidência da recuperação do *fitness* em híbridos (F1) obtidos a partir desta população, o que foi observado comparando-se a fecundidade entre a população parental ($SV♀SV♂$ 19.76 ± 4.02 hospedeiros parasitados) com três populações híbridas ($SV♀BA♂$ 30.27 ± 3.88 ; $BA♀SV♂$ 37.22 ± 2.92 ; $MG♀SV♂$ 30.26 ± 3.48 hospedeiros parasitados). O desempenho dos híbridos em relação aos melhores pais não sugeriu heterose e nem foram observados valores de *fitness* inferiores aos piores pais. Contudo, os resultados deste trabalho indicam que a mistura entre populações pode ser uma ferramenta útil para melhorar o desempenho de populações que estejam sofrendo de depressão por endogamia.

Palavras-chave: Hibridização intraespecífica; Melhoramento genético; Controle biológico; *Fitness*; Depressão por endogamia

Abstract

Intraspecific hybridization may be a relevant method to enhance biological control agents' fitness. Crossing between individuals from genetically distant populations can generate offspring with increased fitness over their parents (heterosis or hybrid vigor). Intraspecific hybridization is also expected to increase genetic variance for relevant phenotypic traits, enhancing genetic variability subject to artificial selection in genetic improvement programs. Alternatively, another effect of intraspecific hybridization is outbreeding depression which can lead to reduced fitness as a result of the introduction of exogenous alleles in the population. The effects of intraspecific hybridization were investigated by reciprocally crossing three populations of the parasitoid wasp *Trichogramma galloi*, a biocontrol agent of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. Crosses were performed among populations from Bahia state (BA) and Minas Gerais state (MG population and population Santa Vitória – SV). The number of crosses producing viable daughters was not affected by the mating type. Homotypic crosses, that is crosses between the same parental populations, produced 94% of viable daughters while heterotypic crosses, between parental from different populations produced 92% of viable daughters. The I_{PSI} and IA_{PSI} values, indices used here to detect sexual isolation and asymmetric mating compatibilities, respectively, were not significant, showing that there were neither mating incompatibilities nor reproductive barriers between populations. However, we observed a low fitness value (W , cross-product estimator) for females from the SV population, which combined with its low fecundity supports the hypothesis that the population suffers from inbreeding depression. Our results also provide evidence of the recovery of fitness in hybrids (F1) obtained from this population, which was observed comparing fecundity between the parental population ($SV♀SV♂$ 19.76 ± 4.02 parasitized hosts) with tree of the associated hybrids ($SV♀BA♂$ 30.27 ± 3.88 ; $BA♀SV♂$ 37.22 ± 2.92 ; $MG♀SV♂$ 30.26 ± 3.48 parasitized hosts). The performance of other hybrids relative to the best parent did not suggest heterosis, nor were observed lower fitness values compared to the lowest parent. However, results of this study indicate that the admixture between populations may be a useful tool to improve the performance of captive populations that are suffering from inbreeding depression.

Keywords: Intraspecific hybridization; Genetic improvement; Biological control; Fitness; Inbreeding depression

4.1 Introdução

A hibridização intraespecífica pode ser um método relevante e eficaz para aumentar a aptidão biológica de agentes de controle. O cruzamento entre populações divergentes pode levar a heterose, ou seja, um aumento na aptidão da prole híbrida e/ ou ao aumento da variância genética em parâmetros fenotípicos relevantes (FACON et al., 2011; BENVENUTO et al., 2012; SZUCS et al., 2012). Além disto, o cruzamento entre populações distintas ou geneticamente distantes pode trazer variação genética capaz de minimizar efeitos negativos da depressão por endogamia (WHITLOCK; INGVARSSON; HATFIELD, 2000). Szucs et al. (2012) verificaram um aumento no vigor da progênie dos cruzamentos entre duas populações do agente de controle biológico *Longitarsus jacobaeae* (Coleoptera: Chrysomelidae) e, por meio de avaliações da geração F2, sugerem que o aumento no *fitness* possa persistir nas gerações seguintes (SZUCS et al., 2012). A utilização de híbridos de *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) para o controle de pulgões também se mostrou mais eficiente em comparação à utilização de isolinhas da espécie (SEKO; MIYATAKE; MIURA, 2012).

Por outro lado, a hibridização pode causar a perda da combinação de alelos únicos (genótipos) que existem em cada população, os quais, por sua vez, podem ser importantes para adaptações locais (LYNCH; WALSH, 1998; BURKE; ARNOLD, 2001; EDMANDS, 2007). Como consequência, um decréscimo no *fitness* médio dos híbridos em relação à geração parental não híbrida pode vir a ser observado, caracterizando o fenômeno conhecido por depressão por exogamia (ALLENDORF; LUIKART, 2007; EDMANDS, 2007). Acredita-se que os efeitos negativos da hibridização sejam mais severos na segunda geração ou gerações seguintes; no entanto, dentre os poucos trabalhos em que os efeitos da hibridização foram avaliados além da primeira ou segunda gerações, as evidências indicam que a depressão por exogamia não é um fenômeno duradouro (EDMANDS et al., 2005; EDMANDS, 2007; HWANG et al., 2011; PEKKALA et al., 2012).

Estudos recentes têm tentado definir indicadores de qualidade dos híbridos através de distâncias genéticas e fenotípicas entre os progenitores (BENVENUTO et al., 2012). Estas estimativas são promissoras, pois permitem inferir o *fitness* de híbridos sem a necessidade de realizar inúmeros cruzamentos em laboratório. Através do cruzamento entre sete populações do parasitoide de ovos, *Trichogramma chilonis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), foi possível determinar o *fitness* ótimo de híbridos através da distância molecular entre os pais, o que pode futuramente auxiliar programas de melhoramento genético da espécie

(BENVENUTO et al., 2012). Nestes cruzamentos, 16% dos híbridos (F1) apresentaram um *fitness* menor em relação aos seus progenitores, enquanto que, 29% apresentaram *fitness* superior, indicando a ocorrência de heterose. O restabelecimento do *fitness* em híbridos de uma população que sofria os efeitos da endogamia também foi observado após a hibridização (BENVENUTO et al., 2012).

Apesar de a recombinação poder diminuir os efeitos da heterose ao longo do tempo, os híbridos com maior *fitness* nas primeiras gerações irão produzir uma prole numerosa com novas combinações de características e genótipos, aumentando a chance de que alguns recombinantes possam melhor se adaptar ao ambiente do que as populações parentais e assim, serem favorecidos pela seleção natural (JOHANSEN-MORRIS; LATTA, 2006). É esperado que híbridos com maior *fitness* que seus progenitores se adaptem mais satisfatoriamente a novos ambientes ou condições heterogêneas (FACON et al., 2008), podendo assim, no caso de agentes de controle biológico, haver uma maior probabilidade de estabelecimento e controle em campo e um aumento na viabilidade de populações de laboratório que estejam sofrendo os efeitos da deriva genética e da depressão por endogamia (SEKO; MIYATAKE; MIURA, 2012).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de cruzamentos intraespecíficos no *fitness* de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) sobre o hospedeiro alternativo, visando melhorar a aptidão biológica deste agente de controle.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Populações de *Trichogramma galloi* utilizadas nos cruzamentos

Foram utilizadas três populações originalmente coletadas em diferentes locais: duas populações provenientes de Minas Gerais, sendo uma delas de Santa Vitória e a outra de local desconhecido e, uma população da Bahia (Tabela 1). Todas as populações foram mantidas em ovos do hospedeiro alternativo, *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae).

Tabela 1 - Origem e sigla das populações de *Trichogramma galloi* utilizadas nos experimentos de hibridização intraespecífica

Origem da população	Sigla
Bahia	BA
Minas Gerais	MG
Santa Vitória - MG	SV

4.2.2 Detecção de *Wolbachia* em populações de *Trichogramma galloi*

A presença de *Wolbachia*, um endossimbionte envolvido na criação de barreiras reprodutivas em artrópodes (STOUTHAMER; BREEUWER; HURST, 1999; ENGELSTÄDTER; HURST, 2009), foi testada em indivíduos de cada população antes da realização dos cruzamentos intraespecíficos. A presença ou ausência de *Wolbachia* nos indivíduos das populações estudadas foi verificada através de PCR diagnóstico utilizando *primers* específicos que permitem a amplificação do fragmento do gene *wsp* responsável pela produção de proteína específica da parede celular deste simbionte.

4.2.2.1 Extração do DNA genômico

Os exemplares de cada população foram removidos do etanol e colocados individualmente no interior de tubos de 1,5 ml à temperatura ambiente até a completa evaporação do etanol. Após a secagem, foram adicionados 80µl de solução de Chelex a 10% e 8µl de proteinase K a 20mg/mL. O material foi macerado com auxílio de um pistilo e incubado a 95°C em bloco térmico por 20 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante recuperado. Ao sobrenadante foram adicionados 20µg de glicogênio, 0,6 volumes de isopropanol e 0,1 volumes de acetato de sódio 3M (pH 5.2) para a precipitação do DNA. O material foi incubado a -80°C por 30 minutos e posteriormente, centrifugado (17000 g x 30 minutos). O sobrenadante foi descartado e o pellet de DNA lavado em banhos sucessivos de 85% etanol e centrifugado (17000 g) por 10 minutos. Ao término das lavagens, o pellet de DNA foi mantido a 65°C por aproximadamente 5 minutos para completa evaporação do etanol, sendo posteriormente ressuspensão em 10µl de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, com pH 8,0) e incubado a 37°C por 30 minutos. Por fim, o material foi armazenado a -20°C até sua utilização.

4.2.2.2 Detecção de *Wolbachia*

A presença de *Wolbachia* nos indivíduos de *T. galloi* das populações que foram utilizadas nos cruzamentos foi diagnosticada pela amplificação de fragmento do gene *wsp* responsável pela produção de proteína específica da parede celular deste simbionte, utilizando-se os iniciadores específicos *wsp* 81F (5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAA

C-3') e *wsp* 691R (5'-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3'), em reação de PCR programada a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min (35 ciclos); seguido de extensão final a 72°C por 5 min (1 ciclo) (BRAIG et al., 1998). As reações foram realizadas em volume total de 25µL, contendo 1µL de gDNA, 1x PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂ 200µM cada dNTP, 0,32 µM de cada iniciador e 0,5 U Taq polimerase.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizados em transluminador (UV) acoplado ao sistema de captura e digitalização de imagens.

Amostras que testaram negativas no PCR diagnóstico inicial foram submetidas à reamplificação em reação aninhada com os iniciadores *wsp* 106F (5'-GGATAGTCCCTTAACAAGAT -3') e *wsp* 460R (5'- TTGATTTCTGGAGTTACATC-3'), utilizando condições idênticas àquelas descritas anteriormente para o outro conjunto de *primers*.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizados em transluminador (UV) acoplado ao sistema de captura e digitalização de imagens, para confirmação da ocorrência de *Wolbachia* nas amostras anteriormente classificadas como negativas. Em todas as reações foram utilizadas como controle positivo um indivíduo de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) infectado por *Wolbachia*.

4.2.2.3 Produção de linhagens aposimbiontes

Após a confirmação da infecção por *Wolbachia* nas duas populações provenientes de Minas Gerais, foram selecionados aleatoriamente indivíduos das duas populações para a produção de linhagens irmãs, livres de *Wolbachia*.

Para isto, parte dos indivíduos de cada população foi alimentada com mel puro, mantendo sua associação com *Wolbachia* (W⁺), enquanto que a outra parte foi alimentada com mel puro acrescido de antibiótico (0.25% de tetraciclina) para a produção das linhagens irmãs, livres da bactéria (W⁻) (STOUTHAMER; LUCK; HAMILTON, 1990).

A cada geração, novos indivíduos foram selecionados e alimentados para cada uma das linhagens (W⁺/ W⁻) conforme descrito anteriormente, até a completa eliminação de *Wolbachia*. Após três gerações, fêmeas das duas populações foram selecionadas aleatoriamente para realização de PCR diagnósticos visando confirmar a eliminação da bactéria.

4.2.3 Cruzamentos intraespecíficos entre três populações de *Trichogramma galloi*

As três populações foram utilizadas em cruzamentos do tipo dialelo completo (incluindo os cruzamentos recíprocos), onde os genitores foram testados aos pares (Figura 1). Para cada cruzamento foram formados 25 casais. Foram oferecidos aproximadamente 100 ovos (24h de idade) de *A. kuehniella* por um período de 48 horas para oviposição e o sucesso reprodutivo foi avaliado verificando-se a presença de fêmeas na progênie produzida.

Foi permitido o acasalamento entre a progênie e, após 24 horas, duas fêmeas provenientes de cada cruzamento foram isoladas em tubos de vidro contendo ovos (24h de idade) de *A. kuehniella* para oviposição. O número total de ovos parasitados por fêmea foi utilizado como medida de *fitness*.

Para cada cruzamento foi calculada a proporção de casais que deram origem a pelo menos uma filha viável. Estes valores foram analisados por meio de um modelo linear generalizado misto, onde a variável explanatória fixa foi o tipo de acasalamento (homotípico: ambos os pais pertencem a mesma população; heterotípico: os pais pertencem a diferentes populações) e as variáveis aleatórias, o bloco e o local de origem da população.

A fecundidade da geração parental foi analisada por meio de um modelo linear e as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey ($\alpha = 0.05$). Todos os dados foram analisados utilizando-se o programa R versão 3.2.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015).

	SV♀	MG♀	BA♀
SV♂	SV♂ SV♀	SV♂ MG♀	SV♂ BA♀
MG♂	MG♂ SV♀	MG♂ MG♀	MG♂ BA♀
BA♂	BA♂ SV♀	BA♂ MG♀	BA♂ BA♀

Figura 1 - Representação do delineamento experimental utilizado nos cruzamentos intraespecíficos (dialelo completo) entre populações de *Trichogramma galloi* (SV: Santa Vitória/ MG; MG: Minas Gerais e BA: Bahia) sobre o hospedeiro alternativo, *Anagasta kuehniella*

4.2.3.1 Avaliação do grau de isolamento reprodutivo entre três populações de *Trichogramma galloi*

Para medir o grau de isolamento sexual foram utilizados três estimadores: I_{PSI} , IA_{PSI} e W (ROLÁN-ALVAREZ; CABALLERO, 2000). O estimador I_{PSI} foi utilizado para estimar o grau de isolamento sexual entre linhagens de progenitores. Os valores podem variar de -1 (acasalamentos heterotípicos), 0 (acasalamentos ao acaso), até +1 (acasalamentos homotípicos).

O índice de assimetria (IA_{PSI}) foi utilizado para quantificar a assimetria entre os acasalamentos ($\text{♀}x$ acasalada com $\text{♂}y$, versus $\text{♀}y$ acasalada com $\text{♂}x$). Valores diferentes de 1 (simetria) indicam assimetria nos acasalamentos.

O estimador de *fitness* W foi utilizado para medir o sucesso dos acasalamentos de cada população em relação à população mais bem sucedida. Uma análise de *bootstrap* (10.000 iterações) foi utilizada para calcular o desvio padrão destes parâmetros, bem como, os desvios em relação aos limiares (0, 1 e 1, para I_{PSI} , IA_{PSI} e W , respectivamente). Todos os índices foram estimados através do programa JMATING (CARVAJAL-RODRIGUEZ; ROLÁN-ALVAREZ, 2006).

4.2.3.2 *Fitness* dos híbridos de *Trichogramma galloi*

O *fitness* dos híbridos (neste caso, das fêmeas) foi estimado utilizando-se dois estimadores: (i) BPH (“best parent heterosis”) definido como a diferença entre o *fitness* médio dos híbridos e o *fitness* médio do parental com desempenho superior; LPH (“lowest parent heterosis”) definido como a diferença entre o *fitness* médio dos híbridos e o *fitness* médio do parental com desempenho inferior. Cada híbrido foi testado contra o parental superior e inferior por meio de teste t pareado unilateral para detectar heterose ou redução no *fitness* utilizando-se o programa R versão 3.2.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015).

4.2.3.3 Análises complementares

Em alguns casos, ao cruzar populações diferentes foi observado um decréscimo na fecundidade, o que poderia indicar a ocorrência de algum tipo de incompatibilidade entre as populações. Portanto, nos casos em que foram observados valores de fecundidade inferiores aos observados na população parental SV (população parental com pior desempenho), foram

feitas comparações através do teste *t*, com a finalidade de verificar alterações na fecundidade associadas a possíveis incompatibilidades.

Visando verificar mudanças entre gerações foram comparados os cruzamentos entre diferentes populações com seus respectivos híbridos (ex.: cruzamento entre SV e MG com o híbrido SVMG). Os dados foram analisados utilizando-se o teste *t* e, o valor de *p* foi calculado através de permutações (10.000 iterações).

Por fim, com a finalidade de avaliar a recuperação do *fitness* em híbridos provenientes de cruzamentos envolvendo a população parental com pior desempenho (SV♀SV♂) foram feitas comparações através do teste *t*. Todas as análises foram realizadas no programa R versão 3.2.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015).

4.3 Resultados

4.3.1 Detecção de *Wolbachia* em populações de *Trichogramma galloi*

A amplificação do gene *wsp* indicou a ocorrência de *Wolbachia* em duas (população MG e população SV) das três populações que seriam utilizadas nos cruzamentos intraespecíficos. No entanto, a infecção em alguns indivíduos somente foi detectada após a reamplificação dos produtos da primeira PCR em reação aninhada (PCR *nested*).

Após a detecção da bactéria, as populações infectadas foram tratadas por três gerações com mel puro acrescido de antibiótico, até a completa eliminação da bactéria (Figura 2). Após a eliminação de *Wolbachia*, foram realizados os cruzamentos intraespecíficos.

Figura 2 - Gel de agarose (1%) com os produtos de amplificação. Ladder (marcador de peso molecular); colunas 1 a 10 (amostras das populações SV: Santa Vitória/ MG e MG: Minas Gerais) e coluna 11 (controle positivo: indivíduo de *Diaphorina citri* infectado com *Wolbachia*)

4.3.2 Cruzamentos intraespecíficos entre três populações de *Trichogramma galloi*

O número de filhas viáveis produzidas em cada cruzamento não foi afetado pelo tipo de acasalamento ($X^2 = 0.1081$, $gl = 1$, $P = 0.742$). Acasalamentos homotípicos produziram em média 94% de filhas viáveis, enquanto que acasalamentos heterotípicos resultaram em uma média de filhas viáveis de 92%. Entre os acasalamentos homotípicos a população com menor número de acasalamentos bem-sucedidos foi a população $SV \text{♀} SV \text{♂}$ (52%), enquanto que nos acasalamentos heterotípicos foram as populações $SV \text{♀} MG \text{♂}$ (36%) e $SV \text{♀} BA \text{♂}$ (44%) (Tabela 2).

A fecundidade dos parasitoides na geração parental apresentou diferenças significativas ($F_{2,72} = 4.938$, $P = 0.009$), sendo maior nas populações provenientes da Bahia (com média de 35 ovos parasitados) e Minas Gerais (MG, com média de 32 ovos parasitados). Já a menor fecundidade foi observada para a população de Santa Vitória (SV, com média de 19 ovos parasitados) (Figura 3).

Tabela 2 - Estimativas dos coeficientes de isolamento sexual (I_{PSI}) e índice de assimetria (IA_{PSI}) $\pm$ desvio padrão para cada cruzamento de *Trichogramma galloi* no hospedeiro alternativo, obtidos através de análise *bootstrap* com o programa JMATING

		SV ♂	MG ♂	BA ♂
SV ♀ ¹	n (tot)	13 (25)	9 (25)	11 (25)
	I_{PSI}		0.05 $\pm$ 0.13	0.06 $\pm$ 0.13
	IA_{PSI}		0.94 $\pm$ 0.13	0.95 $\pm$ 0.09
MG ♀	n (tot)	21 (25)	18 (25)	20 (25)
	I_{PSI}			0.01 $\pm$ 0.11
	IA_{PSI}			1.00 $\pm$ 0.03
BA ♀	n (tot)	20 (25)	21 (25)	22 (25)

n, número de acasalamentos bem sucedidos (presença de filhas viáveis);
tot, número total de cruzamentos realizados.

Figura 3 – Fecundidade ($\pm$ erro padrão) da geração parental em três populações de *Trichogramma galloi* (SV: Santa Vitória - MG; MG: Minas Gerais e BA: Bahia) mantidas sobre o hospedeiro alternativo

Foram observadas possíveis incompatibilidades entre as populações logo ao cruzá-las. É possível observar que a fecundidade nos cruzamentos $SV♀MG♂$ e $SV♀BA♂$ foi menor do que a dos híbridos da geração F1 (Tabela 3). Porém ao se comparar o *fitness* destes cruzamentos com o parental com desempenho inferior ($SV♀SV♂$) não foram verificadas diferenças significativas ($SV♀SV♂$ vs $SV♀BA♂$, $t = -0.95894$, $gl = 47.112$, $P = 0.1712$) ($SV♀SV♂$ vs $SV♀MG♂$, $t = -1.4835$, $gl = 47.249$, $P = 0.07229$) (Figuras 4a e b).

Tabela 3 - Comparação entre a fecundidade ($\pm$ erro padrão) dos cruzamentos entre diferentes populações de *Trichogramma galloi* e seus respectivos híbridos

Fecundidade ($\pm$ EP)		<i>t</i> (gl)	<i>P</i>
Cruzamentos ¹			
MG♀ x SV♂ ²	MGSV <i>h</i> ³		
36.80 $\pm$ 3.06	30.26 $\pm$ 3.48	1.40 (63.73)	0.202
BA♀ x SV♂	BASV <i>h</i>		
35.12 $\pm$ 3.62	37.22 $\pm$ 2.92	-0.45 (52.00)	0.654
SV♀ x MG♂	SVMG <i>h</i>		
11.80 $\pm$ 3.54	23.94 $\pm$ 5.17	-1.93 (30.11)	0.052
BA♀ x MG♂	BAMG <i>h</i>		
36.80 $\pm$ 3.74	32.57 $\pm$ 2.58	0.92 (46.21)	0.338
SV♀ x BA♂	SVBA <i>h</i>		
14.64 $\pm$ 3.50	30.27 $\pm$ 3.88	-2.98 (43.74)	0.005
MG♀ x BA♂	MGBA <i>h</i>		
29.72 $\pm$ 3.74	33.34 $\pm$ 2.93	-0.76 (50.20)	0.444

¹(SV: Santa Vitória - MG; MG: Minas Gerais e BA: Bahia).

²cruzamentos entre diferentes populações, ³híbridos.

Figura 4 – Fecundidade ($\pm$ erro padrão) das populações de *Trichogramma galloi* sobre o hospedeiro alternativo logo ao cruzá-las. As barras escuras representam os acasalamentos homotípicos, enquanto que as barras claras representam os acasalamentos heterotípicos. (SV: Santa Vitória - MG; MG: Minas Gerais e BA: Bahia)

Os valores de I_{PSI} e IA_{PSI} , utilizados para detectar isolamento sexual e assimetria nos acasalamentos, respectivamente, não foram significativos (Tabela 2). Estes resultados indicam que não foram observadas incompatibilidade nos acasalamentos, nem barreiras reprodutivas entre as populações. No entanto, foi observado um baixo valor de *fitness* (estimador W) para fêmeas da população SV, o que juntamente com sua baixa fecundidade suporta a hipótese de que esta população sofra de depressão por endogamia (Tabela 4, Figura 5, SV♀SV♂).

Tabela 4 - Estimativa do *fitness* (estimador $W \pm$ desvio padrão) de *Trichogramma galloi* e valor de p para cada sexo e população em relação à população mais bem sucedida, obtidos através de análise *bootstrap* com o programa JMATING

População ¹	Fêmeas		Machos	
	W	P	W	P
SV	0.53 ± 0.11	0.0008	1	
MG	0.95 ± 0.17	0.37	0.9 ± 0.18	0.29
BA	1		0.99 ± 0.19	0.47

¹(SV: Santa Vitória - MG; MG: Minas Gerais e BA: Bahia).

Figura 5 – Fecundidade ($\pm$ erro padrão) da geração parental (barras escuras) e dos híbridos F1 (barras claras) de *Trichogramma galloi* sobre o hospedeiro alternativo. (SV: Santa Vitória - MG; MG: Minas Gerais e BA: Bahia)

O desempenho dos híbridos F1 em relação ao parental com desempenho superior não resultou em nenhum caso de heterose, e nem foram observados declínios no *fitness* dos híbridos quando comparados com o parental com desempenho inferior, o que caracterizaria o fenômeno conhecido por depressão por exogamia (Tabela 5, Figura 6a, b, c). No entanto, os resultados fornecem evidências da recuperação do *fitness* em híbridos (F1) obtidos a partir da população SV, o que foi observado comparando-se a fecundidade entre a população parental (SV♀SV♂, 19.76 ± 4.02 hospedeiros parasitados) com três das populações híbridas (SV♀BA♂, 30.27 ± 3.88 hospedeiros parasitados, $t = 1.8789$, $gl = 44.956$, $P = 0.0333$) (BA♀SV♂, 37.22 ± 2.92 hospedeiros parasitados, $t = 3.5075$, $gl = 47.881$, $P = 0.0004$) (MG♀SV♂, 30.26 ± 3.48 hospedeiros parasitados, $t = 1.973$, $gl = 55.23$, $P = 0.0267$) (Figura 5, 6a e b).

Tabela 5 - LPH (“lowest parent heterosis”) diferença entre o *fitness* médio dos híbridos e o *fitness* médio do parental com desempenho inferior e BPH (“best parent heterosis”) diferença entre o *fitness* médio dos híbridos e o *fitness* médio do parental com desempenho superior em *Trichogramma galloi* sobre o hospedeiro alternativo

CRUZAMENTOS ¹	LPH			BPH		
	<i>t</i>	<i>gl</i>	<i>P</i>	<i>t</i>	<i>gl</i>	<i>P</i>
SV♀ x BA♂	1.879	44.956	0.967	-1.038	42.713	0.847
SV♀ x MG♂	0.6374	33.124	0.735	-1.893	28.449	0.965
BA♀ x MG♂	2.677	43.554	0.994	-0.713	51.328	0.76
BA♀ x SV♂	3.507	47.881	0.999	0.377	55.606	0.353
MG♀ x SV♂	1.973	55.232	0.973	-1.105	62.178	0.863
MG♀ x BA♂	2.725	47.584	0.995	-0.502	54.855	0.691

¹(SV: Santa Vitória - MG; MG: Minas Gerais e BA: Bahia).

Figura 6 - Cruzamentos intraespecíficos entre as populações de *Trichogramma galloi* no hospedeiro alternativo. a) SV e MG, b) SV e BA, c) MG e BA. As barras escuras representam o *fitness* das populações na geração parental e as barras claras o *fitness* dos híbridos F1. (SV: Santa Vitória - MG; MG: Minas Gerais e BA: Bahia)

4.4 Discussão

A realização de cruzamentos intraespecíficos tem grande potencial para ser integrada, de forma sistemática, em programas de controle biológico. O cruzamento entre indivíduos provenientes de populações mantidas isoladas em laboratório permite que os efeitos negativos da depressão por endogamia sejam minimizados (PEKKALA et al., 2012). Além disso, a introdução de variação genética proveniente de populações naturais pode resultar no aumento do *fitness* de populações de laboratório (HOY, 1976); entretanto, os efeitos negativos da depressão por exogamia não podem ser negligenciados. Os resultados obtidos neste estudo destacam o potencial da hibridização intraespecífica em programas de controle biológico.

As estimativas dos coeficientes de isolamento sexual (I_{PSI}) e índice de assimetria (IA_{PSI}) indicaram não haver incompatibilidade nos acasalamentos e nem barreiras reprodutivas entre as populações estudadas. Porém, com o estimador W foi possível observar um baixo *fitness* para as fêmeas da população SV. Esta população ($SV♀SV♂$) também foi a que apresentou um pior desempenho entre as populações parentais (Figura 3). Estes resultados em conjunto suportam a hipótese de que esta população esteja sofrendo os efeitos da depressão por endogamia (Figura 5).

Neste trabalho, foi observada viabilidade inferior nos cruzamentos envolvendo fêmeas da população SV. Ao cruzar fêmeas desta população com machos da população MG ou BA foi observada uma fecundidade inferior daquela observada quando a fêmea foi acasalada com machos da mesma população; porém, os valores não diferiram estatisticamente. Entretanto, foi possível detectar diferenças quando comparados estes cruzamentos com seus respectivos híbridos (Tabela 3). A fecundidade das fêmeas nos cruzamentos $SV♀MG♂$ e $SV♀BA♂$ foi respectivamente de 11.80 ± 3.54 e 14.64 ± 3.50 ovos parasitados, enquanto que nos híbridos provenientes destes cruzamentos a fecundidade foi significativamente maior (Tabela 3).

Possivelmente, a baixa fecundidade observada nestes cruzamentos seja resultado de barreiras pré ou pós zigóticas, que juntamente com o baixo *fitness* de fêmeas da população SV podem ter reduzido a viabilidade destes cruzamentos. Por outro lado, a recombinação nos acasalamentos nas populações híbridas pôde gerar novas combinações mais favoráveis, como observado no caso dos híbridos $SV♀MG♂$ e $SV♀BA♂$.

O aumento da variação genética em populações provenientes de cruzamentos pode facilitar a evolução e resposta a novas pressões ambientais (ANDERSON; STEBBINS, 1954; LEWONTIN; BIRCH, 1966; FACON et al., 2008; FACON et al., 2011). No caso de inimigos naturais, a hibridização pode favorecer o estabelecimento de populações em campo e

aumentar a eficiência de agentes de controle biológico. Além disto, a hibridização intraespecífica pode aliviar os efeitos da endogamia em populações com tamanho reduzido, resultando em um aumento imediato no *fitness* (PEKKALA et al., 2012; SEKO; MIYATAKE; MIURA, 2012).

Este trabalho também forneceu evidências da recuperação do *fitness* em híbridos obtidos a partir da população SV, uma vez que estes apresentaram um *fitness* superior em relação à população parental SV♀SV♂ (Figura 5, 6a e b). Resultados similares foram observados em cruzamentos entre sete populações do parasitoide de ovos *T. chilonis*, onde uma das populações parental apresentou *fitness* inferior em relação a 11 dos 12 híbridos avaliados (BENVENUTO et al., 2012).

De maneira geral, não foram observados casos de heterose, pois a diferença entre o *fitness* médio dos híbridos e o *fitness* médio do parental com desempenho superior não foi significativa (Tabela 5). Da mesma forma, a diferença entre o *fitness* médio dos híbridos e o *fitness* médio do parental com desempenho inferior não detectou nenhuma redução na performance dos híbridos. Ainda assim, resultados obtidos com outras espécies indicam que a hibridização é um mecanismo promissor para o melhoramento de agentes de controle biológico (BENVENUTO et al., 2012; SZUCS et al., 2012).

Os efeitos da hibridização podem ser positivos ou negativos e dependem de diversos fatores, entre eles o nível de divergência genética entre as populações, a quantidade de variação genética introduzida, as condições ambientais, os caracteres que estão sendo avaliados e o número de gerações após a hibridização (BURKE; ARNOLD, 2001; EDMANDS, 2007; PEKKALA et al., 2012).

Edmands (2002, 2007) sugere que a hibridização seja feita tentando maximizar a similaridade genética e adaptativa entre as populações, e que os efeitos sejam testados por pelo menos duas gerações sempre que possível. Seguindo estes pressupostos, Pekkala et al. (2012) observaram que o aumento na viabilidade de populações híbridas de *Drosophila littoralis* (Diptera: Drosophilidae) (constituídas por um baixo nível de divergência genética) persistiu por pelo menos sete gerações. Do mesmo modo, em *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) foi observado um aumento na viabilidade de populações até 10 gerações após a introdução de indivíduos provenientes de outras populações, indicando que o aumento no *fitness* é um fenômeno duradouro (BIJLSMA et al., 2010).

Experimentos realizados com *D. littoralis* comprovam que a hibridização é influenciada pelo nível de divergência genética entre as populações, sendo que os benefícios

da hibridização tendem a diminuir conforme o aumento da divergência genética entre as populações, mesmo quando estas compartilham condições ambientais semelhantes (PEKKALA et al., 2012). Benvenuto et al. (2012) também observaram uma relação negativa entre a performance de híbridos de *T. chilonis* e diferenças fenotípicas entre os pais.

Devido aos diversos fatores que podem influenciar os cruzamentos, ainda é difícil definir um nível de divergência seguro para a hibridização interpopulacional. Em virtude deste grau de imprevisibilidade, os dados obtidos em um determinado cruzamento dificilmente poderão prever as consequências em outros cruzamentos. Porém, distâncias genéticas além de distâncias fenotípicas podem auxiliar a determinar o *fitness* de híbridos F1, como no caso de *T. chilonis*, onde o melhor desempenho dos híbridos foi observado em pais com distância molecular de cerca de 0.012 (BENVENUTO et al., 2012). As distâncias genéticas também podem contribuir para determinar o grau de incompatibilidade entre as populações (EDMANDS, 2002; BENVENUTO et al., 2012). Benvenuto et al. (2012) comprovaram a hipótese que o grau de incompatibilidade aumenta conforme o aumento da distância genética em populações alopátricas de *T. chilonis*.

No presente estudo, apesar de não terem sido observados casos de heterose, a recuperação do *fitness* em híbridos provenientes da população que sofria os efeitos da endogamia é um resultado promissor. Estes resultados indicam que o cruzamento entre diferentes populações pode auxiliar a minimizar os efeitos negativos em criações de laboratório. No entanto, ainda não existem alternativas para se testar os efeitos diretos da hibridização sem a realização de cruzamentos em laboratório. Pesquisas envolvendo distâncias fenotípicas, geográficas e genéticas podem auxiliar a desvendar os efeitos da hibridização e aumentar as chances de prever o *fitness* dos híbridos, podendo assim aumentar o sucesso de estratégias no controle biológico de pragas.

4.5 Conclusão

A hibridização intraespecífica se mostrou eficaz para minimizar os efeitos da depressão por endogamia em uma das populações de *T. galloi* estudada, embora nos cruzamentos realizados não tenham sido observados casos de heterose.

Referências

- ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. 642p.
- ANDERSON, E.; STEBBINS, G.L. Hybridization as an evolutionary stimulus. **Evolution**, Oxford, UK, v. 8, p. 378-388, 1954.
- BENVENUTO, C.; TABONE, E.; VERCKEN, E.; SORBIER, N.; COLOMBEL, E.; WAROT, S.; FAUVERGUE, X.; RIS, N. Intraspecific variability in the parasitoid wasp *Trichogramma chilonis*: can we predict the outcome of hybridization? **Evolutionary Applications**, Hoboken, v. 5, p. 498-510, 2012.
- BIJLSMA, R.; WESTERHOF, M.D.D.; ROEKX, L.P.; PEN, I. Dynamics of genetic rescue in inbred *Drosophila melanogaster* populations. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 11, p. 449-462, 2010.
- BRAIG, H.R.; ZHOU, W.; DOBSON, S.L.; O'NEIL, S.L. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 180, p. 2373-2378, 1998.
- BURKE, J.M.; ARNOLD, M.L. Genetics and the fitness of hybrids. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 35, p. 31-52, 2001.
- CARVAJAL-RODRIGUEZ, A.; ROLÁN-ALVAREZ, E. JMATING: a software for the analysis of sexual selection and sexual isolation effects from mating frequency data. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 6, doi:10.1186/1471-2148-6-40, 2006.
- EDMANDS, S. Does parental divergence predict reproductive compatibility? **Trends in Ecology & Evolution**, Oxford, UK, v. 17, p. 520-527, 2002.
- _____. Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. **Molecular Ecology**, Chichester, v. 16, p. 463-475, 2007.
- EDMANDS, S.; FEAMAN, H.V.; HARRISON, J.S.; TIMMERMAN, C.C. Genetic consequences of many generations of hybridization between divergent copepod populations. **Journal of Heredity**, Oxford, UK, v. 96, p. 114-123, 2005.
- ENGELSTÄDTER, J.; HURST, G.D.D. The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 40, p. 127-149, 2009.
- FACON, B.; POINTIER, J.P.; JARNE, P.; SARDA, V.; DAVID, P. High genetic variance in life-history strategies within invasive populations by way of multiple introductions. **Current Biology**, Cambridge, v. 18, p. 363-367, 2008.

FACON, B.; CRESPI, L.; LOISEAU, A.; LOMBAERT, E.; MAGRO, A.; ESTOUP, A. Can things get worse when an invasive species hybridizes? The harlequin ladybird *Harmonia axyridis* in France as a case study. **Evolutionary Applications**, Hoboken, v. 4, p. 71-88, 2011.

HOY, M.A. Genetic improvement of insects: fact or fantasy. **Environmental Entomology**, Cary, v. 5, p. 833-839, 1976.

HWANG, A.S.; NORTHRUP, S.L.; ALEXANDER, J.K.; VO, K.T.; EDMANDS, S. Long-term experimental hybrid swarms between moderately incompatible *Tigriopus californicus* populations: hybrid inferiority in early generation yields to hybrid superiority in later generations. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 12, p. 895-909, 2011.

JOHANSEN-MORRIS, A.D.; LATTA, R.G. Fitness consequences of hybridization between ecotypes of *Avena barbata*: hybrid breakdown, hybrid vigor and transgressive segregation. **Evolution**, Oxford, UK, v. 60, p. 1585-1595, 2006.

LEWONTIN, R.C.; BIRCH, L.C. Hybridization as a source of variation for adaptation to new environments. **Evolution**, Oxford, UK, v. 20, p. 315-336, 1966.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and Analysis of Quantitative Traits**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 980p.

PEKKALA, N.; KNOTT, K.E.; KOTIAHO, J.S.; NISSINEN, K.; PUURTINEN, M. The benefits of interpopulation hybridization diminish with increasing divergence of small populations. **Journal of Evolutionary Biology**, Chichester, v. 25, p. 2181-2193, 2012.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2015. URL <http://www.R-project.org/>.

ROLÁN-ALVAREZ, E.; CABALLERO, M. Estimating sexual selection and sexual isolation effects from mating frequencies. **Evolution**, Oxford, UK, v. 54, p. 30-36, 2000.

SEKO, T.; MIYATAKE, T.; MIURA, K. Assessment of hybrid vigor between flightless lines to restore survival and reproductive characteristics in the ladybird beetle *Harmonia axyridis*. **BioControl**, Dordrecht, v. 57, p. 85-93, 2012.

STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J.A.J.; HURST, G.D.D. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 53, p. 71-102, 1999.

STOUTHAMER, R.; LUCK, R.F.; HAMILTON, W.D. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to revert sex. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 87, p. 2424-2427, 1990.

SZUCS, M.; EIGENBRODE, S.D.; SCHWARZLÄNDER, M.; SCHAFFNER, U. Hybrid vigor in the biological control agent, *Longitarsus jacobaeae*. **Evolutionary Applications**, Hoboken, v. 5, p. 489-497, 2012.

WHITLOCK, M.C., INGVARSSON, P.K.; HATFIELD, T. Local drift load and the heterosis of interconnected populations. **Heredity**, London, v. 84, p. 452–457, 2000.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos em cada etapa deste trabalho permitiram: (i) identificar alterações fenotípicas em populações de *Trichogramma galloi* devido adaptações às condições de criação e à manutenção da espécie em um hospedeiro alternativo; (ii) identificar uma quantidade de variação genética aditiva significativa na fecundidade da população estudada; (iii) obter resultados promissores quanto a seleção artificial para o aumento da fecundidade e (iv) a utilização de cruzamentos intraespecíficos para a recuperação do *fitness* em populações que estejam sofrendo os efeitos da endogamia.

Estes resultados em conjunto puderam esclarecer dúvidas quanto à manutenção de agentes de controle biológico em laboratório, bem como, quanto a estratégias para maximizar o *fitness* de parasitoides e minimizar os efeitos negativos das criações em condições controladas.

Com métodos estatísticos amplamente utilizados na genética quantitativa, foi possível quantificar a variação genética em caracteres importantes para o desempenho do parasitoide. Foi possível verificar uma quantidade de variação genética aditiva significativa na fecundidade desta espécie, característica esta, muito importante para programas que visem ao melhoramento da espécie.

A realização de cruzamentos intraespecíficos entre três populações da espécie resultou na recuperação do *fitness* em uma das populações que apresentava desempenho inferior em relação às demais populações.

Considerando-se os resultados obtidos neste trabalho, o aumento da eficiência de *T. galloi* poderia ser obtido com a utilização de condições de temperatura flutuantes, uma vez que condições semelhantes ao ambiente natural tendem a minimizar os efeitos da seleção às condições de laboratório. O cruzamento entre diferentes populações da espécie também pode ser uma estratégia viável para aumentar a variabilidade genética da população mantida em laboratório; no entanto, recomenda-se que testes preliminares sejam feitos a fim de selecionar as populações que apresentem melhores resultados. E, levando-se em consideração que parasitoides mantidos sobre o hospedeiro alternativo apresentam um desempenho inferior àqueles mantidos sobre o hospedeiro natural, a liberação em campo de uma maior quantidade de insetos criados no hospedeiro alternativo, também pode ajudar a aumentar a eficiência no controle da praga alvo.

Tendo em vista a dificuldade para selecionar e manter populações de *T. galloi* em condições de laboratório sobre o hospedeiro alternativo, as informações geradas neste trabalho podem fornecer subsídios para o aperfeiçoamento das criações em larga escala e de programas de controle de qualidade da espécie.