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

**Implicações da variabilidade genética de *Trichogramma pretiosum*
Riley, 1879 no seu desempenho como agente de controle biológico**

Aloisio Coelho Junior

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

**Piracicaba
2015**

Aloisio Coelho Junior
Bacharel em Ciências Biológicas

**Implicações da variabilidade genética de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879
no seu desempenho como agente de controle biológico**

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

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

Piracicaba
2015

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

Coelho Junior, Aloisio

Implicações da variabilidade genética de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 no seu desempenho como agente de controle biológico / Aloisio Coelho Junior. - - Piracicaba, 2015.

106 p. : il.

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

1. Controle biológico 2. Controle de qualidade 3. PCR em tempo real 4. Marcadores mitocondriais 5. Liberação de parasitoides I. Título

CDD 595.79
C655i

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

*Aos meus pais, Aloisio e Martina, por sempre me apoiarem, incentivarem e por terem
proporcionado a minha educação.*

À minha irmã Maria por todo carinho e apoio.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. José Roberto Postali Parra, pela confiança depositada em mim, desde o estágio de aprimoramento, por toda a atenção e orientação, pelas conversas, e pelo grande exemplo profissional;

Ao Professor Richard Stouthamer, pela co-orientação, pela confiança, pelo auxílio na elaboração dos experimentos, pelos ensinamentos passados e pela recepção em seu laboratório na Universidade da Califórnia- Riverside, EUA;

Ao pesquisador associado do Depto. de Entomologia da UC Riverside, Paul F. Rugman-Jones, pelos ensinamentos em biologia molecular, pela paciência e pela recepção na Califórnia;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Departamento de Entomologia da Universidade da Califórnia-Riverside por toda infraestrutura oferecida;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela concessão da bolsa de estudos (processo 2011/17397-5) e pelas Bolsas Estágio de Pesquisa no Exterior- BEPE (processo 2012/20184-9/ 2013/20755-6) ;

Aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, pelos valiosos ensinamentos repassados;

Aos estagiários e bolsistas do Dep. de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, que auxiliaram nos experimentos de campo: Gabriel Rodrigo Rugno, Luan Camargo de Souza, Lucas de Lima Camargo, Carlos Henrique Camargo dos Santos, Eduardo Luiz Scopel;

Aos futuros engenheiros agrônomos Lucas Lacerda da Fonseca e Jean Jacques Calamari, alunos de graduação da ESALQ/USP, pela ajuda inestimável no trabalho de campo;

Às funcionárias do Laboratório de Biologia de Inseto da ESALQ/USP, Cristina Jensen Ramos e Neide Graciano Zério, pelo apoio durante a tese;

À Dr^a Carolina Reigada Montoya pelas análises dos dados do experimento de campo;

Aos estatísticos, Rafael Moral (Doutorando ESALQ/USP) e Dr^a Marinéia L. Haddad (Dep. de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP), pelas análises dos dados;

Ao laboratório Quarentenário “Costa-Lima” da Embrapa- Meio Ambiente, na pessoa do Dr. Luiz Alexandre Nogueira de Sá, pelo auxílio na introdução do material biológico no Brasil e pela execução da quarentena dos mesmos;

Às empresas Bug Agentes Biológicos, Koppert do Brasil e Dow AgroSciences, a última na pessoa de Luiz Henrique Marques; pelo fornecimento do material biológico necessário para a execução do trabalho;

Aos Professores Giancarlo Conde Xavier Oliveira (Dep. de Genética da ESALQ/USP) e Marcos Vinícius Folegatti (Dep. de Engenharia de Biossistemas da ESALQ/USP) por cederem áreas experimentais para execução dos experimentos;

Aos Funcionários Cláudio Roberto Segatelli (Dep. de Genética da ESALQ/USP) e Lino Stênico (Dep. de Engenharia de Biossistemas da ESALQ/USP) pelo auxílio no plantio de milho e manutenção das áreas experimentais;

À Dr. Dori Edson Nava- Embrapa Clima Temperado, Prof. Luiz Amilton Foerster- UFPR; Dr. Adeney Bueno Embrapa-Soja, Dr^a. Aline Pomari; Doutoranda Magda Fernanda Paixão- UFPR; Dr^a. Beatriz A. J. Paranhos- Embrapa Semi- Árido, Prof. Driceu Pratissoli- UFES, pelo envio dos espécimes de *Trichogramma pretiosum* utilizados no experimento do capítulo 5;

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Biologia de Insetos pelo convívio e companheirismo, em especial a Johanna G. Bajonero Cuervo e Marisol Giraldo Jaramillo pelas informações sobre a geografia e clima da Colômbia;

Ao Prof. Prof. Dr. Tiago Mauricio Francoy, Escola de Artes, Ciências e Humanidades da USP e a Dr^a Juliana S. Galaschi Teixeira, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo auxílio na execução do PCR das linhagens;

Aos meus primeiro orientadores: Áurea Tereza Schmitt, Renato Arcangelo Pegoraro e Francisco Carlos Deschamps da Epagri-SC, pela iniciação científica e pelo exemplo a ser seguido;

À minha namorada Marina Melo Duarte, por ser uma pessoa especial, por me apoiar, aconselhar, por cuidar de mim e por todo carinho concedido;

Ao professor Antônio Augusto Bianchi, pelo auxílio na tradução dos resumos;

A todos os colegas e ex-colegas do Dep. de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP pelo convívio, troca de experiências, companheirismo e por tornar a vida da pós-graduação mais agradável, em especial a Guilherme Duarte Rossi, Cristiane Nardi, Vitor Hugo Beloti, Luiz Henrique C. Mota, Gabriel R. Rugno, Giovani M. Coura Jr., Rízia da Silva Andrade, Jaci Mendes Vieira, Agustín Cerna Mendonza, Gustavo R. Alves;

Aos colegas de república: Leandro P. Ribeiro, Felipe Brendler, Alexandre J. F. Diniz, Francisco Sales Fernandes, José Bruno Malaquias, Marcos Alex dos Santos, pela convivência, churrascos, almoços comunitários e momentos de descontração;

Aos grandes amigos: Marcelino A. Ferreira, Rossano Linassi, Paulo Henrique Coelho, Fernando Horn Batista, Geraldo Kool Filho, Osmar Levi Jr, que mesmo distantes sempre estiveram presentes, motivando e torcendo por mim.

"... ninguém nunca fez com que te evadisses, e não és responsável por isso. Construístes tua paz tapando com cimento, como fazem as térmitas, todas as saídas para a luz. (...) Erguestes essa humilde proteção contra os ventos, e as marés, e as estrelas. Não queres te inquietar com os grandes problemas e fizeste um grande esforço para esquecer a tua condição de homem. (...) Ninguém te sacudiu pelos ombros quando ainda era tempo. Agora a argila de que és feito já secou, e endureceu, e nada mais poderá despertar em ti o músico adormecido, ou o poeta, ou o astrônomo que talvez te habitassem".

Antoine de Saint-Exupéry (Terra dos Homens- 1939)

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
REFERÊNCIA.....	21
2 CORRELAÇÃO ENTRE O DESEMPENHO DE LABORATÓRIO E DE CAMPO DE ISOLINHAGENS DE <i>Trichogramma pretiosum</i> RILEY, 1879 UTILIZANDO-SE MARCADORES MITOCONDRIAIS.....	25
Resumo.....	25
Abstract.....	25
2.1 Introdução.....	26
2.2 Material e métodos.....	27
2.2.1 Linhagens de isofêmeas	27
2.2.2 Criação de populações de isolinhagens marcadas por DNA nuclear em três tipos mitocondriais.....	28
2.2.3 Seleção e classificação das isolinhagens em laboratório	30
2.2.4 Experimento de campo	30
2.2.5 Curvas de dissociação de alta resolução dos produtos de PCR em tempo real	32
2.2.6 Análises Estatísticas	33
2.3 Resultados.....	34
2.3.1 Seleção e classificação das isolinhagens em laboratório	34
2.3.2 Experimento de campo	36
2.4 Discussão.....	44
2.5 Conclusões.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
3 A UR AFETA A CAPACIDADE DE VOO DE ISOLINHAGENS DE <i>Trichogramma pretiosum</i> Riley, 1879 DE DIFERENTES ORIGENS E COM DIFERENTES MARCADORES MITOCONDRIAIS?.....	53
Resumo.....	53
Abstract.....	53
3.1 Introdução.....	54
3.2 Material e métodos.....	55
3.2.1 Isolinhagens de <i>Trichogramma pretiosum</i> Riley, 1879 utilizadas	55
3.2.2 Procedimento para o teste de voo.....	57
3.2.3 Análises estatísticas.....	59
3.3 Resultados.....	59

3.4 Discussão.....	63
3.5 Conclusão.....	65
REFERÊNCIAS.....	67
4 COMPATIBILIDADE REPRODUTIVA ENTRE ISOLINHAGENS NORTE-AMERICANAS E BRASILEIRA DE <i>Trichogramma pretiosum</i> Riley, 1879 – UMA ABORDAGEM INTEGRATIVA.....	70
Resumo.....	70
Abstract.....	70
4.1 Introdução.....	71
4.2 Material e métodos.....	72
4.2.1 Isolinhagens de <i>Trichogramma pretiosum</i> Riley, 1879 utilizadas	72
4.2.2 Cruzamentos entre isolinhagens de <i>T. pretiosum</i>	74
4.2.3 Análise morfométrica	74
4.2.4 Análises de dados.....	78
4.3 Resultados.....	79
4.3.1 Cruzamentos das isolinhagens de <i>Trichogramma pretiosum</i> Riley, 1879.....	79
4.3.2 Morfometria multivariada.....	81
4.4 Discussão.....	87
4.5 Conclusão.....	89
REFERÊNCIAS.....	90
5 ESTABELECIMENTO DE <i>Trichogramma pretiosum</i> RILEY, 1879, IMPORTADO DA COLÔMBIA, EM UM NOVO AGROECOSSISTEMA BRASILEIRO.	93
Resumo.....	93
Abstract.....	93
5.1 Introdução.....	94
5.2 Material e métodos.....	95
5.2.1 Linhagens avaliadas	95
5.2.2 Amplificação e sequenciamento da CO1.....	99
5.3 Resultados.....	100
5.4 Discussão.....	101
REFERÊNCIAS.....	104

RESUMO

Implicações da variabilidade genética de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 no seu desempenho como agente de controle biológico

O conhecimento das implicações da variabilidade genética em populações de inimigos naturais, principalmente parasitoides, é de vital importância para a otimização de programas de controle biológico. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo determinar como a variabilidade genética influencia diferentes parâmetros biológicos de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 em experimentos de laboratório e de campo. Para que este objetivo fosse atingido, foram avaliados: 1) o efeito da seleção de isolinhagens de *T. pretiosum* em condições de laboratório, marcadas por meio do DNA mitocondrial, no subsequente desempenho de campo; 2) como a UR afeta a capacidade de voo de isolinhagens, marcadas por meio do DNA mitocondrial, de espécimes de *T. pretiosum* oriundas do Brasil e EUA; 3) a compatibilidade reprodutiva entre isolinhagens norte-americanas e brasileira de *T. pretiosum*, avaliada por meio de uma abordagem integrativa e 4) o possível estabelecimento de uma linhagem de *T. pretiosum* proveniente da Colômbia num novo ecossistema, no Nordeste brasileiro. Com base nos resultados do presente trabalho conclui-se que a variabilidade genética de *T. pretiosum* exerce grande influência em parâmetros biológicos do parasitoide, uma vez que: 1) os diferentes desempenhos reprodutivos das isolinhagens em condições de laboratório foram correspondentes àqueles em condições de campo, sendo as sequências mitocondriais uma técnica de marcação precisa e eficiente para avaliação do desempenho de *T. pretiosum* em condições de campo; 2) para algumas isolinhagens, as condições ambientais do local onde se pretende liberar *T. pretiosum*, se distintas do hábitat natural do parasitoide, podem afetar negativamente o voo deste inseto; 3) foi registrada incompatibilidade reprodutiva leve e diferenças morfológicas mais pronunciadas entre as isolinhagens americanas e brasileira, geneticamente variáveis; 4) foram observados fortes indícios de que uma linhagem de *T. pretiosum*, introduzida em Petrolina, PE há 22 anos, trazida de Palmira, Colômbia, se estabeleceu naquela região.

Palavras-chave: Controle biológico; Controle de qualidade; PCR em tempo real; Marcadores mitocondriais; Liberação de parasitoides

ABSTRACT

GENETIC VARIABILITY OF *Trichogramma pretiosum* RILEY, 1879, IN ITS ROLE AS A BIOLOGICAL CONTROL AGENT

The knowledge on genetic variability in populations of natural enemies, especially parasitoids, has a vital importance for the optimization of biological control programs. Thus, this study aimed to determine the influences of genetic variability on different biological parameters of *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, in laboratory and field experiments. We evaluated: 1) the effect of selection of *T. pretiosum* isofemale strains in laboratory conditions, marked by mitochondrial DNA, on the subsequent field performance; 2) the effects of RH on flight capacity isofemale lines, marked by the mitochondrial DNA, of *T. pretiosum* specimens from Brazil and the USA; 3) the reproductive compatibility between USA and Brazilian isofemale lines of *T. pretiosum*, through an integrative approach, and 4) the possible establishment of a *T. pretiosum* strain from Colombia in a new ecosystem in the Brazilian Northeast. The results allow to conclude that genetic variability of *T. pretiosum* has great influence on biological parameters of the parasitoid, since: 1) the different reproductive performance of isofemale strains in laboratory conditions corresponded to those under field conditions, and mitochondrial DNA was accurate and efficient, marking technique for the evaluation of *T. pretiosum* performance in field conditions; 2) for some isofemale lines, the environmental conditions of the release sites, if distinct from the natural habitat of the parasitoid, may adversely affect flight capacity of the parasitoid; 3) slight reproductive incompatibility and more pronounced morphological differences were observed between American and Brazilian isofemale lines, genetically variable; 4) there is strong evidence that *T. pretiosum* line introduced in Petrolina, PE, 22 years ago, brought from Palmira, Colombia, has established in that region.

Keywords: Biological control; Quality control; Real-time PCR; Mitochondrial markers; Parasitoid release

1 INTRODUÇÃO

O modelo agrícola vigente no Brasil, com grandes áreas plantadas, quando conduzido de maneira inadequada, contribui para desequilíbrios ecológicos. A utilização de agroquímicos, de forma indiscriminada, pode acarretar a contaminação do solo, do lençol freático, do homem e do próprio alimento produzido. O Manejo Integrado de Pragas (MIP) é a solução para evitar tais problemas, por ser um conjunto de medidas que visa manter as pragas abaixo do nível de dano econômico, levando-se em conta critérios econômicos, ecológicos e sociais e que tem no controle biológico uma de suas principais medidas de controle (NORRIS; CASWELL-CHEN; KOGAN, 2003). No Brasil, hoje, grandes áreas cultivadas são tratadas com agentes de controle biológico, sendo que apenas em cana-de-açúcar, trata-se uma área de mais de 3.500.000 de ha. Utiliza-se o parasitoide importado, *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) em mais de 3.000.000 de ha na cultura da cana para controlar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (PARRA, 2010). Parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma* também são responsáveis pelo controle biológico de pragas em grandes áreas no Brasil, com perspectivas de aumento significativo de utilização num futuro próximo, com o surgimento de empresas disponibilizando tal agente ao agricultor. Atualmente, aproximadamente, 500.000 ha são tratados com *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 para o controle da broca-da-cana; *Tichogramma pretiosum* Riley, 1879 para controle *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1827) e *Chrysodeixis includens* (Walker, 1857) em soja, numa área de 250.000 ha, adicionando-se a estas áreas abertas, áreas de cultivo protegido de tomate e *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner, 1983 utilizado em pequenas áreas de produção de milho (PARRA et al., 2015).

Em nível mundial, parasitoides do gênero *Trichogramma* também são intensamente estudados, sendo que na década de 1980 cerca de 28 espécies foram liberadas, em 28 países, em culturas anuais ou perenes (HASSAN, 1997; van LENTEREN, 2008) correspondendo a 32 milhões de ha tratados (SMITH, 1996). Alguns programas de controle biológico aplicado que utilizaram estes parasitoides não foram bem sucedidos, pois aspectos importantes da biologia, fisiologia, e exigências microclimáticas não foram considerados, sendo estas falhas comuns em programas executados em outros países (PARRA et al., 2015). Hoje em dia, por meio dos avanços da biologia molecular é possível a caracterização de diferentes linhagens de *Trichogramma* spp. ao nível molecular, seja sequenciando o DNA nuclear ou mitocondrial. A partir da referida caracterização,

importantes atributos intraespecíficos da biologia e comportamento podem ser estudados de maneira mais detalhada.

De acordo com Wajnberg (2010) a variação genética intraespecífica influencia o desempenho de parasitoides de diferentes maneiras, argumentando que algumas estimativas podem ser feitas por meio destes estudos, incluindo: *i*) capacidade do agente de controle biológico de responder às condições ambientais; *ii*) potencial de sobrevivência de parasitoides em campo; *iii*) programas de seleção e cruzamentos de isolinhagens para melhorar a eficácia dos agentes liberados. De uma maneira geral sabe-se da importância da genética de populações para a aplicação do controle biológico, porém, de forma teórica, (HOPPER; ROUSH, 1993; UNRUH et al., 1983; OMWEGA; OVERHOLT, 1996). Poucos trabalhos são de fato realizados em condições de campo. No processo de execução de um programa de controle biológico, vários passos estão envolvidos e podem influenciar a composição genética e variabilidade encontrada em uma população de inimigos naturais. Quase todos os programas de controle biológico envolvem três etapas em comum: 1) Coleta do inimigo natural proveniente de uma população selvagem; 2) Manutenção do inimigo natural em laboratório (com um período quarentenário, se for importado); 3) Criação massal e liberação do inimigo natural no campo, que pode ser realizada de maneira inoculativa ou inundativa, em programas de Controle Biológico Clássico ou Aplicado (aumentativo) (HASSAN, 1994; BIGLER, 1994; PARRA, 2002; van LENTEREN; BIGLER 2010). Em cada etapa, fatores da genética de populações são considerados importantes.

Segundo Hoffmann et al. (2008) a incidência de insetos pragas que realizam partenogênese é muito maior em ambientes agrícolas do que em ambientes não agrícolas, relacionando isto ao fato de que o agroecossistema é estável e uniforme com recursos em abundância. Sabe-se que, de fato, certos agentes de controle biológico completamente homozigotos, são bastante eficientes, como por exemplo, *Encarsia formosa* Gahan, 1924, que é utilizada para o controle de moscas-brancas na Europa desde 1930 (van LENTEREN et al., 1997). Esta espécie apresenta partenogênese telítoca, quando infectada pelo endossimbionte *Wolbachia* (van MEER et al., 1995). Laing e Heraty (1981) relataram que a população do parasitoide *Apanteles pedias* (Nixon, 1973), utilizado para controle biológico da *Phyllonorycter blancardella* (Fabricius, 1781), um lepidóptero minador da macieira, foi iniciado com duas fêmeas telítocas. Contudo, poucos estudos testam a importância da falta de variabilidade genética no seu desempenho no campo (HUFBAUER, 2001; 2002; PHILLIPS et al., 2008). Hopper e Roush (1993) mostraram a relação entre o número de inimigos naturais coletados e o

sucesso do Controle Biológico Clássico, e relataram que um grande número de inimigos naturais utilizados na população inicial resulta numa grande taxa de sucesso.

A importância de adaptações às condições de laboratório no desempenho de insetos no agroecossistema é conhecido em insetos usados em programas da técnica do inseto estéril (TIE), sendo que tais adaptações às criações em laboratório são consideradas de extrema importância (NUNNEY, 2002). Segundo Ito e Ymagishi (1989) as citadas adaptações são muito rápidas e a competitividade de *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett, 1899) utilizada em programas de inseto estéril declina de 75% em 5 gerações para 25% em 18 gerações. O declínio na virulência de populações de nematoides tem sido observado em populações geneticamente variáveis mantidas por muitas gerações, enquanto o mesmo declínio não é observado no mesmo período em linhagens “puras” (BAI et al., 2005). Adaptações rápidas às condições de criação massal e o declínio no desempenho são observados em vários programas de TIE incluindo programas da mosca-da-bicheira (BUSH et al., 1976). Myers e Sabath (1980) encontraram correlação entre o número de gerações sob condições de criação massal, influenciando a taxa de sucesso de controle biológico, mostrando que quanto menor o período em criação massal maior a taxa de sucesso.

O problema encontrado em criações massais de programas de controle biológico é embasado em programas de reprodução em laboratório (cativeiro) de espécies ameaçadas de extinção, como por exemplo, mamíferos superiores. Muitos estudos são feitos para mostrar a perda de variabilidade genética de populações criadas em laboratório e frequentemente *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 é o inseto utilizado como modelo nestes sistemas. Parasitoides usados em controle biológico apresentam reprodução haplodiploide, o que ocasiona menor “depressão endogâmica” em comparação às moscas diploides (LEGNER, 1979; FABRITIUS, 1984; SORATI; NEWMAN; HOFFMANN, 1996; ANTOLIN, 1999; PREZOTTI et al., 2004; LUNA; HAWKINS, 2004). Porém, os efeitos de adaptações genéticas às condições de laboratório permanecem e, conseqüentemente, a previsão é que com o aumento efetivo do tamanho da população durante a criação massal, o desempenho de parasitoides possa declinar em condições de campo. Informações empíricas sustentam a evidência existente de que inicialmente é muito difícil estabelecer uma população em laboratório, porém, depois de algumas gerações o desempenho (em laboratório) melhora substancialmente.

Enquanto alguns trabalhos são realizados com inimigos naturais com o objetivo de determinar a influência da reprodução, em condições de laboratório, (UNRUH et al., 1983; OMWEGA; OVERHOLT, 1996; PREZOTTI et al., 2004), existem poucos trabalhos que

determinam esta influência no campo. Alguns trabalhos foram realizados com *Trichogramma carverae* Oatman & Pinto, 1987 em campo, para relacionar os efeitos de medições morfológicas, como forma de asa e tamanho, e a variação destas características no desempenho deste parasitoide no campo (BENNETT; HOFFMANN, 1998; KOLLIKER-OTT et al., 2003, 2004; HOFFMANN et al., 2005). Thomson e Hoffmann (2002) testaram a hipótese de que a fecundidade, em teste de laboratório, pode ser um bom parâmetro para prever o sucesso de *T. carverae* no campo. Os resultados deste estudo mostraram que diferenças na fecundidade, entre diferentes linhagens em teste de laboratório, não são relacionados com seu desempenho das diferentes linhagens em campo.

Considerando-se a importância do MIP na agricultura moderna, e dentro desta filosofia de utilização em larga escala, de *T. pretiosum* como agente de controle de biológico de pragas no mundo, a presente tese tem por objetivo avaliar qual a influência da variabilidade genética em diferentes aspectos da biologia de *T. pretiosum*. Assim, para atingir tal objetivo foram desenvolvidas as seguintes etapas: *i*) efeito da seleção de isolinhagens de *T. pretiosum* em condições de laboratório, marcadas por meio do DNA mitocondrial, no subsequente desempenho de campo; *ii*) como a UR afeta a capacidade de voo de isolinhagens de *T. pretiosum*, marcadas por meio do DNA mitocondrial, oriundas de dois locais distintos; *iii*) a compatibilidade reprodutiva entre isolinhagens brasileira e norte-americanas de *T. pretiosum*, por meio de uma abordagem integrativa e *iv*) o possível estabelecimento de uma linhagem de *T. pretiosum* proveniente da Colômbia num novo ecossistema, no Nordeste brasileiro.

REFERÊNCIAS

- ANTOLIN, M.F. A genetic perspective on mating systems and sex ratios of parasitoid wasps. **Researches on Population Ecology**, Berlim, v. 41, n. 1, p. 29-37, 1999.
- BAI, C.; SHAPIRO-ILAN, D.I.; GAUGLER, R.; HOPPER, K.R. Stabilization of beneficial traits in *Heterorhabditis bacteriophora* through creation of inbred lines. **Biological Control**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 220-227, 2005.
- BENNETT, D.M.; HOFFMANN, A.A. Effects of size and fluctuating asymmetry on field fitness of the parasitoid *Trichogramma carverae* (Hymenoptera : Trichogrammatidae) **Journal of Animal Ecology**, Dordrecht, v. 67, n. 4, p. 580-591, 1998.
- BIGLER, F. Quality control in *Trichogramma* production. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S. A. **Biological Control with Egg Parasitoids**. Wallingford: CABI, 1994. cap.5, p. 91–111.
- BUSH, G.L.; NECK, R.W.; KITTO, G.B. Screwworm eradication: inadvertent selection for noncompetitive ecotypes during mass rearing. **Science**, Washington, v. 193, n. 4252, p.491-493, 1976.
- FABRITIUS, K. Investigations on inbreeding of *Muscidifurax raptor* under laboratory conditions (HYMENOPTERA, PTEROMALIDAE). **Entomologia Generalis**, Stuttgart, v. 9, n. 4, p. 237-241, 1984.
- HASSAN, S.A. Strategies to select *Trichogramma* species for use in biological control. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S. A. **Biological Control with Egg Parasitoids**. Wallingford: CABI, 1994. cap. 3, p. 55–71.
- HASSAN, S.A. Criação da traça do milho, *Sitotroga cerealella*, para a produção massal de *Trichogramma*. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. cap. 6, p. 173- 182.
- HOFFMANN, A.A.; REYNOLDS, K.T.; NASH, M.A.; WEEKS, A.R. A high incidence of parthenogenesis in agricultural pests. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, London, v. 275, n. 1650, p. 2473-2481, 2008.
- HOFFMANN, A.A.; WOODS, R.E.; COLLINS, E.; WALLIN, K.; WHITE, A.; MCKENZIE, J.A. Wing shape versus asymmetry as an indicator of changing environmental conditions in insects. **Australian Journal of Entomology**, Dordrecht, v. 44, p. 233-243, 2005.
- HOPPER, K.R.; ROUSH, R.T. MATE FINDING, dispersal, number released, and the success of biological-control introductions. **Ecological Entomology**, Dordrecht, v. 18, n. 4, p. 321-331, 1993.
- HUFBAUER, R.A. Pea aphid-parasitoid interactions: Have parasitoids adapted to differential resistance?. **Ecology**, Tempe, v. 82, n. 3, p. 717-725, 2001.
- HUFBAUER, R.A. Aphid population dynamics: does resistance to parasitism influence population size?. **Ecological Entomology**, Dordrecht, v. 27, n. 1, p. 25-32, 2002.

ITO, Y.; YMAGISHI, M. Sperm Competition in the Melon Fly, *Dacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae): Effects of Sequential Matings with Normal and Virgin or Non-Virgin Sterile Males. **Applied Entomology and Zoology**, Tóquio, v. 24, n.4, p. 466-477, 1989.

KOLLIKER-OTT, U.M.; BIGLER, F.; HOFFMANN, A.A. Field dispersal and host location of *Trichogramma brassicae* is influenced by wing size but not wing shape. **Biological Control**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 1-10, 2004.

KOLLIKER-OTT, U.M.; BLOWS, M.W.; HOFFMANN, A.A. Are wing size, wing shape and asymmetry related to field fitness of *Trichogramma* egg parasitoids? **Oikos**, Dordrecht, v. 100, n. 3, p. 563-573, 2003.

LAING, J.E.; HERATY, J.M. Establishment in Canada of the parasite *apanteles pedias* Nixon on the spotted tentiform leafminer, *Phyllonorycter blancardella* (Fabr.) (Lepidoptera, Gracillariidae). **Environmental Entomology**, Lanhan, v. 10, n. 6, p. 933-935, 1981.

LEGNER, E.F. Prolonged culture and inbreeding effects on reproductive rates of 2 pteromalid parasites of muscoid flies. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanhan, v. 72, n. 1, p. 114-118, 1979.

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

LEENTEREN, J.C. van. Current situation of biological control (including region/country reviews). In: _____. **IOBC Internet Book of Biological Control**. Wageningen: IOBC, 2008. chap. 5, p. 41-51.

LEENTEREN, J.C. van; DROST, Y.C.; VAN ROERMUND, H.J.W.; POSTHUMA-DOODEMAN, C.J.A.M. Aphelinid parasitoids as sustainable biological control agents in greenhouses. **Journal of Applied Entomology**, Berlim, v. 121, n. 9-10, p. 473-485, 1997.

LUNA, M.G.; HAWKINS, B.A. Effects of inbreeding versus outbreeding in *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera : Pteromalidae). **Environmental Entomology**, Lanhan, v. 33, n. 3, p. 765-775, 2004.

MEER, M.M.M. van; KAN, F.J.P.M. van; BREEUWER, J.A.J.; STOUTHAMER, R. Identification of symbionts associated with parthenogenesis in *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) and *Diplolepis rosae* (Hymenoptera: Cynipidae). **Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society**, Amsterdã, v. 6, p. 81-86, 1995.

MYERS, D.; SABATH, M.D. Genetic and phenotypic variability, genetic variance, and the success of establishment of insect introductions for the biological control of weeds. In: Proceedings of the V International Symposium on Biological Control of Weeds. **Proceedings...** Athens: University Of Georgia, 1980. p. 91-102.

NORRIS, R.F.; CASWELL-CHEN, E.P.; KOGAN, M. **Concepts in integrated pest management**. New Jersey: Prentice Hall, 2003. 586p.

NUNNEY, L. The effective size of annual plant populations: The interaction of a seed bank with fluctuating population size in maintaining genetic variation. **American Naturalist**, Chicago, v. 160, n. 2, p. 195-204, 2002.

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

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: VISON, B. **Trichogramma in augmentative biological control**: A worldwide view of the past, present and future. *in press*. 2015.

PARRA, J.R.P. Mass rearing of egg parasitoids for biological control programs. In: CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, A. **Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on Trichogramma**. New York: Springer, 2010. cap. 10, p. 267-292.

PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. Controle biológico: terminologia. In: _____. **Controle biológico no Brasil**: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. cap.1, p. 1-13.

PHILLIPS, C.B.; BAIRD, D.B.; ILINE, I.I.; MCNEILL, M.R.; PROFFITT, J.R.; GOLDSON, S. L.; KEAN, J.M. East meets west: adaptive evolution of an insect introduced for biological control. **Journal of Applied Ecology**, Dordrecht, v. 45, n. 3, p. 948-956, 2008.

PREZOTTI, L.; PARRA, J.R.P.; VENCOVSKY, R.; COELHO, A.S.G.; CRUZ, I. Effect of the size of the founder population on the quality of sexual populations of *Trichogramma pretiosum*, in laboratory. **Biological Control**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 174-180, 2004.

SMITH, S.M. Biological Control with *Trichogramma*: advances, successes and potential of their use. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 50, p. 375-406, 1996.

SORATI, M.; NEWMAN, M.; HOFFMANN, A.A. Inbreeding and incompatibility in *Trichogramma brassicae*: Evidence and implications for quality control. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 78, n. 3, p. 283-290, 1996.

THOMSON, L.J.; HOFFMANN, A.A. Laboratory fecundity as predictor of field success in *Trichogramma carverae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v. 95, n. 5, p. 912-917, 2002.

UNRUH, T.R.; WHITE, W.; GONZALEZ, D. ; GORDH, G.; LUCK, R.F. Heterozygosity and effective size in laboratory populations of *Aphidius ervi* [Hym, Aphidiidae]. **Entomophaga**, Paris, v. 28, n. 3, p. 245-258, 1983.

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

2 CORRELAÇÃO ENTRE O DESEMPENHO DE LABORATÓRIO E DE CAMPO DE ISOLINHAGENS DE *Trichogramma pretiosum* RILEY, 1879, UTILIZANDO-SE MARCADORES MITOCONDRIAIS

Resumo

Esta pesquisa teve como objetivo verificar a influência da seleção de laboratório sobre o desempenho no campo de diferentes isolinhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 utilizando-se uma técnica inovadora para "marcar" estas isolinhagens, com haplótipos mitocondriais. Para se "criar" os diferentes haplótipos mitocondriais, a sequência COI do DNA mitocondrial de espécimes de *T. pretiosum*, provenientes do campo foi determinada, e três sequências mitocondriais "raras", distintas entre si, foram encontradas. Por meio de retrocruzamentos essas sequências foram introgridas em isolinhagens marcadas por meio do DNA nuclear. Um experimento de laboratório foi realizado para avaliar a performance reprodutiva e razão sexual de 45 isolinhagens (15 por haplótipo). Estas isolinhagens foram classificadas em três categorias: "melhor", "intermediária" e "pior", de acordo com os parâmetros reprodutivos. Após essa seleção, três isolinhagens de cada categoria, foram liberadas em campo. Duas liberações foram realizadas em uma área plantada com milho. Os pontos de recaptura eram constituídos de cartelas com ovos de *A. kuehniella*, substituídas diariamente, durante três dias. Após o período de 24 horas, no campo, as cartelas, contendo os ovos de *A. kuehniella*, eram levadas para o laboratório e mantidas a 25°C até a emergência dos adultos. Posteriormente, os adultos foram analisados por meio de uma curva de dissociação dos produtos do PCR em tempo real, para saber a qual haplótipo pertenciam os indivíduos emergidos das cartelas. Um total de 1.210 e 1.245 parasitoides classificados, em laboratório, como "melhores" foram recapturados na primeira e na segunda liberações, contra 146 e 117 parasitoides da isolinhagem classificadas como "pior". As análises estatísticas dos dados obtidos demonstram que o desempenho reprodutivo em condições de laboratório foi suficiente e preciso para a previsão da subsequente performance, em condições de campo, das isolinhagens geneticamente variáveis de *T. pretiosum*. O uso das sequências mitocondriais como um marcador se mostrou uma técnica precisa e eficiente para avaliação do desempenho de *T. pretiosum* em condições de campo.

Palavras-chave: Controle biológico; Controle de qualidade; Variabilidade genética

Abstract

This research aimed to determine the influence of laboratory selection on field performance of different isofemale lines of *Trichogramma pretiosum* Riley, using an innovative technique to "mark" these lines with unique mitochondrial haplotypes. To "create" the mitochondrial mark, DNA background of field collected *T. pretiosum* lines was determined by sequencing the barcoding region of the COI gene and three "rare" mitochondrial backgrounds that could be distinguished from each other was found. One laboratory trial was performed to evaluate the reproduction and sex ratio of 45 isofemale lines (15 per haplotype). These isofemale lines were classified into three categories: "best", "intermediary" and "worst" according to reproductive parameters. After this selection, three lines covering the three categories were selected for field releases. Two releases were made in a cornfield with four plots with 50 points of recapture. The recapture points consisted of trap-cards with eggs of *A. kuehniella* changed daily during three days. After the period of 24 hours in the field, the cards containing the eggs of *A. kuehniella* were taken to the laboratory and kept at 25°C until the emergence of adults, who were analyzed through qPCR for the identification of which isofemale line belonged to

recaptured individuals, performed by high-resolution melt curves of PCR products (HRM). The results from dissociation curves allowed evaluating the correlation between laboratory and field performance. A total of 1210 and 1245 parasitoids previously classified as "best" was recaptured in the first and second releases, against 146 and 117 parasitoids from the "worst" isofemale line. Statistical analyses of the data obtained show that the reproductive performance in laboratory conditions was sufficient and accurate to predict subsequent performance under field conditions of the parasitoids isofemale lines genetically variables. The use of mitochondrial sequences as a marker proved to be an efficient and accurate technique to assess the performance of *T. pretiosum* under field conditions.

Keywords: Biological control; Quality control; Genetic variability

2.1 Introdução

A importância e aplicações da genética no controle biológico tem sido tema de muitas teorias e vários experimentos de laboratório mostram que os princípios gerais de genética de populações de fato se aplicam aos agentes de controle biológico (HOPPER; ROUSH, 1993; UNRUH et al., 1983; OMWEGA; OVERHOLT, 1996), mas poucos trabalhos de campo foram feitos para comprovar tal afirmação. No processo de execução de um programa de controle biológico, várias etapas estão envolvidas e podem influenciar a composição genética e variabilidade encontrada em uma população de inimigos naturais. Quase todos os programas de controle biológico envolvem três etapas em comum: 1) Coleta do inimigo natural proveniente de uma população selvagem; 2) Manutenção do inimigo natural em laboratório (eventualmente com um período quarentenário); 3) Criação massal (em laboratório) e liberação do inimigo natural no campo, que pode ser realizada de maneira inundativa para o Controle Biológico Aplicado ou inoculativa no Controle Biológico Clássico (HASSAN, 1994; BIGLER, 1994; PARRA, 2002; van LENTEREN; BIGLER 2010). Em cada etapa, fatores da genética de populações são considerados importantes.

Microimenópteros haplodiploides como *Trichogramma* spp. sofrem muito menos depressão endogâmica do que as espécies diploides (LEGNER, 1979; FABRITIUS, 1984; SORATI; NEWMAN; HOFFMANN, 1996; ANTOLIN, 1999; PREZOTTI et al., 2004; LUNA; HAWKINS, 2004). Mesmo assim, os efeitos da adaptação genética em laboratório ocorrem e, conseqüentemente, previsões indicam que com o aumento do tamanho efetivo da população durante a criação massal, o desempenho dos parasitoides deve ser negativamente afetado em condições de campo (WOODWORTH et al., 2002). Evidências apontam que existe uma consistente adaptação dos insetos mantidos em condições de laboratório, embora o estabelecimento da criação seja muito difícil no início, melhorando apenas após um certo número de gerações em laboratório. Bennett e Hoffmann (1998),

Thomson e Hoffmann (2002) e Hoffman et al. (2005) realizaram vários experimentos para determinar o que influencia o sucesso de *Trichogramma carverae* Oatman & Pinto, 1987 no campo determinando as relações de medidas morfológicas, como a forma da asa e tamanho e assimetria destas características e o desempenho deste parasitoide em condições de campo.

Wajnberg (2010) relatou que vários atributos comportamentais são influenciados pela variação genética intraespecífica, e argumenta que para se selecionar os inimigos naturais com o intuito de melhorar o desempenho do controle biológico de uma forma geral, são necessárias melhores estimativas para avaliar a capacidade do agente de controle biológico em responder às condições ambientais, bem como, melhorar a sua sobrevivência no campo. Isto ressalta a importância da variabilidade genética para agentes de controle biológico, uma vez que, segundo van Lenteren e Bigler (2010) um agente de controle biológico eficiente é aquele capaz de localizar e atacar de forma eficiente o hospedeiro e permanecer em uma área infestada por este hospedeiro até que a maioria deles seja atacada (parasitada).

Espécies de *Trichogramma* estão entre os parasitoides mais estudados em todo o mundo. Na década de 1980 cerca de 28 espécies foram criadas massalmente e liberadas em 28 países para o controle de lepidópteros pragas em culturas semiperenes e perenes (HASSAN, 1997; van LENTEREN, 2008; PARRA, 2010) correspondendo a 32 milhões de ha (SMITH, 1996). No Brasil em particular, *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 vem sendo utilizado em mais de 250.000 ha para controle de lepidópteros pragas na cultura da soja (PARRA et al, 2015); a literatura é escassa em estudos para avaliar a competição direta entre linhagens deste parasitoide no campo. Considerando-se a falta de informações sobre o desempenho de *Trichogramma* no campo, a presente pesquisa teve por objetivo determinar o efeito do processo de criação e seleção em laboratório sobre o posterior desempenho e competição de isolinhagens de *T. pretiosum* no campo, utilizando-se uma técnica inovadora de marcação das isolinhagens com haplótipos mitocondriais.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Linhagens de isofêmeas

Ovos de *Manduca sexta* (L., 1763) foram coletados em plantas de tomateiro na Estação Costeira Sul da Universidade da Califórnia, em Irvine, CA. Uma única fêmea de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 proveniente de cada ovo do hospedeiro foi copulada

com um macho originário do mesmo ovo, e criada individualmente, iniciando-se assim cada isolinhagem. Estas isolinhagens foram mantidas em condições de laboratório, utilizando-se ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879), com 24 h de idade, esterilizados em luz ultravioleta (UV), como hospedeiro alternativo. A cada geração, uma única fêmea, proveniente das matrizes, foi copulada com seu irmão, e utilizada para iniciar a geração seguinte; este protocolo de endogamia foi seguido por nove gerações. Depois das referidas nove gerações, as linhagens de isofêmeas (isolinhagens) resultantes devem ter um coeficiente de endogamia de pelo menos 86% (LI, 1955). Por meio deste protocolo de endogamia se eliminou a maior parte da variação genética das isolinhagens, sobrando menos de 14% da heterozigose inicial em cada isolinhagem. Foram iniciadas e mantidas em laboratório 15 isolinhagens de *T. pretiosum*; a diferenciação genética entre as isolinhagens foi confirmada utilizando-se dois loci altamente polimórficos de microssatélites (DNA nuclear).

2.2.2 Criação de populações de isolinhagens marcadas por DNA nuclear em três tipos mitocondriais

Nas populações de *T. pretiosum* coletadas em campo, três “tipos” mitocondriais diferentes (haplótipos) Ma, Mb e Mc foram encontrados e que diferem da sequência da COI mitocondrial mais comum (Mcom). Por meio de protocolos de retrocruzamentos (Figura 1), criaram-se três populações de cada uma das 15 isolinhagens marcadas por DNA nuclear, sendo que cada população diferiu apenas pelo seu marcador mitocondrial. O protocolo para a criação destas populações seguiu o seguinte método: uma isolinhagem pura, que tem, por exemplo, uma sequência de DNA nuclear N1 e uma sequência de DNA mitocondrial Mcom; por meio da referida série de retrocruzamentos foi possível “criar”, as seguintes populações: MaN1, MbN1, McN1. Para se criar a isolinhagem MaN1 cruzam-se machos da isolinhagem McomN1 com as fêmeas da isolinhagem MaN2 e, posteriormente, a descendência feminina deste cruzamento novamente foi cruzada com os machos McomN1. Este protocolo de retrocruzamentos foi repetido por nove gerações até “criar-se” a isolinhagem MaN1. Depois de nove gerações de retrocruzamentos, as isolinhagens MaN1 e McomN1 terão, em média, $1 - (0,5)^9 = 0,998$ de DNA nuclear genômico idêntico. No final destes protocolos de retrocruzamento foi criada para cada uma das 15 isolinhagens, distintas por DNA nuclear, três populações com sequências mitocondriais diferentes, que serão utilizadas como um marcador das isolinhagens para as posteriores liberações em campo. O uso do DNA mitocondrial como

um marcador, parte da premissa de que as diferentes sequências da COI do DNA mitocondrial, não afetam a biologia dos parasitoides.

Figura 1- Esquema de retrocruzamentos para “introgridir” a sequência nuclear N1 (indicado pelas barras brancas=conjunto de cromossomos) na sequência de DNA mitocondrial Ma (representado pela letra “A” dentro do círculo). A cada geração “G” (indicada pelos números), uma descendente fêmea da geração anterior era cruzada com um macho da isolinhagem McomN1 (dando origem a descendentes com a composição genética mostrada à direita do sinal de igual). Repetindo o processo de retrocruzamento nove vezes, com machos da isolinhagem McomN1, uma proporção cada vez maior do genoma nuclear das fêmeas retrocruzadas (MaHyb), se tornou do tipo N1 (99,8%).

2.2.3 Seleção e classificação das isolinhagens em laboratório

A classificação das isolinhagens em laboratório foi realizada levando-se em conta a fertilidade e a razão sexual de *T. pretiosum*. A fertilidade foi avaliada para as 15 isolinhagens de cada um dos “tipos” mitocondriais (A, B, C). Para cada uma das populações diferentes, 20 fêmeas (<24 horas de idade), foram individualizadas em frascos ($\varnothing=1.5$ X $h=7$ cm) tampados com algodão hidrófilo. Estas fêmeas foram alimentadas com uma gotícula de mel puro e mantidas em uma câmara climatizada regulada à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. A cada indivíduo foi oferecida uma cartela contendo aproximadamente 125 ovos de *A. kuehniella*. Durante três dias a cartela foi substituída a cada 24 h; após ser substituída, a antiga cartela era mantida sob as mesmas condições de temperatura, UR e luz anteriormente mencionadas. Após o terceiro dia de parasitismo, a fêmea foi removida e os tubos contendo as cartelas com os ovos foram mantidos na mesma câmara climatizada até a emergência da próxima geração. Após a emergência, a fertilidade de cada tipo mitocondrial foi determinada por meio da contagem do número de descendentes gerados durante os três dias e a razão sexual foi determinada por meio da fórmula: $rs = \frac{n^\circ \text{ de fêmeas}}{n^\circ \text{ de fêmeas} + n^\circ \text{ machos}}$. Logo após, as isolinhagens foram classificadas em “Melhor”, “Intermediária” e “Pior” de acordo com o seu desempenho, para os dois parâmetros avaliados (de fertilidade e razão sexual) (Ver item resultados 2.3.1). A isolinhagem “melhor” foi a que produziu um maior número de descendentes (em três dias) com uma razão sexual maior que 0,75, “Pior” uma isolinhagem que produziu um número relativamente pequeno de descendentes e uma razão sexual abaixo de 0,55, e “Intermediária” uma isolinhagem com a performance reprodutiva posicionada entre os dois extremos.

2.2.4 Experimento de campo

Duas liberações foram realizadas, cada uma utilizando três isolinhagens escolhidas de acordo com o seu desempenho em laboratório (Tabela 1). Os experimentos de campo foram realizados em Piracicaba, SP, Brasil (long. $-47^\circ 64' 31''$ "Lat. $-22^\circ 70' 01''$ "), utilizando-se plantas de milho Bt (Dow® 2B587PW / produto pré-comercial), a fim de se evitar infestações naturais por espécies de lepidópteros. Duas liberações foram realizadas utilizando-se as isolinhagens anteriormente classificadas em laboratório (“melhor”, “intermediária” e “pior”). Para cada liberação, quatro parcelas de 10 x 10 m foram preparadas, enquanto as plantas de milho estavam no estágio vegetativo V4/V5, ou seja, plantas com quatro/cinco folhas completas (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 1997).

Tabela 1- Isolinhagens de *T. pretiosum* classificadas em laboratório e selecionadas para a liberação em campo

Liberação	Classificação da isolinhagens		
	Melhor	Intermediária	Pior
1 ^a	47 A	37 B	51 C
2 ^a	47 B	43 A	51 C

O método de liberação utilizado neste experimento baseia-se naquele descrito por Kazmer e Luck (1995). Os parasitoides foram liberados a partir de um eixo central das parcelas utilizando-se cartelas parasitadas e colocadas no interior de tubos plásticos de 50 mL tipo Falcon[®] com filetes de mel puro no interior do tubo, para alimentação dos adultos. A tampa do tubo foi coberta com uma malha que permitiu que os parasitoides saíssem e que predadores não entrassem. Os tubos foram colocados no campo no início da manhã no centro das parcelas. O número de ovos no interior dos frascos foi ajustado de modo que um número aproximadamente semelhante das diferentes isolinhagens fossem liberados. Para determinar o número de parasitoides liberadas, os frascos foram recolhidos após 24h no campo e colocadas num congelador de modo que os parasitoides cessassem sua emergência. Cinco amostras de 0,5 cm² de cada cartela de ovos recolhidas dos tubos Falcon[®], foram retiradas e o número de ovos parasitados com orifícios de saída foram contados, para assim se determinar o número de parasitoides que emergiram por frasco. Cerca de 1.500 parasitoides fêmeas foram liberadas por parcela, sendo o número de fêmeas liberadas determinado utilizando-se a razão sexual observada em testes de laboratório. As condições climáticas durante as liberações foram registradas por uma estação meteorológica convencional do Departamento de Engenharia de Biossistemas (ESALQ/USP), localizadas na mesma área experimental.

Em cada parcela 10 cartelas (preparadas com 250 ovos de *A. kuehniella*) foram uniformemente distribuídas por linha, utilizando-se cinco linhas por parcela, num total de 50 cartelas por parcela. Cada linha possuía 10 m de comprimento e a distância entre elas era de 1,90 m. Um dia antes da liberação, 20 cartelas foram distribuídas nas parcelas, a fim de se determinar a presença de *Trichogramma* “selvagem”. As cartelas foram substituídas diariamente até o terceiro dia após a liberação, pois depois deste período apenas uma pequena percentagem de ovos é parasitado (KAZMER; LUCK, 1995). Após serem retiradas do campo as cartelas com os ovos foram mantidas numa câmara climatizada (25 ± 1°C, UR 60 ± 10% e fotofase de 14 h) e os espécimes emergidos armazenados em etanol para posterior extração do DNA que possibilita determinar o tipo

mitocondrial dos descendentes e, portanto, o tipo mitocondrial da fêmea que originou tais descendentes.

2.2.5 Curvas de dissociação de alta resolução dos produtos de PCR em tempo real

Para facilitar a identificação dos três “tipos” mitocondriais uma curva de dissociação de alta resolução dos produtos do PCR em tempo real da COI foi desenvolvida. Como já referido no item 2.2.2 as sequências mitocondriais foram utilizadas como um marcador para determinar exatamente de quais isolinhagens os parasitoides “recapturados” do campo no experimento anterior descendiam. As reações foram realizadas em um volume total de 20 µL contendo 400 nM de uracila, 200 nM de adenina, guanina e citosina 1 mM MgCl, 1X tampão ThermoPol™ (New England Biolabs), 0,25 µM de iniciadores (primer) sentido “senso” (Irvine 311F [presente pesquisa]; 5'-TGGAACAGGTACAGGAACAGG- 3'), 0,25 µM iniciadores (primer) sentido anti-senso (HCO [FOLMER et al., 1994]; 5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'), 0,5X Evagreen (Biotium), 1 unidade de Taq polimerase (New England Biolabs) e 1 unidade de uracil-DNA glicosilase (UDG). Um indivíduo de *T. pretiosum* foi adicionado a cada tubo de reação. Todas as reações foram realizadas em termocicladores Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research) ou Rotor-Gene Q (Qiagen). A programação da reação foi de 95°C durante 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de: 95°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos. Imediatamente após a amplificação, os produtos do PCR em tempo real foram dissociados por meio de fusão numa “rampa de temperatura” que se iniciou a 72°C e aumentou para 80°C, com uma taxa de aquecimento de 0,2°C. A primeira etapa foi realizada durante 90 segundos, e cada aumento de 0,2°C subsequente foi realizada durante 10 segundos. As curvas de dissociação resultantes apresentaram padrões distintos para cada um dos tipos mitocondriais A, B e C (Figura 2). Para cada cartela coletada do campo, oito indivíduos de *T. pretiosum* foram analisados por meio deste processo.

Figura 2- Curva de dissociação de alta resolução para os tipos mitocondriais A, B e C. Cada tipo mitocondrial foi consistentemente identificável por número e posição dos picos. A altura de picos indica a fluorescência relativa na leitura do instrumento Rotor Gene; a leitura da temperatura no eixo x indica a temperatura no tempo em que cada leitura foi feita

2.2.6 Análises Estatísticas

Os dados de seleção e classificação em laboratório das isolinhagens foram analisados por meio de modelos lineares generalizados (GLM) (NELDER; WEDDERBURN, 1972) do tipo quase-poisson para fertilidade e do tipo quase-binomial para análise da razão sexual; este GLM foi ajustado para uma análise fatorial, sendo os fatores isolinhagem (DNA nuclear) e haplótipo (DNA mitocondrial); o valor de "F" foi calculado por meio da ANOVA dos modelos. A verificação da qualidade do ajuste foi feita usando-se um gráfico meio-normal de probabilidades com envelope simulação (DEMÉTRIO; HINDE, 1997; HINDE; DEMÉTRIO, 1998). Quando houve diferença significativa entre os tratamentos, as comparações múltiplas (teste de Tukey, $p < 0,05$) foram feitas por uma função glht do pacote multcomp com "p" ajustado.

As taxas de parasitismo em campo foram analisadas por meio do teste do qui-quadrado modificado. Cada cartela no campo teve a possibilidade de ser parasitada por mais de uma fêmea de *T. pretiosum*. O número de fêmeas que encontrou cada cartela

não pôde ser determinado diretamente, porque não se conseguiu distinguir entre um evento em que uma fêmea de um tipo mitocondrial encontrou uma cartela e parasitou vários ovos, e um evento em que várias fêmeas do mesmo tipo mitocondrial encontraram uma cartela e parasitaram os ovos. Portanto, em vez de calcular um valor de qui-quadrado utilizando-se o termo padrão "observado", os dados do experimento de campo foram analisados utilizando-se um teste de qui-quadrado modificado (Prof. Leonard Nunney¹ - informação pessoal). O termo "observado modificado" foi obtido subtraindo-se o número de cartelas em cada parcela, que foi encontrado por um tipo mitocondrial particular, pelo número total de cartelas colocados na parcela. A seguir, calculou-se o número esperado de cartelas não encontradas por nenhum tipo mitocondrial, com base nos números de parasitoides fêmeas de cada tipo mitocondrial liberado e assumindo que todos os tipos mitocondriais tiveram a mesma chance (p), de não encontrar uma cartela. Foi assumido o pressuposto de que o número de parasitoides que encontraram as cartelas aproxima-se de uma distribuição de Poisson, e calcularam-se os zeros esperados (cartelas não encontrados por cada tipo) para cada parcela.

O número de cartelas parasitadas e de descendentes produzidos por cada isolinhagem foram analisados por uma Análise de Variância (ANOVA), onde as variáveis explanatórias foram o dia de liberação e a isolinhagem dos indivíduos. Um teste de Tukey a 5% foi utilizado para comparar os efeitos significativos das variáveis explicativas. Uma regressão logística (CRAWLEY, 2007) foi realizada para avaliar se a probabilidade de parasitismo nas cartelas por uma isolinhagem em particular foi influenciado (positiva ou negativamente) pelas outras duas isolinhagens liberadas. Para esta análise, a incidência de uma isolinhagem específica foi representada por 1 quando ele estava presente e por 0 quando ele estava ausente. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico "R", versão 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

2.3 Resultados

2.3.1 Seleção e classificação das isolinhagens em laboratório

As diferentes isolinhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 apresentaram um desempenho distinto quanto a sua capacidade de parasitismo (medido pelo número de indivíduos gerados por cada fêmea) em condições de laboratório durante três dias. Houve interação significativa dos dois fatores analisados (isolinagem [DNA nuclear] e haplótipo [DNA mitocondrial]) ($F=3,00$; $p < 0.01$). Para indivíduos das isolinhagens com tipo mitocondrial "A" e "B" são claramente observados três classes, formadas pela

¹ Prof. Leonard Nunney; Departamento de Biologia- Universidade da Califórnia Riverside.

capacidade de parasitismo semelhante (Figura 3). Para as isolinhagens do tipo mitocondrial "C" estas três classes foram menos pronunciadas (Figura 3), uma vez, que apenas a isolinhagem 47C diferiu das demais, com a maior taxa de parasitismo, e as isolinhagens 51C e 29C mostraram valores menores para este parâmetro; todas as outras isolinhagens deste tipo mitocondrial apresentaram valores de parasitismo semelhantes (Figura 3).

Figura 3- Número de descendentes gerados pelas isolinhagens de *T. pretiosum* com três diferentes tipos de DNA mitocondrial. Avaliado em ovos de *A. kuehniella* como hospedeiro alternativo com temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, RH: $60\pm 10\%$, fotofase 14h. Colunas, com mesmas cores seguidas pela mesma letra minúscula entre as isolinhagens não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Colunas seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre os tipos mitocondrias para cada isolinhagem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Colunas sem letra maiúscula não apresentam diferenças significativas entre os diferentes tipos mitocondriais. I- Isolinhagens classificadas como "melhores"; II- Isolinhagem classificada como "pior"; III- Isolinhagens classificadas como "intermediárias".

A razão sexual dos adultos das diferentes isolinhagens mostrou um padrão de três classes distintas, sendo este padrão observado em todos os tipos mitocondriais (Figura 4). Para os dados de razão sexual também houve interação significativa entre os dois fatores analisados (isolinhagem [DNA nuclear] e haplótipo [DNA mitocondrial]) ($F=5,20$; $p > 0,01$). A proporção de machos e fêmeas nas diferentes isolinhagens variou entre 0,3 e 0,84. A partir dos dados de parasitismo e razão sexual foram selecionadas as isolinhagens a serem utilizadas nas liberações de campo, sendo estes dois fatores,

parasitismo e razão sexual, determinantes na classificação das isolinhagens como “Melhor”, “Intermediária” e “Pior”.

Figura 4- Razão sexual das isolinhagens de *T. pretiosum* com três diferentes tipos de DNA mitocondrial. Avaliado em ovos de *A. kuehniella* como hospedeiro alternativo com temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, RH: $60\pm 10\%$, fotofase 14h. Colunas, com mesmas cores seguidas pela mesma letra minúscula entre as isolinhagens não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Colunas seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre os tipos mitocondrias para cada isolinhagem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Colunas sem letra maiúscula não apresentam diferenças significativa entre os diferentes tipos mitocondriais. I- Isolinhagens classificadas como “melhores”; II- Isolinhagem classificada como “pior”; III- Isolinhagens classificadas como “intermediárias”.

2.3.2 Experimento de campo

Por meio das liberações de campo, fica evidente que as isolinhagens classificadas como as melhores (“melhor”) em condições de laboratório, também demonstraram um desempenho superior em campo (Tabela 2, Figuras 5 a 9). A análise de qui-quadrado mostra que as isolinhagens de *T. pretiosum* parasitaram mais cartelas do que o esperado em todas as liberações e dias, com exceção do dia 2 da primeira liberação. O parasitismo por isolinhagens classificadas como melhores (“melhor”) foi numericamente maior em todas as liberações e em todos os dias, porém, a análise do qui-quadrado não possuiu um método apropriado de comparação de médias para mostrar as diferenças entre as isolinhagens.

Tabela 2- Qui-quadrado do parasitismo esperado e “observado modificado” por diferentes isolinhagens de *T. pretiosum* marcadas por meio do DNA mitocondrial, em experimento de campo. Piracicaba, SP, Brasil. Período outubro/2013

Liberação ¹	Parcela ²	Cartelas encontradas ⁴												Cartelas não parasitadas ⁵			Qui-quadrado ⁶			Significância ⁷		
		Fêmeas liberadas ³			Dia 1			Dia 2			Dia 3			Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
		47A	37B	51C	47A	37B	51C	47A	37B	51C	47A	37B	51C									
Primeira	1	1580	1357	1295	26	9	2	3	3	1	9	8	1	17	39	31	10,1	3,20	4,52	<0,01	0,90	0,02
	2	1668	1517	935	32	11	4	3	1	1	27	9	6	10	41	13	9,4	2,18	5,49	<0,01	0,49	0,02
	3	1596	1253	1007	33	10	8	5	1	1	17	8	4	8	44	24	10,4	3,8	9,5	<0,01	0,28	<0,01
	4	1228	1517	1423	27	7	8	4	0	0	17	5	4	16	43	23	8,4	2,98	8,65	0,0123	0,49	<0,01
Segunda		43A	47B	51C	43A	47B	51C	43A	47B	51C	43A	47B	51C									
	1	1566	1670	1427	16	22	2	10	16	4	4	13	3	19	18	27	10,6	0,69	5,3	<0,01	0,02	0,03
	2	1557	1688	1430	11	22	3	13	21	4	10	22	4	18	32	21	10,6	0,85	6,76	<0,01	0,02	0,02
	3	1516	1668	1481	16	31	4	14	24	6	13	15	3	34	30	21	9,5	0,78	5,8	<0,01	0,01	0,02
	4	1514	1660	1493	11	17	2	7	19	5	3	13	2	19	37	25	7,9	0,89	5,6	0,01	0,04	0,03

¹Liberações realizadas em um milharal; Piracicaba, SP, Brasil, ²Número de parcelas utilizadas no experimento; ³Número de fêmeas de cada isolinhagem liberada;

⁴Número de cartelas parasitadas em cada dia de experimento; ⁵Número de cartelas não parasitadas em cada parcela e em cada dia de liberação; ⁶Qui-quadrado “modificado” calculado; ⁷significancia calculada para o qui-quadrado.

O fator “dia” teve efeito sobre a fertilidade ($F = 28,332$, $p < 0,05$ e $F = 5,55$, $p < 0,05$, para a primeira e segunda liberações respectivamente) e no número de cartelas parasitados pelas diferentes isolinhagens ($F = 19,48$, $p < 0,05$ e $F = 4,79$, $p < 0,05$, também para primeira e segunda liberações, respectivamente), ou seja, houve diferenças para fertilidade e número de cartelas parasitadas entre o primeiro, segundo e terceiro dias, em que as cartelas foram expostas ao parasitismo. No final do primeiro dia da primeira liberação a precipitação pluviométrica foi de 10,8 mm e após esta chuva, a UR subiu para 95% e a temperatura média caiu para baixo de 20°C; estas condições foram semelhantes até o terceiro dia, quando a temperatura média foi superior a 20°C e a UR de 80%. Na segunda liberação, a temperatura média e UR foram mais estáveis, sendo que a variação de temperatura entre 25,5 e 26,8°C e UR entre 71 e 75%. Uma forte chuva (50,8 mm) caiu no fim do terceiro dia (Tabela 3).

Tabela 3- Dados climáticos da área experimental, na primeira e segunda liberação de *T. pretiosum* marcadas por meio do DNA mitocondrial (fonte: Departamento de Engenharia de Biossistemas- ESALQ/USP)

Liberação	Dia	Precipitação pluviométrica (mm)	UR (%)	T°C max.	T°C min.	T°C med.
1ª	1	10.8	77	31.5	19.2	25.4
	2	3.9	96	21.1	18.6	19.9
	3	0.0	83	27.2	18.2	22.7
2ª	1	13.2	75	32.7	18.8	25.8
	2	0.0	73	32.8	18.6	25.7
	3	50.8	71	34.0	19.5	26.8

O número de insetos recapturados e analisadas por meio do PCR em tempo real, ou seja, o número de descendentes dos parasitoides liberados foi diferente de acordo com as isolinhagens ($F = 28,332$, $p < 0,05$ e $F = 80,84$, $p < 0,05$, para a primeira e segunda liberações, respectivamente). As isolinhagens classificadas como melhores (melhor) produziram mais descendentes em condições de campo (Figura 5). Na primeira e segunda liberações, o número de insetos recapturados foi, em média, de 1210 e 1245 para as isolinhagens classificadas como "melhor", contra 146 e 117 para a isolinhagem classificada como "pior", resultando numa diferença de 88 e 91%, na primeira e segunda liberações, respectivamente (Figura 5). Deve-se levar em

consideração que oito parasitoides foram amostrados aleatoriamente em cada cartela, mas, nem todas as cartelas tinham pelo menos oito indivíduos; assim, na primeira liberação em 51% das cartelas havia oito ou mais indivíduos enquanto que na segunda 47% das cartelas possuíam oito ou mais parasitoides.

A distribuição das isolinhagens no campo apresentou um padrão em que a isolinhagem "melhor" distribuiu-se mais rápido e amplamente em comparação às demais isolinhagens, pois, já no primeiro dia, as cartelas de pontos mais distantes, em relação ao ponto central de liberação, estavam parasitadas (Figuras 6 e 7). Com o passar dos dias, a taxa de parasitismo diminuiu (Tabela 2). Na primeira liberação, no segundo dia, o parasitismo diminuiu significativamente, em comparação ao segundo dia da segunda liberação, provavelmente devido às condições climáticas (Tabelas 2 e 3; Figura 5a). O número de descendentes produzidos por cartela foi semelhante, independentemente da localização da cartela na parcela. A isolinhagem classificada como "Pior" produziu menos do que oito indivíduos em quase todas as cartelas, nas duas liberações (Figuras 6 e 7).

Para o percentual de cartelas parasitadas pelas isolinhagens, na primeira liberação, houve efeito da interação das variáveis explicativas dia/isolinhagem ($F = 11,43$, $p < 0,001$); na segunda liberação, esta interação significativa não esteve presente ($F = 1,4$, $p = 0,25$), e, por conseguinte, apenas a variável "isolinhagem" foi exposta na Figura 8 a e b. Novamente, as isolinhagens de *T. pretiosum* classificadas como as melhores (melhor) em laboratório, parasitaram um maior número de cartelas em comparação às isolinhagens "intermediárias", que por sua vez parasitaram mais cartelas do que a isolinhagem "pior" (Figura 8 a e b). Em geral, as isolinhagens de *T. pretiosum* classificadas como "melhores" parasitaram, em média 40% das cartelas, enquanto que a "pior" parasitou menos de 20%, em ambas as liberações.

A análise de regressão logística mostrou que a isolinhagens classificadas como "melhores" e "intermediárias" não sofreram competição das demais isolinhagens, para parasitar as cartelas em campo. Por outro lado a isolinhagem "pior" sofreu influência negativa da competição com as demais isolinhagens. O fator "dia" não afetou o parasitismo da isolinhagem "pior"; porém as isolinhagens classificadas como "melhor" e "intermediária" foram afetadas pelo "dia" (Tabela 4). O número de cartelas parasitadas

por duas ou três isolinhagens apresentaram o mesmo padrão ao longo dos três dias com, uma proporção maior de cartelas parasitadas por apenas uma isolinhagem, entre 68,6 e 72,58%, em média, e menos de 4% das cartelas foram parasitadas pelas três isolinhagens simultaneamente, nas duas liberações (Fig. 9 a, b). O número de cartelas parasitadas por duas isolinhagens apresentaram uma posição intermediária, em comparação ao parasitismo de uma ou três isolinhagens, em ambas as liberações.

Figura 5- Número total de descendentes de *T. pretiosum* geradas em campo para cada uma das isolinhagens, marcadas por meio do DNA mitocondrial, avaliado ao longo três dias. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as isolinhagens de parasitoides (Teste de Tukey: $p < 0,05$). A) Primeira liberação B) Segunda liberação. Piracicaba-SP-Brasil (long. $-47^{\circ} 64' 31''$ Lat. $-22^{\circ} 70' 01''$)

Figura 6- Distribuição e intensidade do parasitismo em campo das diferentes isolinhagens de *T. pretiosum* marcadas por meio do DNA mitocondrial, por parcela (letras) ao longo dos dias, na primeira liberação. As cores indicam a identidade da isolinhagem e o tamanho do círculo indica a densidade relativa do parasitismo. Piracicaba-SP-Brasil (long. -47° 64' 31" Lat.-22° 70' 01"). As letras à direita da figura indicam as parcelas experimentais, os números no eixo y indicam a distância entre as cartelas na linha; já os números no eixo x indicam a distância entre as linhas.

Figura 7- Distribuição e intensidade do parasitismo em campo das diferentes isolinhagens de *T. pretiosum* marcadas por meio do DNA mitocondrial, por parcela (letras) ao longo dos dias, na segunda liberação. As cores indicam a identidade da isolinhagem e o tamanho do círculo indica a densidade relativa do parasitismo. Piracicaba-SP-Brasil (long. -47° 64' 31" Lat.-22° 70' 01"). As letras à direita da figura indicam as parcelas experimentais, os números no eixo y indicam a distância entre as cartelas na linha; já os números no eixo x indicam a distância entre as linhas

Figura 8- Parasitismo das isolinhagens de *T. pretiosum* marcadas por meio do DNA mitocondrial no campo, medido pelo número de cartelas de parasitadas, colunas seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). A) primeira liberação ($F = 24,28$, $p < 0,01$). B) Segunda liberação ($F = 61,94$, $p > 0,01$). Piracicaba-SP-Brasil (long. $-47^{\circ} 64' 31''$ Lat. $-22^{\circ} 70' 01''$)

Figura 9- Ocorrência simultânea, ou seja, número de cartelas parasitadas por uma, duas ou três diferentes isolinhagens de *T. pretiosum* marcadas por meio do DNA mitocondrial. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre o total de parasitoides encontrados quando 1, 2 ou 3 isolinhagens ocorrerem simultaneamente (Teste de Tukey: $p < 0,05$). A) Primeira liberação. B) Segunda liberação. Piracicaba-SP-Brasil (long. $-47^{\circ} 64' 31''$ Lat. $-22^{\circ} 70' 01''$)

Tabela 4- Estimativas de parâmetros do modelo de regressão logística para efeitos das isolinhagens e dias no parasitismo de *T. pretiosum* em campo Piracicaba-SP-Brasil (long. -47° 64' 31" Lat.-22° 70' 01")

Liberação	Isolinagem	Fator Explanatório	Parâmetro estimado (EP)	Valor z	Valor de P
Primeira	Melhor	Intercepto	0.34 ($\pm$ 0.22)	1.502	0.133
		Isolinagem	0.07($\pm$ 0.04)	1.606	0.108
		Dia	-0549 ($\pm$ 0.11)	-4.991	>0.05
	Intermediária	Intercepto	-1.21 ($\pm$ 0.32)	-3.71	<0.05
		Isolinagem	0.001($\pm$ 0.03)	0.267	0.789
		Dia	-0.29 ($\pm$ 0.14)	-1.992	>0.05
	Pior	Intercepto	-2.53 ($\pm$ 0.45)	-5.53	>0.05
		Isolinagem	0.09($\pm$ 0.04)	2.102	>0.05
		Dia	-0.21 ($\pm$ 0.19)	-1.034	0.3009
Segunda	Melhor	Intercepto	-0.68 ($\pm$ 0.27)	-2.506	P<0.05
		Isolinagem	0.02 ($\pm$ 0.03)	0.802	0.42
		Dia	-0.35 ($\pm$ 0.12)	-2.792	<0.05
	Intermediária	Intercepto	0.05 ($\pm$ 0.22)	0.250	0.802
		Isolinagem	0.07 ($\pm$ 0.03)	1.904	0.0568
		Dia	-0.29 ($\pm$ 0.10)	-2.79	<0.05
	Pior	Intercepto	-3.17($\pm$ 0.5)	-6.32	<0.05
		Isolinagem	0.102($\pm$ 0.04)	2.192	<0.05
		Dia	0.12($\pm$ 0.2)	0.644	0.519

2.4 Discussão

As isolinhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 geneticamente variáveis demonstraram diferenças no desempenho reprodutivo em laboratório, semelhante às observações previamente relatadas para as linhagens criadas nas mesmas condições (CERUTTI; BIGLER, 1995; SORATI; NEWMAN; HOFFMANN, 1996; THOMSON; HOFFMANN, 2002; GUZMÁN-LARRALDE et al., 2013). Não só o parasitismo é influenciado pela variabilidade genética intraespecífica de *Trichogramma*, pois segundo Wajnberg (1994) sete outros atributos também sofrem influência do genótipo; ou seja, *i*) comportamento de caminamento; *ii*) distribuição espacial; *iii*) “tempo de manipulação” do ovo do hospedeiro; *iv*) superparasitismo; *v*) razão sexual; *vi*) taxa de desenvolvimento e *vii*) viabilidade do imaturo. Na presente pesquisa, as isolinhagens utilizadas vinham sendo criadas em laboratório por cinco anos e cada isolinhagem era praticamente, 100% homozigota, de modo que cada genótipo foi incapaz de adaptar-se

às condições de laboratório e predominar, já que praticamente nenhuma variação genética estava presente dentro das isolinhagens.

A condição climática no campo durante os experimentos foi semelhante à condição climática na qual os insetos foram expostos durante a seleção de laboratório; ou seja, temperatura de 25°C, e UR de 60%. Exceto para o segundo dia da primeira liberação, onde a temperatura caiu abaixo de 20°C e a UR foi superior a 95%, e a atividade de *T. pretiosum* praticamente cessou em campo, nos demais dias a taxa de parasitismo foi consideravelmente alta com uma média de mais de 50% das cartelas parasitadas por dia. Deve-se levar em consideração que a UR ao longo do ano no sul da Califórnia é baixa, com média máxima de 60% (no mês mais chuvoso) (CIMIS, 2014). A alta UR registrada no segundo dia do primeiro experimento pode ter afetado as isolinhagens de *T. pretiosum* americanas, uma vez que existe uma correlação negativa entre a UR e o parasitismo (BOUCHIER; SMITH, 1996). Além da UR a baixa temperatura registrada neste segundo dia também pode ter afetado a atividade dos parasitoides das diferentes isolinhagens. De acordo com Bouchier e Smith (1996), Dutton, Cerutti e Bigler (1996) temperaturas entre 15 a 20°C são um limiar mínimo para a eficácia de espécies de *Trichogramma* em campo. Fournier e Boivin (2000) complementaram esta informação com um experimento que demonstrou que existe correlação direta entre a radiação solar e temperatura, relatando que radiação menor que 15000 kJ/m² e temperatura de 15°C são um limiar para a atividade, em campo, de *T. pretiosum* e *Trichogramma evanescens* Westwood, 1833. Quanto a capacidade de voo do parasitoide, Forsse, Smith e Bouchier (1992) relataram que menos de 4% dos indivíduos da espécie *Trichogramma minutum* Riley, 1871 voaram a 20°C enquanto uma percentagem muito mais elevada voava a 25°C.

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa com parasitismo médio de 50% das cartelas oferecidas (Tabela 2) é possível inferir que *T. pretiosum* proveniente de outro país e ecossistema, possui a capacidade de parasitar e persistir (pelo menos por três dias) em condições de campo totalmente diferentes de onde foram inicialmente coletados, considerando-se que todas as isolinhagens utilizadas nesta pesquisa são provenientes do sul da Califórnia, EUA. Segundo Hassan (1994) a eficácia de *Trichogramma* no campo depende, em grande parte, do seu comportamento de busca

(localização de hábitat e localização de hospedeiro) e preferência hospedeira (reconhecimento, aceitação, adequação), características que as isolinhagens utilizadas demonstraram possuir, sendo mais pronunciada nas isolinhagens classificadas como “melhores” e menos na classificada como “pior” (Figura 5).

Observou-se uma correlação direta entre a seleção de laboratório e o subsequente desempenho em campo das isolinhagens de *T. pretiosum*, pois, em ambas as liberações, a capacidade de parasitismo no campo mostrou o mesmo padrão do laboratório, ou seja, isolinhagens classificadas como melhores (“melhor”) em laboratório, apresentaram o melhor desempenho em campo. Bouchier e Smith (1996) afirmaram que a fertilidade aferida em laboratório é um bom indicativo para o desempenho de *T. minutum* em campo. Dutton, Cerutti e Bigler (1996) também descreveram o mesmo padrão para *Trichogramma brassicae* Bezdenko, 1968, que teve a fertilidade medida em laboratório em ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879); no entanto, os autores discutem que um maior número de parâmetros da qualidade do parasitoide deve ser avaliado, para uma previsão de desempenho mais precisa. Os resultados encontrados por Thomson e Hoffmann (2002) mostraram uma relação inversa entre o material selecionado em laboratório e o resultado no campo, com a espécie *Trichogramma carverae* Oatman & Pinto, 1987 em videira. Entretanto, a metodologia foi diferente daquela utilizada na presente pesquisa, pois eles não permitiram a competição direta entre as linhagens testadas.

A competição direta entre as isolinhagens podem explicar as grandes diferenças encontradas no campo, de acordo com Wajnberg e Colazza (1998), pois as linhagens têm diferentes capacidades de procura de hospedeiros, assim como caminhamento na superfície das folhas. Os autores argumentam que a área forrageada pelo parasitoide é um parâmetro importante que deve ser relacionado com a eficiência de agentes de controle biológico. As isolinhagens classificadas em laboratório como “Melhores”, seguramente apresentam uma alta capacidade de busca por hospedeiro assim como caminhamento nas folhas. Os resultados mostram que menos do que 4% das cartelas foram parasitadas por mais de três isolinhagens simultaneamente; este resultado pode estar relacionada com a utilização de feromônios de marcação, para evitar que outras fêmeas ataquem os ovos já parasitados pelas isolinhagens mais agressivas e que

parasitam primeiramente (ROITBERG; MANGEL, 1988). O baixo parasitismo registrado em campo para os indivíduos da isolinhagem "pior" pode estar relacionado, além da baixa fertilidade, ao uso destes feromônios de marcação utilizados pela isolinhagem classificadas como "melhor". Os indivíduos das isolinhagens "melhores" têm uma dispersão mais rápida e ampla no campo, iniciando-se no primeiro dia de liberação e persistindo pelo restante dos dias avaliados no presente experimento. As cartelas localizadas próximas ao ponto de liberação foram encontradas com uma mesma frequência em relação às cartelas localizadas em um ponto mais distante (Figura 6 e 7).

A utilização de DNA mitocondrial, como um marcador, foi uma técnica eficiente e não laboriosa. Considerando-se o diminuto tamanho de *T. pretiosum* a utilização de outro tipo de marcador pode resultar em experimentos de campo menos precisos. Esta técnica também não é tóxica para o inseto e ao meio ambiente, é relativamente fácil de ser utilizado (depois da criação das populações) e é claramente identificável, alcançando quase todos os pressupostos para um marcador ideal proposto por Hagler e Jackson (2001), o custo de obtenção dos instrumentos é relativamente elevado, porém uma vez que um termociclador, para PCR em tempo real esteja, disponível, o custo dos ingredientes para determinar o marcador mitocondrial não é um fator limitante para a realização das marcações.

Fernandes (2002) argumenta que um marcador não deve afetar o comportamento dos insetos, deve ser durável, bem como, a manipulação dos insetos e as liberações não podem afetar a longevidade o comportamento dos mesmos. Nem todos estes pressupostos puderam ser comprovados por meio do presente experimento. Deve-se considerar que a suposta "neutralidade" dos tipos mitocondriais não ocorreu, dado que, na seleção de laboratório, o desempenho de indivíduos das isolinhagens classificadas como "melhor" ou "pior" mudou entre os haplótipos, e este desempenho não foi testado sob condições de campo para todos os tipos mitocondriais simultaneamente. Por outro lado, os resultados mostram que as isolinhagens 47A e 47B que foram classificadas como "melhores" em teste de laboratório apresentaram o melhor desempenho em duas liberações de campo. Igualmente para as isolinhagens classificadas em laboratório como "intermediárias" e "pior", houve correspondência entre a seleção de laboratório e o desempenho em campo.

Considerando-se que diferentes haplótipos possuem biológicas diferentes, o uso de DNA mitocondrial como um marcador, deve levar em conta dados prévios de laboratório das linhagens a serem liberadas. Com isto, erros em programas de controle biológico ou em quaisquer ensaios biológicos utilizando este método serão evitados. Neste caso, deve-se considerar que cada indivíduo da isolinhagem "criada" pelo introgressão do DNA mitocondrial em uma isolinhagem (marcada pelo DNA nuclear) irá formar uma "nova linhagem", com diferentes necessidades e comportamentos biológicos, em comparação com a mesma "isolinagem nuclear" com diferente DNA mitocondrial.

2.5 Conclusões

O desempenho reprodutivo em condições de laboratório é suficiente e preciso para a previsão da subsequente performance, em condições de campo, das isolinhagens geneticamente variáveis de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879.

Os diferentes tipos mitocondriais geram linhagens com desempenhos biológicos variáveis.

O uso das sequências mitocondriais como um marcador se mostra uma técnica precisa e eficiente para avaliação do desempenho, com competição direta, de *T. pretiosum* em condições de campo.

REFERÊNCIAS

- ANTOLIN, M.F. A genetic perspective on mating systems and sex ratios of parasitoid wasps. **Researches on Population Ecology**, Tóquio, v. 41, p. 29-37. 1999.
- BENNETT, D.M.; HOFFMANN, A.A. Effects of Size and Fluctuating Asymmetry on Field Fitness of the Parasitoid *Trichogramma carverae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Journal of Animal Ecology**, Oxford, v. 67, p. 580-591, 1998
- BIGLER, F. Quality control in *Trichogramma* production. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S.A. **Biological Control with Egg Parasitoids**. Wallingford: CABI, 1994. cap.5, p. 91–111.
- BOURCHIER, R.S.; SMITH, S.M. Influence of environmental conditions and parasitoid quality on field performance of *Trichogramma minutum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 80, p. 461-468, 1996.
- CERUTTI, F.; BIGLER, F. Quality assessment of *Trichogramma brassicae* in the laboratory. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 75, 19-26, 1995.
- CALIFORNIA IRRIGATION MANAGEMENT INFORMATION SYSTEM (CIMIS). Disponível em: <www.cimis.water.ca.gov>. Acesso em: 12 nov. 2014
- CRAWLEY, M.J. **The R book**. Chichester: John Wiley., 2007. 942p.
- DEMÉTRIO, C.G.B.; HINDE, J. Half-normal plots and overdispersion. **Glim Newsletter**, v. 27, p. 19-26, 1997.
- DUTTON, A.; CERUTTI, F.; BIGLER, F. Quality and environmental factors affecting *Trichogramma brassicae* efficiency under field conditions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 81, p. 71-79, 1996.
- FABRITIUS, K. Investigations on inbreeding of *Muscidifurax raptor* under laboratory conditions (Hymenoptera: Pteromalidae). **Entomologia Generalis**, Stuttgart, v. 9, p. 237-241, 1984.
- FERNANDEZ, O. A. Uso de marcadores no controle biológico. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. **Controle biológico no Brasil – parasitóides e predadores**. Manole: Barueri, 2002. cap. 7 , p. 115-123.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, Berlim, v. 3, p. 294-299, 1994.

FORSSE, E.; SMITH, S.M.; BOURCHIER, S. Flight initiation in the egg parasitoid *Trichogramma minutum*: effects of ambient temperature, mates, food, and host eggs. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 62, p. 147-154, 1992.

FOURNIER, F.; BOIVIN, G. Comparative Dispersal of *Trichogramma evanescens* and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Relation to Environmental Conditions. **Environmental Entomology**, Lanhan, v. 29, p. 55-63, 2000.

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**, Berlim, v. 138, p. 315–391, 2014.

HAGLER, J.R.; JACKSON, C.G. Methods for marking insects: current techniques and future prospects. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 46, p. 511-543, 2001.

HASSAN, S.A. Strategies to select *Trichogramma* species for use in biological control. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S. A. **Biological Control with Egg Parasitoids**. Wallingford: CABI, 1994. cap. 3, p. 55–71.

HASSAN, S.A. Criação da traça do milho, *Sitotroga cerealella*, para a produção massal de *Trichogramma*. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. cap. 6, p. 173- 182.

HINDE, J.; DEMÉTRIO, C.G.B. Overdispersion: models and estimation. **Computational Statistics & Data Analysis**, Amsterdã, v. 27, p. 151-170, 1998.

HOFFMANN, A.A.; WOODS, R.E.; COLLINS, E.; WALLIN, K.; WHITE, A.; MCKENZIE, J.A. Wing shape versus asymmetry as an indicator of changing environmental conditions in insects. **Australian Journal of Entomology**, Dordrecht, v. 44, p. 233-243, 2005.

HOPPER, K.R.; ROUSH, R.T. Mate finding. dispersal. number released and the success of biological-control introductions. **Ecological Entomology**, Dordrecht, v. 18, p. 321-331, 1993.

KAZMER, D.J.; LUCK, R.F. Field-tests of the size-fitness hypothesis in the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum*. **Ecology**, Tempe, v. 76, p. 412-425, 1995.

LEGNER, E.F.. Prolonged culture and inbreeding effects on reproductive rates of 2 pteromalid parasites of muscoid flies. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanhan, v. 72, p.114-118, 1979.

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

LENTEREN, J.C. van. Current situation of biological control (including region/country reviews). In: _____. **IOBC Internet Book of Biological Control**. Wageningen: IOBC, 2008. chap. 5, p. 41-51.

LI, C.C. **Population Genetics**. Chicago: University of Chicago Press, 1955. 366p.

LUNA, M.G.; HAWKINS, B.A. Effects of inbreeding versus outbreeding in *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera : Pteromalidae). **Environmental Entomology**, Lanhan, v. 33, n. 3, p. 765-775, 2004.

NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society. Series A (General)**, London, v. 135, p. 370-384, 1972.

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

PARRA, J.R.P. Mass rearing of egg parasitoids for biological control programs. In: CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, A. **Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma***. New York: Springer, 2010. cap. 10, p. 267-292.

PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. Controle biológico: terminologia. In: _____. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. cap. 1, p. 1-13.

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: VISON, B. ***Trichogramma* in augmentative biological control: A worldwide view of the past, present and future**. *in press*. 2015.

PREZOTTI, L.; PARRA, J.R.P.; VENCOSKY, R.; COELHO, A.S.G.; CRUZ, I. Effect of the size of the founder population on the quality of sexual populations of *Trichogramma pretiosum*, in laboratory. **Biological Control**, Berlim, v. 30, n. 2, p. 174-180, 2004.

RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; BENSON, G.O. **How a plant corn develops?** Ames: Iowa State University of Science and Technology/Cooperative Extension Service, 1997.(Special Report,.48).

R DEVELOPMENT CORE TEAM R. R version 2.15.1. Vienna, 2010. Disponível em: <www.R-project.org>. Acesso em: 15 Jul. 2012.

ROITBERG, B.D.; MANGEL, M. On the evolutionary ecology of marking pheromones. **Evolutionary Ecology**, Berlim, v. 2, p. 289-315, 1998.

SMITH, S.M. Biological Control with *Trichogramma*: advances, successes and potential of their use. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 50, p. 375-406, 1996.

SORATI, M.; NEWMAN, M.; HOFFMANN, A.A. Inbreeding and incompatibility in *Trichogramma brassicae*: Evidence and implications for quality control. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 78, n. 3, p. 283-290, 1996.

THOMSON, L.J.; HOFFMANN, A.A. Laboratory fecundity as predictor of field success in *Trichogramma carverae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v. 95, n. 5, p. 912-917, 2002.

UNRUH, T.R.; WHITE, W.; GONZALEZ, D.; GORDH, G.; LUCK, R.F. Heterozygosity and effective size in laboratory populations of *Aphidius ervi* [Hym, Aphidiidae]. **Entomophaga**, Paris, v. 28, n. 3, p. 245-258, 1983.

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

WAJNBERG, E.; COLAZZA, S. Genetic variability in the area searched by a parasitic wasp: analysis from automatic video tracking of the walking path. **Journal of Insect Physiology**, Berlim, v. 44, p. 437-444, 1998.

WAJNBERG, E. Intra-population genetic variation in *Trichogramma*. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S. A. **Biological Control with Egg Parasitoids**. Wallingford: CABI, 1994. cap.12, p. 245-272. p. 245-272.

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

3 A UR AFETA A CAPACIDADE DE VOO DE ISOLINHAGENS DE *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 DE DIFERENTES ORIGENS E COM DIFERENTES MARCADORES MITOCONDRIAIS?

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de voo de seis isolinhagens geneticamente variáveis de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879. Estes parasitoides possuem diferente desempenho reprodutivo, em laboratório, e foram coletados em climas distintos. Das isolinhagens utilizadas, cinco foram coletados em um local de clima mediterrânico, em Irvine, CA, EUA e uma em clima tropical de altitude, em Piracicaba, SP, Brasil. Para que este objetivo fosse alcançado um teste de voo de curto alcance foi realizado utilizando-se as diferentes isolinhagens de *T. pretiosum*, em duas condições de UR do ar, ou seja, 80% simulando a UR do verão de clima tropical de altitude e 30%, simulando a UR do verão do clima mediterrânico. Apenas a isolinhagem de Piracicaba foi afetada pela UR, sendo que os insetos voaram aproximadamente 30% menos em condições de baixa UR. As isolinhagens americanas não foram afetadas pelas condições de UR e apresentaram capacidade de voo superior a 75% em ambas as condições. A partir dos resultados da presente pesquisa conclui-se que para algumas linhagens, as condições ambientais do local onde se pretende liberar *T. pretiosum*, se distintas do hábitat natural do parasitoide, podem afetar negativamente o voo deste inseto. Entretanto, o teste de voo não possui acurácia suficiente para selecionar a melhor isolinhagem de *T. pretiosum* entre as geneticamente variáveis e com diferentes performances em campo e laboratório, provenientes de um mesmo hábitat.

Palavras-chave: Controle de qualidade; Teste de voo da IOBC; Controle biológico aplicado

Abstract

The objective of this study was to evaluate flight capacity of six isofemale lines of *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, genetically variable. These parasitoids have different reproductive performance in the laboratory and were collected in different climatic conditions. Five isofemale strains used were collected in an Mediterranean climate in Irvine, CA, USA and one in a high tropical climate, in Piracicaba, SP, Brazil. For that purpose, a short-range flight test was carried out using the different isofemale lines of *T. pretiosum*, under two RH, i.e., 80% simulating the high tropical climate summer UR and 30%, simulating RH summer in an Mediterranean climate. Only the isofemale line from Piracicaba was affected by RH, and the percentage of no flying insects was about 30% smaller in low RH conditions. American isofemale lines were not affected by the RH conditions and presented flight capacity higher than 75% in both conditions. The results allowed to conclude that, for some lines, the environmental conditions of the release sites, if distinct from the natural habitat of the parasitoid, may adversely affect flight capacity of the insect. However, the flight test does not have enough accuracy to select the best *T. pretiosum* isofemale line genetically variable from

the same habitat, which already presents different performances in the field and laboratory.

Keywords: Quality control; IOBC flight test; Applied biological control

3.1 Introdução

Parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma* estão entre os inimigos naturais mais utilizados e estudados no mundo (WAJNBERG; HASSAN, 1994; PARRA; ZUCCHI, 1997; CÔNSOLI, PARRA; ZUCCHI, 2010). Na Rússia, de 3 a 10 milhões de hectares foram "tratados" anualmente com espécies de *Trichogramma* para controle de pragas em diversas culturas agrícolas (van LENTEREN 2008). Atualmente, no Brasil, uma área de aproximadamente 500.000 ha de cana-de-açúcar vem sendo tratada com *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 para o controle de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794), além da sua utilização em grandes áreas para controle de *Chrysodeixis includens* (Walker, 1857) e *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1827), em soja e em áreas menores para o feijoeiro, por exemplo (PARRA et al., 2015). Um dos fatores para o sucesso do uso de *Trichogramma* está relacionado à possibilidade de se criar, com relativa facilidade, grandes quantidades deste inseto em condições de laboratório utilizando-se hospedeiros alternativos (FLANDERS, 1927; PARRA, 2010). Ao redor do mundo, empresas (públicas ou privadas) produzem comercialmente *Trichogramma*; entretanto, para o sucesso de programas de controle biológico, utilizando estes parasitoides, os insetos produzidos por estas empresas devem ter requisitos mínimos de qualidade, especialmente em condições de campo (van LENTEREN, 2003).

De acordo com Dutton e Bigler (1995) a capacidade de voo de *Trichogramma* é uma importante característica, que pode estar relacionada com o sucesso de programas de controle biológico, pois a dispersão inicial e forrageamento do parasitoide no campo estão diretamente relacionadas com a capacidade dos parasitoides se dispersarem a partir dos pontos de liberação. Para medir a capacidade de voo de curto alcance, como um parâmetro de qualidade em condições de laboratório, foi desenvolvida uma unidade de teste de voo (DUTTON; BIGLER, 1995). De acordo com van Lenteren (2003) este tipo de teste de voo foi adotado como padrão pela Organização Internacional para o Controle Biológico (IOBC); com algumas modificações descritas por Prezotti et al. (2002).

A literatura entomológica descreve que diferentes linhagens de *Trichogramma* apresentam diferenças em seus parâmetros biológicos, como a capacidade de voo em laboratório e campo (CERUTTI; BIGLER, 1995), desempenho reprodutivo em campo e laboratório (SORATI; NEWMAN; HOFFMANN, 1996; THOMSON; HOFFMANN, 2002; GUZMÁN-LARRALDE et al., 2014) e eficiência de parasitismo e dispersão em condições de campo (DUTTON; CERUTTI; BIGLER, 1996; BOURCHIER; SMITH, 1996; FOURNIER; BOIVIN, 2000). Existe uma lacuna de informação no que se refere à influência de diferentes condições de umidade relativa do ar na capacidade de voo de *Trichogramma*, bem como faltam estudos de isolinhagens com variabilidade genética comprovada por meio de técnicas de biologia molecular.

O objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade de voo nas UR de 80% e 30%, de seis isolinhagens com variações biológicas e genéticas, coletados em climas distintos, cinco delas provenientes de Irvine-CA-EUA com clima mediterrânico (de acordo com Köppen Csa) e uma de Piracicaba-SP-Brasil, com clima tropical de altitude (de acordo com Köppen Cwa) (KOTTEK et al., 2006).

3.2 Material e métodos

3.2.1 Isolinhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 utilizadas

Ovos de *Manduca sexta* (L., 1763) foram coletados em plantas de tomateiro na Estação Costeira Sul da Universidade da Califórnia, em Irvine, CA (lat.: 33 ° 41' N; long.: 117 ° 43' O) com clima mediterrânico (de acordo com Köppen Csa) (KOTTEK et al., 2006). Uma única fêmea de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 coletada de cada ovo do hospedeiro foi copulada com um macho proveniente do mesmo ovo, e criada individualmente iniciando-se assim uma isolinhagem. As isolinhagens foram mantidas em condições de laboratório, utilizando-se ovos do hospedeiro alternativo *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879), com 24 h de idade e esterilizados em luz UV. A cada geração uma única fêmea, proveniente das matrizes, foi copulada com seu irmão, e utilizada para iniciar a geração seguinte; este protocolo de endogamia foi seguido por nove gerações. Depois das referidas nove gerações, as linhagens de isofêmeas (isolinhagens) resultantes devem ter um coeficiente de endogamia de pelo menos 86% (LI, 1955). Por meio deste protocolo de endogamia se eliminou a maior parte da

variação genética das isolinhagens, sobrando menos de 14% da heterozigosidade inicial em cada isolinhagem.

Nas populações de *T. pretiosum* coletadas em campo foram encontrados três “tipos” mitocondriais diferentes (haplótipos) Ma, Mb e Mc, e que diferem da sequência da COI mitocondrial mais comum (Mcom). Através de protocolos de retrocruzamentos, criaram-se três populações de cada uma das isolinhagens marcadas por DNA nuclear, sendo que cada população diferiu apenas pelo seu marcador mitocondrial. O protocolo para a criação destas populações seguiu o método descrito no item 2.2.2 (capítulo 2).

As isolinhagens a serem utilizadas no teste de voo foram as mesmas utilizadas nas liberações de campo do primeiro experimento (capítulo 2) e que haviam sido classificadas em três categorias, ou seja, “melhor”- Isolinhagens que possuem maior fertilidade e razão sexual mais alta; “intermediária”- Isolinhagens que apresentam um valor de fertilidade e razão sexual médios e “pior”- Isolinhagens que apresentam a pior aptidão reprodutiva (Tabela 1). Estas isolinhagens dos EUA foram comparadas com uma isolinhagem brasileira, coletada em um milharal na cidade de Piracicaba, SP, Brasil (lat: 22 ° 70 'S, 47 ° longa 63' O) local de clima tropical de altitude (de acordo com Köppen Cwa), que também teve seu DNA da COI amplificado em PCR de tempo real, para identificação do tipo mitocondrial (Tabela 1).

A identificação dos quatro “tipos” mitocondriais (haplótipos) foi realizada por meio de uma curva de dissociação de alta resolução dos produtos do PCR em tempo real da COI. As reações foram realizadas em um volume total de 20 µL contendo 400 nM de uracila, 200 nM de adenina, guanina e citosina 1 mM MgCl, 1X tampão ThermoPol™ (New England Biolabs), 0,25 µM de iniciadores (primer) sentido “senso” Irvine 311F (5'-TGGAACAGGTACAGGAACAGG- 3 '), 0,25 µM iniciadores (primer) sentido anti-senso HCO (5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (FOLMER et al., 1994), 0,5X Evagreen (Biotium), 1 unidade de Taq polimerase (New England Biolabs) e 1 unidade de uracil-DNA glicosilase (UDG) (Tabela 1). Um indivíduo de *T. pretiosum* foi adicionado a cada tubo de reação. Todas as reações foram realizadas em termocicladores Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research) ou Rotor-Gene Q (Qiagen). A programação das reações foi de 95°C durante 5 minutos, e um ciclo de 95°C durante 15”, 55°C durante 30”, 68°C durante 30”; num total de 35 ciclos. Imediatamente após a amplificação, os

produtos do PCR em tempo real foram dissociados por meio de fusão numa “rampa de temperatura” que se iniciou a 72°C e aumentou para 80°C, com uma taxa de aquecimento de 0,2°C. A primeira etapa foi realizada durante 90s, e cada aumento de 0,2°C subsequente foi realizada durante 10s. As curvas de dissociação resultantes apresentaram padrões distintos para cada um dos tipos mitocondriais A, B, C e *Piracicaba*.

Tabela 1- Classificação e performance reprodutiva das seis isolinhagens de *T. pretiosum*, em laboratório, utilizadas no experimento e obtidas em ovos de *A. kuehniella*. Temperatura: 25±1°C; UR: 60±10%; fotofase 14h

Isolinhaagem	Classificação ¹
Irvine-47 A	melhor
Irvine-47 B	melhor
Irvine-43 A	intermediária
Irvine-37 B	intermediária
Irvine-51 C	pior
Piracicaba	não classificado*

¹Classificação das isolinhagens efetuada no item 2.2.3 do capítulo 2.

3.2.2 Procedimento para o teste de voo

A unidade de teste de voo utilizada foi a do modelo ESALQ proposta por Prezotti et al. (2002) que baseou-se em Dutton e Bigler (1995). A unidade consistiu de um cilindro de PCV (Ø 18 cm X h 11 cm) com a parte superior tampada com uma placa de Petri de 12 cm de diâmetro transparente contendo cola “stick” que serviu para captura de adultos voadores de *T. pretiosum*. A parte interna do cilindro foi forrada com uma folha de papel preto, a fim de facilitar o voo dos insetos em direção à luz (na parte superior). Nesta folha de papel preto um anel de 0,5 centímetros de espessura foi feito com cola “stick”, localizado a 3,5 centímetros do fundo do tubo e que funcionou como uma barreira para capturar os insetos que caminhavam. Uma cartela contendo aproximadamente 150 ovos parasitados, prontos para emergir foi colocada no fundo de um tubo de vidro de 1,5 cm de diâmetro por 8,5 cm de altura, colocado no centro do cilindro de PVC, com a finalidade de dar tempo para a expansão das asas de *T. pretiosum* após a emergência (Fig. 1) (PREZOTTI et al., 2002); este tubo continha uma gotícula de mel puro como alimento de adultos de *T. pretiosum*.

Figura 1- Unidade para teste de voo modelo Esalq: A) placa de Petri transparente com cola "stick" para captura de *T. pretiosum* voador. B) Tubo de vidro de 1,5 x 8,5, centímetros para permitir a expansão das asas, contendo uma gotícula de mel puro para alimentação dos adultos. C) Anel de cola "stick" a 3,5 centímetros da parte inferior da gaiola, para retenção dos indivíduos caminhadores (PREZOTTI et al., 2002)

A capacidade de voo de cada isolinhagem de *T. pretiosum* foi testada em duas diferentes condições de UR: $30 \pm 10\%$ (simulando umidade do verão em Irvine- CA) e $80 \pm 10\%$ (simulando umidade do verão em Piracicaba-SP). A temperatura da câmara climatizada onde foram colocadas as unidades de voo, foi regulada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 14h, sendo o teste realizado com cinco repetições para cada isolinhagem e UR.

O voo foi permitido por três dias e após este período, as unidades para teste de voo foram colocadas em um freezer (-20°C), para facilitar a contagem dos adultos de *T. pretiosum*. Foi avaliado o número de parasitoides caminhadores, voadores e não voadores, sendo o total em cada local do PVC da unidade de teste de voo, transformado em porcentagem.

3.2.3 Análises estatísticas

Os dados de porcentagem de caminhadores, voadores e não voadores foram analisados por meio de uma Análise de Variância (ANOVA) fatorial, com o ajuste do modelo verificado por meio de um gráfico de envelope de simulações “hnp”. As médias foram comparadas por múltiplas comparações (teste de Tukey, $p < 0,05$) realizadas por meio da função `glht` do pacote `multcomp` com ajuste dos valores de p . Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico “R”, versão 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

3.3 Resultados

As duas umidades relativas estudadas, 30 e 80%, em laboratório, não influenciaram a capacidade de voo das isolinhagens americanas de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879. Porém, a isolinhagem brasileira apresentou uma menor porcentagem de indivíduos voadores na UR mais baixa (iso*ur¹: $F = 5,2988$; $p = 0,00025$) (Tabela 2, Figura 2). Na UR mais alta, simulando o verão tropical de altitude, todas as linhagens tiveram o mesmo comportamento, apresentando percentual de indivíduos voadores, com valores maiores do que 64% (Tabela 2). Em UR de 30%, simulando a condição de verão de clima mediterrânico, registraram-se diferenças entre as isolinhagens americanas (47A, 47B, 43A, 37B e 51C) em comparação com a linhagem *Piracicaba* (Tabela 2), pois elas apresentaram uma porcentagem de indivíduos voadores maior do que 69% enquanto a porcentagem de voadores para a isolinhagem *Piracicaba* foi menor do que 50% (Tabela 2). Para a isolinhagem *Piracicaba*, na UR de 30%, houve 27% a menos de voadores em relação àquela UR de 80% (Tabela 2), com uma variação de 49,5 a 76,7%, respectivamente.

A porcentagem de indivíduos caminhadores da espécie *T. pretiosum* foi afetada pela linhagem bem como pela umidade à qual os insetos foram expostos (iso*ur: $F = 3,1019$, $p = 0,0166$), porém, as diferenças observadas para os indivíduos caminhadores não segue o mesmo padrão observado para as diferenças encontradas nos voadores. De uma maneira geral, a 80% de UR, indivíduos da isolinhagem *Piracicaba* e 43A caminharam menos, diferindo da isolinhagem 47B (Tabela 2, Figura 2). A 30% de UR

¹ iso*ur, refere-se à interação dos dois fatores isolinhagem (iso) e umidade relativa (ur), utilizados na análise estatística fatorial.

não foram verificadas diferenças entre as isolinhagens estudadas (Tabela 2, Figura 2). Quando a porcentagem de indivíduos caminhadores foi comparada entre as diferentes UR, observaram-se diferenças para a isolinhagens 47B e 37B sendo que aproximadamente 10% a menos de indivíduos caminharam na UR de 30% (Tabela 2). As outras isolinhagens apresentaram uma porcentagem de caminhadores semelhante entre as duas condições de umidade relativa.

Os resultados observados para indivíduos não voadores foi semelhante àqueles de voadores (iso*ur: $F=5,2988$, $p= 0,00059$). Na UR de 80% não houve diferenças, enquanto que a 30% as isolinhagens americanas registraram uma menor porcentagem de indivíduos não voadores em comparação à UR de 80% (Tabela 2, Figura 2). Assim, como para a porcentagem de indivíduos voadores, houve diferenças para a isolinhagem *Piracicaba* entre as umidades testadas, sendo registrada uma porcentagem 2,5 vezes maior de não voadores em baixas umidades (Tabela 2).

Tabela 2- Porcentagem de voadores, caminheiros e não voadores de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 em UR de 30 ± 10 e $80 \pm 10\%$, em unidades de teste de voo modelo ESALQ. (Temp. $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase 14h)

Isolinagens	% Voadores $\pm$ EP		% Caminheiros $\pm$ EP		% Não Voadores $\pm$ EP	
	30%	80%	30%	80%	30%	80%
Irvine-47 a	$69,0 \pm 2,6$ aA	$64,6 \pm 4,6$ aA ¹	$15,5 \pm 4,95$ aA	$22,4 \pm 2,51$ acA	$15,8 \pm 3,1$ aA	$12,7 \pm 2,5$ aA
Irvine-43 a	$77,9 \pm 3,9$ aA	$76,4 \pm 4,2$ aA	$13,2 \pm 2,3$ aA	$10,4 \pm 3,0$ bcA	$8,9 \pm 3,3$ aA	$13,2 \pm 1,4$ aA
Irvine-47 b	$73,7 \pm 3,7$ aA	$63,0 \pm 4,8$ aA	$15,5 \pm 1,7$ aA	$24,6 \pm 3,1$ aB	$10,9 \pm 3,5$ aA	$12,4 \pm 1,9$ aA
Irvine-37 b	$79,4 \pm 2,7$ aA	$70,0 \pm 6,5$ aA	$6,9 \pm 1,44$ aA	$18,7 \pm 3,75$ abB	$14,9 \pm 3,3$ aA	$12,7 \pm 3,1$ aA
Irvine-51 c	$74,4 \pm 4,3$ aA	$73,1 \pm 5,2$ aA	$9,5 \pm 2,57$ aA	$14,3 \pm 2,75$ abA	$16,0 \pm 3,4$ aA	$13,8 \pm 3,3$ aA
Piracicaba	$49,5 \pm 5,6$ bA	$76,7 \pm 3,6$ aB	$14,5 \pm 1,51$ aA	$7,9 \pm 2,71$ bA	$38,1 \pm 4,3$ bA	$14,7 \pm 2,2$ aB

¹Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Figura 2- Porcentagem de voadores, caminhadores e não voadores de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 em UR de 30 $\pm$ 10 e 80 $\pm$ 10%, em unidades de teste de voo modelo ESALQ. (Temp. 25 $\pm$ 1°C, fotofase 14h). Colunas seguidas pela mesma letras minúscula dentro das UR de 80 e 30%, e pelas letras maiúsculas entre as UR, não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0.05$)

3.4 Discussão

O desempenho reprodutivo de isolinhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 aparentemente não afetou sua capacidade de voar, visto que insetos provenientes da Califórnia, EUA, e com diferentes performances reprodutivas em laboratório (capítulo 2) demonstraram capacidade de voo semelhante nas duas umidades relativas testadas e entre as isolinhagens. A isolinhagem de *Piracicaba* voou menos em condições de baixa umidade (30%) diferindo das isolinhagens americanas e também da sua performance a 80% de UR. A porcentagem de insetos não voadores foi semelhante, entre as isolinhagens, à de insetos voadores e apenas para a isolinhagem *Piracicaba* foram registradas diferenças a 30% de UR, sendo o valor registrado nessa umidade diferente dos valores obtidos a 80%. Os resultados do número de voadores e não voadores foram bastante próximos para esta isolinhagem que foi desfavorecida por condições de baixa umidade, diferindo das isolinhagens americanas e do seu próprio desempenho na UR de 80%. Possivelmente baixas UR dificultam a distensão das asas de indivíduos da isolinhagem *Piracicaba*, o que não ocorre com as isolinhagens americanas, já adaptadas a baixas UR, pois de acordo com Fournier e Boivin (2000) *T. pretiosum* originário do Canadá apresentou melhor atividade de voo, em relação à *Trichogramma evanescens* Westwood, 1833, introduzido do Egito, por já estar adaptado ao clima daquele país por meio de pressões evolutivas.

Portanto, ficou evidente que a isolinhagem *Piracicaba* tem sua capacidade de voo afetada por baixas umidades. Na literatura, diferentes trabalhos descrevem que fatores climáticos afetam a atividade (locomotora), dispersão e voo de *Trichogramma*, sendo a temperatura o fator mais importante dentre os vários fatores abióticos (FORSSE; SMITH; BOURCHIER, 1992; BOURCHIER; SMITH, 1996; DUTTON; CERUTTI; BIGLER, 1996; FOURNIER; BOIVIN, 2000). Fournier e Boivin (2000) relataram que a atividade de *T. evanescens* é afetada pela combinação de temperatura e radiação solar. Mudanças repentinas de pressão atmosférica, seja aumentando ou diminuindo a pressão, também afetam o voo de *Trichogramma* (FOURNIER et al., 2005). Bouchier e Smith (1996) referiram que há uma correlação inversa entre umidade relativa e probabilidade de parasitismo de *Trichogramma minutum* Riley, 1871. Para as isolinhagens de *T. pretiosum* utilizadas no presente estudo, esta correlação não foi

observada em condições de campo (capítulo 2), e em condições de laboratório, utilizando-se as câmaras de teste de voo isolinhagens de *T. pretiosum* provenientes de clima seco (Califórnia) voaram de forma semelhante em altas e baixas UR.

Quanto ao clima de cada região onde os insetos foram coletados, deve-se considerar que Irvine, EUA, apresenta um clima mais seco com precipitação pluviométrica anual de 352 mm, em média (NOAA, 2014) enquanto em Piracicaba a precipitação pluviométrica anual é de 1272 mm (LEB - ESALQ - USP, 2014). Segundo Fournier e Boivin (2000) diferentes pressões evolutivas podem explicar o fato de diferentes espécies de *Trichogramma* se dispersarem em campo. No caso do presente estudo pode-se relacionar também o fato das isolinhagens americanas apresentarem a mesma capacidade de voo nas duas condições de umidade, com as referidas pressões evolutivas sofridas por essas isolinhagens. As isolinhagens americanas foram coletadas em um local com clima de mediterrâneo, onde o mês mais chuvoso e úmido tem as médias máximas de precipitação pluviométrica e UR de 28 mm e 69%, respectivamente com uma temperatura variável de - 4 a 44°C (NOAA, 2014), enquanto a isolinhagem brasileira foi coletada em um local de clima mais ameno com precipitação pluviométrica e UR no mês mais chuvoso e úmido de 229 e 78%, respectivamente e com temperaturas entre -2,6 e 40°C, ao longo do ano (LEB - ESALQ - USP, 2014).

O caminhar de *T. pretiosum*, foi diferente para algumas isolinhagens; assim, a isolinhagem 43A, classificada como intermediária em relação aos seus atributos reprodutivos (capítulo 2), caminhou menos do que a isolinhagem 47B, classificada como melhor, em condição de UR de 80%. Houve diferenças no caminhar nas UR testadas para as isolinhagens 47B e 37B, sendo que estas isolinhagens caminharam menos em UR mais baixa (30%). Ressalta-se que grande parte da porcentagem de insetos que deixou de caminhar na condição de UR baixa, voou nessa condição de umidade. Dutton e Bigler (1995) consideram que o caminhar é a atividade locomotora mais importante para a procura de ovos por *Trichogramma* após este alcançar, por meio do voo, a planta alvo. O menor valor de caminhar da isolinhagem 43A nas condições de UR altas pode indicar que os resultados de campo obtidos no capítulo 2 podem estar relacionados com uma baixa capacidade de busca por ovos em condições de campo.

O controle de qualidade de parasitoides de ovos é um ponto chave para o sucesso de programas de controle biológico (van LENTEREN, 2003). Por meio dos resultados obtidos na presente pesquisa observa-se que há diferenças na capacidade de voo entre as diferentes isolinhagens e esta diferença pode estar relacionada ao clima ao qual este inseto está habitualmente exposto. Insetos coletados no mesmo local no EUA e com diferentes tipos de DNA mitocondrial e também com diferentes performances de laboratório apresentaram capacidade de voo semelhantes, enquanto a isolinhagem brasileira voou menos em condições de UR de 30%. Assim, embora o teste de voo seja um componente importante no acompanhamento da qualidade de *Trichogramma*, é fundamental que tais testes sejam feitos em termos comparativos, levando-se em conta o local de origem do inseto. A eficiência de *Trichogramma* spp. depende das condições ambientais do local de coleta e onde o parasitoide será liberado pois, condições antagônicas de coleta e liberação podem levar a maus resultados no controle das pragas. Parra et al. (2015) relataram que alguns programas de controle biológico não foram bem sucedidos pois não eram levadas em consideração as exigências microclimáticas das linhagens, que são bem definidas, embora inespecíficas. Por outro lado, não houve correlação entre a capacidade de parasitismo no campo das isolinhagens americanas, coletadas no mesmo local, e sua capacidade de voo; levando-se em conta que essas isolinhagens são geneticamente variáveis e com diferentes desempenhos em laboratório e campo (capítulo 2), pode-se inferir que o teste de voo utilizado no presente trabalho não é suficiente para discriminar a melhor linhagem a ser liberada no campo. As isolinhagens americanas também não foram prejudicadas pela condição de UR de 80%, condição distinta do hábitat natural dessa isolinhagem, que é proveniente de Irvine, CA, um local naturalmente seco com poucas chuvas e baixas UR.

3.5 Conclusão

A partir dos resultados da presente pesquisa conclui-se que para algumas linhagens, as condições ambientais do local onde se pretende liberar *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, se distintas do hábitat natural do parasitoide, podem afetar negativamente o voo deste inseto. Entretanto, o teste de voo não possui acurácia suficiente para selecionar a melhor isolinhagem de *T. pretiosum* entre as geneticamente variáveis e com diferentes performances em campo e laboratório, provenientes de um mesmo hábitat.

REFERÊNCIAS

- BOURCHIER, R.S.L.; SMITH, S.M. Influence of environmental condiditons and parasitoid quality on field performance of *Trichogramma minutum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht v. 80, n. 1996, p. 461–468.
- CERUTTI F.; BIGLER F. Quality assessment of *Trichogramma brassicae* in the laboratory. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 75, p;19-26, 1995.
- CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. **Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma***. New York: Springer. 479p.
- DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE BIOSSISTEMAS; ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (LEB, ESALQ-USP). Disponível em: <www.leb.esalq.usp.br/postocon.html>. Acesso em: 13 out. 2014.
- DUTTON, A.; BIGLER, F. Flight activity assessment of the egg parasitoid trichogramma brassicae (Hym.: Trichogrammatidae) in laboratory and field conditions. **Entomophaga**, Paris, v. 40, n. 2, p. 223–233, 1995.
- DUTTON, A.; CERUTTI, F.; BIGLER, F. Quality and environmental factors affecting *Trichogramma brassicae* efficiency under field conditions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht v. 81, n. 1, p. 71–79, 28 Oct. 1996.
- FLANDERS, S.E. Biological Control of the codling moth. **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v. 20, p.644, 1927.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, Berlim, v. 3, p. 294-299, 1994.
- FORSSE, E.; SMITH, S. M.; BOURCHIER, S. Flight initiation in the egg parasitoid *Trichogramma minutum*: effects of ambient temperature, mates, food, and host eggs. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 62, p. 147-154, 1992.
- FOURNIER, F.; PELLETIER, D.; VIGNEAULT, C.; GOYETTE, B.; BOIVIN, G. Effect of barometric pressure on flight initiation by *Trichogramma pretiosum* and *Trichogramma evanescens* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Environmental Entomology**, Lanhan, v. 34, n. 6, p. 1534–1540, 2005.
- FOURNIER, F.; BOIVIN, G. Comparative Dispersal of *Trichogramma evanescens* and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera : Trichogrammatidae) in Relation to Environmental Conditions. **Environmental Entomology**, Lanhan, v. 29, n. 1, p. 55–63, 2000.

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. 315–391, 2014.

KOTTEK, M.; GRIESER, J.; BECK, C.; RUDOLF, B.; RUBEL, F. World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. **Meteorologische Zeitschrift**, Berlin, v. 15, n. 3, p. 259–263, 1 jun. 2006.

LENTEREN JC, van. Need for quality control of mass produced biological control agents. In:_____. **Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures**. Wallingford: CABI, 2003. 327p.

LENTEREN, J.C. van. Current situation of biological control (including region/country reviews). In:_____. **IOBC Internet Book of Biological Control**. Wageningen: IOBC, 2008. chap. 5, p. 41-51.

LI, C.C. **Population Genetics**. Chicago: University of Chicago Press, 1955. 366p.

NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION'S (NOAA). Disponível em: <www.weather.gov/climate/>. Acesso em: 13 out. 2014.

PARRA, J.R.P. Mass rearing of egg parasitoids for biological control programs. In: CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, A. **Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma***. New York: Springer, 2010. cap. 10, p. 267-292.

PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. ***Trichogramma* e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. 324p.

PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; COELHO JR., A.; GEREMIAS, L.D.; CÔNSOLI, F.L. *Thichogramma* as a tool for IPM in Brazil. In: VISON, B. ***Trichogramma* in augmentative biological control: A worldwide view of the past, present and future**. *in press*. 2015

PREZOTTI, L.; PARRA, J.R.P. VENCOVSKY, R.; DIAS, C.T. dos S.; CRUZ, I.; CHAGAS, M.C.M. Teste de Vôo como Critério de Avaliação da Qualidade de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae): Adaptação de Metodologia. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 411–417, 2002.

R DEVELOPMENT CORE TEAM R. R version 2.15.1. Vienna, 2010. Disponível em: <www.R-project.org>. Acesso em: 15 Jul. 2012

SORATI, M.; NEWMAN, M.; HOFFMANN, A.A. Inbreeding and incompatibility in *Trichogramma nr. brassicae*: evidence and implications for quality control. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 78, n. 1991, p. 283–290, 1996.

THOMSON, L.; HOFFMANN, A. Laboratory fecundity as predictor of field success in *Trichogramma carverae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v. 95, n. 5, p. 912–917, 2002.

WAJNBERG, E.; HASSAN, S.A. **Biological control with egg parasitoids**. Wallingford: CABI, 1994. 286p.

4 COMPATIBILIDADE REPRODUTIVA ENTRE ISOLINHAGENS NORTE-AMERICANAS E BRASILEIRA DE *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 – UMA ABORDAGEM INTEGRATIVA

Resumo

O presente experimento teve por objetivo avaliar a compatibilidade reprodutiva de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 numa abordagem integrativa de dados biológicos, morfométricos de três isolinhagens geneticamente variáveis. Foram utilizadas isolinhagens com diferentes sequências de DNA mitocondrial e diferentes desempenhos reprodutivos em laboratório. As duas isolinhagens foram coletadas em clima mediterrânico em Irvine, CA, EUA e uma tropical de altitude em Piracicaba, SP, Brasil. A compatibilidade reprodutiva foi estudada por meio de cruzamentos com diferentes combinações entre adultos das isolinhagens, sendo analisada a razão sexual e fertilidade de cada combinação; a morfometria foi estudada por meio da medição de 26 caracteres de importância taxonômica; posteriormente, os mesmos foram analisados por uma análise multivariada. Foi observada incompatibilidade parcial entre as isolinhagens brasileiras e americanas, sendo mais pronunciada no cruzamento entre fêmeas da isolinhagem Irvine- 47A e machos da isolinhagem Piracicaba (T2). Nesse cruzamento, aproximadamente 20% a menos de fêmeas foram produzidas em relação à razão sexual dos cruzamentos homogâmicos de ambas as isolinhagens (T1 e T5). Por meio da análise multivariada dos dados morfométricos, verifica-se a formação de três grupos distintos, o que sugere que, morfologicamente, as isolinhagens são diferentes. Por meio dos dados biológicos e morfométricos das isolinhagens americanas e brasileira, geneticamente variáveis, de *T. pretiosum*, pode-se concluir que há, entre elas, uma leve incompatibilidade reprodutiva e diferenças morfológicas mais pronunciadas.

Palavras-chave: Reprodução; Morfometria; Variabilidade genética; Controle biológico

Abstract

The present study aimed to evaluate the reproductive compatibility of *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, through an integrative approach of biological data and morphometry of three isofemale lines genetically variable. We used isofemale lines with different sequences of mitochondrial DNA and different reproductive performance in the laboratory. The isofemale strains were collected in different environments: two from an Mediterranean climate in Irvine, CA, USA and one from high tropical climate in Piracicaba, SP, Brazil. The reproductive incompatibility was studied by different combinations of mating among the adults isofemale lines, and we evaluated sex ratio and fertility of each combination. Morphometry was studied by measuring 26 characters with taxonomic significance, and later, they were analyzed by the multivariate analysis. Partial incompatibility was observed between the Brazilian and American isofemale strains, being more pronounced in the cross between female Irvine - 47A and male from Piracicaba (T2). In this crossing, about 20% less females were produced in relation to sex ratio of homogamic crosses of both isofemale lines (T1 and T5). The multivariate analysis of morphometric data showed three distinct groups, suggesting that morphology

of the isofemale lines are different. The biological and morphometric data from Brazilian and American *T. pretiosum* isofemale lines genetically variables allow to conclude that there is, between them, a slight reproductive incompatibility and more pronounced morphological differences.

Keywords: Reproduction; Morphometry; Genetic variability; Biological control

4.1 Introdução

Parasitoides do gênero *Trichogramma* estão entre os insetos mais utilizados em programas de controle biológico no mundo, o que levou a uma considerável atividade de estudos taxonômicos neste gênero (PINTO et al., 1991). Espécies são agrupamentos de populações naturais inter cruzantes, reprodutivamente isolados de outros grupos com as mesmas características (MAYR, 1977) e que estão em constantes mudanças. As espécies do gênero *Trichogramma* são determinadas, principalmente, por meio dos caracteres da genitália masculina (NAGARKATTI; NAGARAJA, 1971; PINTO et al., 1989). A compatibilidade reprodutiva pode ser utilizada como “ferramenta” para distinção de espécies morfologicamente semelhantes (PINTO et al., 1997). Por exemplo, *Trichogramma minutum* Riley, 1871 e *Trichogramma platneri* Nagarkatti, 1975 são morfologicamente semelhantes, porém incompatíveis reprodutivamente (NAGARKATTI, 1975).

Os fatores ambientais e nutricionais, como o hospedeiro, influenciam a morfologia de parasitoides do gênero *Trichogramma* (MARSTON; ERLER, 1973; GRENIER et al., 2001; JERVIS; COPLAND; HARVEY, 2005). Kazmer e Luck (1995) estudaram o efeito do tamanho de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, na sua performance de campo e não encontraram relação entre as duas variáveis. Aqueles autores argumentaram que diferentes genótipos podem ter maior influência sobre a performance do parasitoide no campo. Várias características comportamentais são influenciadas pela variação genética intraespecífica, e com o conhecimento dessa variabilidade genética será possível: i) uma melhor estimativa da capacidade do agente de controle biológico responder às condições ambientais; ii) uma estimativa adequada do potencial de sobrevivência de parasitoides em campo; iii) iniciarem-se programas de melhoramento e seleção das linhagens, a fim de melhorar a eficácia dos agentes liberados (WAJNBERG, 2010).

É fato conhecido que linhagens de *Trichogramma* apresentam diferentes índices de reprodução, ou seja, taxas de fertilidades diferentes, em laboratório e diferentes performances em condições de campo, considerando como melhor performance os indivíduos que se dispersam mais rapidamente em campo e parasitam mais ovos (CERUTTI; BIGLER, 1995; SORATI; NEWMAN; HOFFMANN, 1996; THOMSON; HOFFMANN, 2002; GUZMÁN-LARRALDE et al., 2013). Segundo Fournier e Boivin (2000), diferentes pressões evolutivas sofridas pelas espécies de *Trichogramma* podem explicar diferenças em aspectos biológicos dessas espécies; os autores relataram as diferentes respostas às condições ambientais de parasitoides nativos de uma região e parasitoides introduzidos nesta mesma região, sendo a performance dos nativos melhor quando o clima é inferior à condição ótima dos parasitoides. De acordo com Pinto et al.

(1991), a incompatibilidade reprodutiva intraespecífica é conhecida no gênero *Trichogramma*, sendo este fato relatado em *Trichogramma deion* Pinto & Oatman, 1986 e no complexo *Trichogramma minutum* formado por *Trichogramma minutum* Riley, 1871 e *Trichogramma platneri* Nagarkatti, 1975.

As análises multivariadas em morfometria são importantes métodos para análise e detecção de diferenças sutis entre populações, sendo esta análise baseada na Análise de Componentes Principais (ACP) (BLACKITH; REYMENT, 1971; REYMENT; BLACKITH; CAMPBELL, 1981; QUERINO; ZUCCHI, 2004). Há poucos relatos deste tipo de estudo integrado à análise da compatibilidade sexual de isolinhagens de *T. pretiosum* com diferentes “tipos” de DNA mitocondrial, originárias de ecossistemas distintos.

Considerando-se a pouca informação da relação reprodutiva, morfológica e da variabilidade genética de parasitoides do gênero *Trichogramma*, o presente experimento tem por objetivo avaliar a compatibilidade reprodutiva, baseando-se em dados biológicos, morfológicos e genéticos, de três isolinhagens geneticamente variáveis de *T. pretiosum*, duas provenientes de Irvine, CA, EUA com clima mediterrâneo (de acordo com Köppen Csa) e uma de Piracicaba, SP, Brasil com clima tropical de altitude (de acordo com Köppen Cwa) (KOTTEK et al., 2006), por meio de uma abordagem integrativa.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Isolinhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 utilizadas

Ovos de *Manduca sexta* (L., 1763) foram coletados em plantas de tomateiro na Estação Costeira Sul da Universidade da Califórnia, em Irvine, CA (lat.: 33 ° 41 'N; long.: 117 ° 43' O) clima mediterrâneo (de acordo com Köppen Csa) (KOTTEK et al., 2006). Uma única fêmea de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 coletada de cada ovo do hospedeiro foi copulada com um macho proveniente do mesmo ovo, e criada individualmente iniciando-se assim uma isolinhagem. As isolinhagens foram mantidas em condições de laboratório, utilizando-se ovos do hospedeiro alternativo, *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879), com 24 h de idade e esterilizados em luz UV. A cada geração uma única fêmea, proveniente das matrizes, foi copulada com seu irmão e utilizada para iniciar a geração seguinte; este protocolo de endogamia foi seguido por nove gerações. Depois das referidas nove gerações, as linhagens de isofêmeas (isolinhagens) resultantes devem ter um coeficiente de endogamia de pelo menos 86% (LI, 1955). Por meio deste protocolo de endogamia se eliminou a maior parte da variação genética das isolinhagens, sobrando menos de 14% da heterozigosidade inicial em cada isolinhagem.

Nas populações de *T. pretiosum* coletadas em campo, três “tipos” mitocondriais diferentes (haplótipos) Ma, Mb e Mc, que diferem da sequência da COI mitocondrial mais comum (Mcom), foram encontrados. Através de protocolos de retrocruzamentos, criaram-se três populações de cada uma das isolinhagens marcadas por DNA nuclear, sendo que cada população diferiu apenas pelo seu marcador mitocondrial. O protocolo para a criação destas populações seguiu o método descrito no item 2.2.2 (capítulo 2). Dos três haplótipos americanos encontrados somente dois (A e B) foram utilizados neste experimento, sendo das isolinhagens utilizadas a 47A e 37B, classificadas como “melhor”- Isolinhagens que possuem maior fertilidade e razão sexual mais alta e “intermediária”- Isolinhagens que apresentam um valor de fertilidade e razão sexual médios, respectivamente. A estas isolinhagens dos EUA foi adicionada uma isolinhagem brasileira, coletada em ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) num milharal na cidade de Piracicaba, SP, Brasil (lat: 22 ° 70 'S, 47 ° longa 63' O) clima tropical de altitude (de acordo com Köppen Cwa) (KOTTEK et al., 2006), que também teve seu DNA da COI amplificado em PCR em tempo real, para identificação do tipo mitocondrial (Tabela 1).

A identificação dos três “tipos” mitocondriais (haplótipos) foi realizada por meio de uma curva de dissociação de alta resolução dos produtos do PCR em tempo real da COI. As reações foram realizadas em um volume total de 20 µL contendo 400 nM de uracila, 200 nM de adenina, guanina e citosina 1 mM MgCl, 1X tampão ThermoPol™ (New England Biolabs), 0,25 µM de iniciadores (primer) sentido “senso” Irvine 311F (5'-TGGAACAGGTACAGGAACAGG- 3 '), 0,25 µM iniciadores (primer) sentido anti-senso HCO (5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (FOLMER et al., 1994), 0,5X Evagreen (Biotium), 1 unidade de Taq polimerase (New England Biolabs) e 1 unidade de uracil-DNA glicosilase (UDG) (Tabela 1). Um indivíduo de *T. pretiosum* foi adicionado a cada tubo de reação. Todas as reações foram realizadas em termocicladores Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research) ou Rotor-Gene Q (Qiagen). A programação das reações foi de 95°C durante 5 minutos, e um ciclo de 95°C durante 15”, 55°C durante 30”, 68°C durante 30”; num total de 35 ciclos. Imediatamente após a amplificação, os produtos do PCR em tempo real foram dissociados por meio de fusão numa “rampa de temperatura” que se iniciou a 72°C e aumentou para 80°C, com uma taxa de

aquecimento de 0,2°C. A primeira etapa foi realizada durante 90s, e cada aumento de 0,2°C subsequente foi realizada durante 10s. As curvas de dissociação resultantes apresentaram padrões distintos para cada um dos tipos mitocondriais A, B, C e *Piracicaba*.

4.2.2 Cruzamentos entre isolinhagens de *T. pretiosum*

O método para avaliar a compatibilidade sexual foi baseado em Pinto et al. (1991). As três isolinhagens foram criadas em condições de laboratório (temperatura 25 ± 2°C; UR 60 ± 10%; fotofase 14h) em ovos de *A. kuehniella* com 24h, inviabilizados em UV e colocados em tubos de vidro (Ø 1,5 x h 7,5 cm). Foram avaliadas nove cruzamentos homogâmicos e heterogâmicos de casais (Tabela 1), com 15 repetições por combinação.

A avaliação da compatibilidade sexual foi avaliada por meio da fertilidade (número de descendentes gerados de cada cruzamento) e na descendência, foi determinada a razão sexual, ou seja, proporção de machos e fêmeas provenientes de cada um dos cruzamentos, segundo a fórmula $rs = \frac{n^{\circ} \text{ de fêmeas}}{n^{\circ} \text{ de fêmeas} + n^{\circ} \text{ machos}}$.

Tabela 1 - Cruzamentos entre as isolinhagens de *T. pretiosum*

Tratamento	♂		♀
T1	Piracicaba	X	Piracicaba
T2	Piracicaba	X	Irvine- 47A
T3	Piracicaba	X	Irvine- 37B
T4	Irvine- 47A	X	Piracicaba
T5	Irvine- 47A	X	Irvine- 47A
T6	Irvine- 47A	X	Irvine-37B
T7	Irvine- 37B	X	Piracicaba
T8	Irvine- 37B	X	Irvine-47A
T9	Irvine- 37B	X	Irvine-37B

47A e 37B isolinhagens americanas; Piracicaba isolinhagem brasileira.

4.2.3 Análise morfométrica

a. Preparação de lâminas de microscopia: Os machos de cada isolinhagem foram colocados em KOH 10% (aproximadamente 30 min), período de tempo

necessário para a clarificação. Em seguida, foram colocados em água destilada e, posteriormente em ácido acético glacial PA (5 a 10 min). Foram colocados na posição ventral sobre a lâmina de microscopia, numa gota do meio de montagem Hoyer's. Foi montado um espécime por lâmina, com as antenas, asas anteriores e posteriores distendidas com auxílio de estiletes (micro-alfinetes) e em seguida, coberto com uma lamínula. Cada lâmina recebeu uma etiqueta com procedência da isolinhagem. As lâminas foram colocadas em estufa a 60°C, durante três dias, para completa secagem do Hoyer's. Após a secagem, foram passadas duas finas camadas de esmalte incolor ao redor da lamínula para lutagem. Foram preparadas 10 lâminas para as isolinhagens 47A e Piracicaba e 15 para a isolinhagem 37B.

b. Morfometria: As estruturas utilizadas para a caracterização morfométrica de *Trichogramma* foram baseadas em Querino e Zucchi (2011) (Figuras 1 e 2).

Figura 1 - Estruturas de *Trichogramma* utilizadas na análise morfométrica, que não fazem parte da genitália, antena do macho (A), escutelo (B) asa anterior (C). Ilustração Ranyse B. Querino

Figura 2 - Estruturas da genitália de machos de *Trichogramma* utilizadas na análise morfométrica, estrutura da cápsula genital, ventral (A) e dorsal (B); edeago (C); medida da cápsula genital, ventral (D) e dorsal (E). Ilustração Ranyse B. Querino

Foram medidos 26 caracteres com auxílio de uma ocular micrométrica acoplada a um microscópio Zeiss Axioskop, com programa de medição Axio vision versão 3, nas seguintes estruturas (QUERINO; ZUCCHI, 2011):

Antena- comprimento do flagelo antenal (CF); maior largura do flagelo antenal (LF); comprimento da maior cerda do flagelo (CSF); comprimento do escapo da antena (CEA); número de cerdas (NC).

Asa- comprimento da maior cerda da franja da asa anterior (CSFAA); largura da asa anterior (LAA); comprimento da asa anterior (CAA).

Escuto e escutelo- comprimento das cerdas anteriores do mesoescuto (CSAM); comprimento das cerdas posteriores do mesoescuto (CSPM); comprimento das cerdas

anteriores do escutelo (CSAE); comprimento das cerdas posteriores do escutelo (CSPE).

Genitália do macho - comprimento do edeago (CE); comprimento dos apódemas na cápsula genital (CA); comprimento da cápsula genital (CCG); largura da cápsula genital (LCG); distância basal da cápsula genital (DB); distância apical da cápsula genital (DA); largura apical da cápsula genital (LA); comprimento da abertura dorsal da cápsula genital (CAD); largura da lâmina dorsal da cápsula genital (LLD); comprimento da lâmina dorsal da cápsula genital (CLD); comprimento da extensão posterior da lâmina dorsal da cápsula genital (CEPLD); distância dos processos ventrais na cápsula genital (DPV); comprimento da carena ventral (CCV).

Perna- comprimento da tíbia posterior (CTP).

4.2.4 Análises de dados

a) Cruzamentos. Modelos lineares generalizados (NELDER; WEDDERBURN, 1972) do tipo quase poisson foram usados para análise dos dados de fertilidade e do tipo quase binomial para os dados de razão sexual. A verificação da qualidade do ajuste foi feita por meio do uso do gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulação (DEMÉTRIO; HINDE, 1997; HINDE; DEMÉTRIO, 1998). Quando houve diferença estatística significativa entre os tratamentos, múltiplas comparações (teste de Tukey, $p < 0,05$) foram realizadas por meio da função glht do pacote multcomp com ajuste dos valores de p. As análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico “R”, versão 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

b) Morfometria Multivariada. A Análise de Componentes Principais (ACP) foi empregada para examinar as variações nos caracteres morfométricos e avaliar os padrões de ordenação das isolinhagens de *T. pretiosum* com diferentes tipos de DNA mitocondriais. Foi verificado o padrão de ordenação e as variáveis que mais contribuíram na separação das isolinhagens e construção de um dendrograma que ordenou as linhagens quanto às diferenças morfométricas, utilizando-se a distância de Manhattan. A ACP foi realizada usando-se o programa SAS (SAS system versão 9.1)

c) Análise de variância dos caracteres morfológicos. A média de tamanho de todos os caracteres morfológicos foram submetidos a uma Análise de Variância (ANOVA) a normalidade e homocedasticidade foram avaliadas por um gráfico de resíduos HNP. Somente os seguintes caracteres morfológicos: *i)* maior largura do flagelo antenal (LF); *ii)* comprimento da maior cerda da franja da asa anterior (CSFAA); *iii)* largura da asa anterior (LAA); *iv)* comprimento da asa anterior (CAA); *v)* comprimento dos apódemas na cápsula genital (CA); *vi)* distância dos processos ventrais na cápsula genital (DPV), das isolinhagens de *T. pretiosum*, apresentaram diferenças significativas, quando avaliadas por meio da ANOVA sendo as médias destes caracteres comparados pelo teste de (Tukey $p < 0,05$). As análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico “R”, versão 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

4.3 Resultados

4.3.1 Cruzamentos das isolinhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879

Os cruzamentos entre os casais das isolinhagens geraram prole com diferentes razões sexuais (proporção de machos e fêmeas) ($F=4,9$; $p < 0,001$) (Tabela 2, Figura 2). A razão sexual dos cruzamentos homogâmicos (machos e fêmeas da mesma isolinhagem), cruzados entre si (T1, T5 e T9) não apresentaram diferenças, sendo os valores de razão sexual superiores a 0,70 (Tabela 2). Níveis de incompatibilidade foram registrados nos cruzamentos heterogâmicos (machos e fêmeas de isolinhagens diferentes). A incompatibilidade parcial mais pronunciada foi no cruzamento entre fêmeas da isolinhagem Irvine 47A e machos da isolinhagem Piracicaba (T2). Nesse cruzamento, aproximadamente menos de 20% de fêmeas foram produzidas na geração F1, em relação à razão sexual dos cruzamentos homogâmicos de ambas as isolinhagens (T1 e T5). Quando o cruzamento heterogâmico foi realizado em sentido inverso, isto é, machos da isolinhagem Irvine 47A e fêmeas da isolinhagem Piracicaba (T4), não se observou tal incompatibilidade parcial, sendo a razão sexual desse cruzamento diferente da combinação T2 e semelhante às homogâmicas dessas mesmas isolinhagens (T1 e T5) (Tabela 2). Na combinação entre machos da isolinhagem Irvine 37B e fêmeas da isolinhagem Piracicaba (T7) também observou-se

certa incompatibilidade, sendo a razão sexual diferente da razão obtida no cruzamento homogâmico da isolinhagem Piracicaba (T1) (Tabela 2). A combinação entre machos Irvine 37B e fêmeas Piracicaba também diferiu do cruzamento em sentido inverso, ou seja, fêmea da isolinhagem Irvine 37B e macho da isolinhagem Piracicaba (T3) (Tabela 2).

Em relação à fertilidade, as fêmeas copuladas com machos da mesma isolinhagem ou de isolinhagens diferentes também apresentaram diferenças quanto à fertilidade (número total de descendentes gerados) ($F=8,34$, $p<0,001$) (Tabela 1). De uma maneira geral, dois grupos foram formados, sendo a maior fertilidade registrada para cruzamentos heterogâmicos, entre machos das isolinhagens americanas 47A e 37B, com fêmeas da isolinhagem Piracicaba, T4 e T7. A fertilidade nesses cruzamentos diferiu daquela obtida para as isolinhagens das combinações T2, T3, T5, T6 e T9 (Tabela 2). A fertilidade mais baixa foi registrada para a combinação T3 (machos da isolinhagem Piracicaba e fêmeas da isolinhagem Irvine 37B). A média de adultos gerados, nesse cruzamento, foi de aproximadamente 18 indivíduos, diferindo das combinações T4 e T7 e também das T1 e T8 (Tabela 2).

Tabela 2- Razão sexual e fertilidade de casais de três isolinhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 provenientes de Piracicaba, SP, Brasil e de Irvine, CA, EUA.

Cruzamentos	♂		♀	Razão sexual ¹ ± EP ²	Fertilidade ¹ ± EP ²
T1	Piracicaba	X	Piracicaba	0,75 ± 0,03 ab	26,80 ± 1,28 ab
T2	Piracicaba	X	Irvine 47A	0,57 ± 0,03 c	22,27 ± 1,21 bcd
T3	Piracicaba	X	Irvine 37B	0,79 ± 0,03 a	18,05 ± 1,29 d
T4	Irvine 47A	X	Piracicaba	0,70 ± 0,03 ab	29,67 ± 0,69 a
T5	Irvine 47A	X	Irvine 47A	0,71 ± 0,03 ab	21,06 ± 1,67 bcd
T6	Irvine 47A	X	Irvine 37B	0,64 ± 0,03 abc	19,00 ± 1,95 cd
T7	Irvine 37B	X	Piracicaba	0,62 ± 0,03 bc	29,67 ± 1,52 a
T8	Irvine 37B	X	Irvine 47A	0,62 ± 0,03 bc	25,43 ± 2,33 ac
T9	Irvine 37B	X	Irvine 37B	0,75 ± 0,04 ab	19,64 ± 1,76 bcd

¹Médias seguidas pelas mesma letra não diferem-se pelo teste de Tukey ($p<0,05$); ²Erro padrão da média

Figura 2- Cruzamentos e respectivas razões sexuais. Homogâmico (setas verdes); heterogâmicos (setas bicolores); macho (porção azul da seta); fêmea (porção rosa)

4.3.2 Morfometria multivariada

Verifica-se claramente a formação de três grupos entre as isolinhagens de *T. pretiosum* (Figura 3). É possível observar consistência nos dados, pois em dois eixos 96,67% da variação é explicada, sendo esses dois eixos suficientes para construção do gráfico dos escores no espaço (Figura 3). Entre as isolinhagens, há uma grande diferença e em nenhum dos quadrantes há sobreposição das isolinhagens. Os espécimes da isolinhagem Irvine 37B ocuparam uma posição intermediária entre as isolinhagens Piracicaba e Irvine 47A (Figura 3).

Dos 26 caracteres analisados, 13 apresentaram o maior coeficiente absoluto dos autovetores, sendo eles flagelo antenal (CF), maior largura do flagelo antenal (LF), comprimento da maior largura do flagelo (CSF), comprimento das cerdas anteriores do mesoescuto (CSAM), comprimento das cerdas posteriores do mesoescuto (CSPM), comprimento das cerdas anteriores do escutelo (CSAE), comprimento das cerdas posteriores do escutelo (CSPE), comprimento da carena ventral (CCV), comprimento da

capsula genital (CCG), distancia apical da capsula genital (DA), largura da lâmina dorsal da capsula genital (LLD), comprimento da tibia posterior (CTP), comprimento do escapo da antena (CEA); isso significa que estas variáveis foram as que mais contribuíram para explicar o primeiro fator (componente).

Tabela 3- Autovetores da análise de componentes principais para os 26 caracteres morfométricos das isolinhagens de *T. pretiosum* medidos

Variável	Fator 1*	Fator**
CF- comprimento do flagelo antenal	0,040578	0,002089
LF- maior largura do flagelo antenal	0,040578	0,002089
CSF- comprimento da maior cerda do flagelo	0,040578	0,002089
CSFAA- comprimento da maior cerda da franja da asa anterior	0,040609	0,001194
CSAM- comprimento das cerdas anteriores do mesoescuto	0,040757	0,000636
CSPM- comprimento das cerdas posteriores do mesoescuto	0,040757	0,000636
CSAE- comprimento das cerdas anteriores do escutelo	0,040757	0,000636
CSPE- comprimento das cerdas posteriores do escutelo	0,04068	0,0005
CE- comprimento do edeago	0,040757	0,000636
CA- comprimento dos apódemas na cápsula genital	0,03749	0,017087
CCV- comprimento da carena ventral	0,040759	0,000545
CCG- comprimento da cápsula genital	0,040757	0,000636
LCG- largura da cápsula genital	0,030192	0,001431
DB- distância basal da cápsula genital	0,040699	0,000973
DA- distância apical da cápsula genital	0,040757	0,000636
LA- largura apical da cápsula genital	0,039035	0,003277
CAD- comprimento da abertura dorsal da cápsula genital	0,036533	0,000056
LLD- largura da lâmina dorsal da cápsula genital	0,040757	0,000636
CLD- comprimento da lâmina dorsal da cápsula genital	0,040757	0,000636
CEPLD- comprimento da extensão posterior da lâmina dorsal da cápsula genital	0,034537	0,004961
NC- número de cerdas	0,016128	0,951038
DVP- distância dos processos ventrais na cápsula genital	0,032997	0,002473
CTP- comprimento da tibia posterior	0,040757	0,000636
CEA- comprimento do escapo da antena	0,040578	0,002089
LAA- largura da asa anterior	0,040609	0,001194
CAA- comprimento da asa anterior	0,040609	0,001194

* Fator 1- Explica 94,24% da variação; ** Fator 2- Explica 2,43% da variação.

Para o segundo componente, as variáveis número de cerdas na antena (NC), comprimento dos apódemas na capsula genital (CA) e largura apical da capsula genital

(LA), foram as que apresentaram os maiores coeficientes absolutos dos autovetores com valores de 0,951038; 0,017087 e 0,003277, respectivamente (Tabela 3).

Os valores das distâncias de Manhatttan, calculados a partir dos componentes dos caracteres morfológicos das três isolinhagens, foram utilizados nas análises de agrupamento (*cluster* UPGMA). De acordo com essa análise, os indivíduos das isolinhagens Irvine (47A e 37B), provenientes do mesmo local, agrupam-se em um mesmo clado numa distância de aproximadamente 60%, ficando mais distantes da isolinhagem de Piracicaba (Figura 4).

Figura 3- Projeção dos escores dos espécimes de *Trichogramma pretiosum* no espaço dos dois primeiros componentes principais Fator 1 e Fator 2 = dois eixos (dimensões) Pira.= isolinhagem Piracicaba; 47A e 37B = isolinhagens Irvine (americana)

Figura 4- Dendrograma dos caracteres morfológicos dos espécim das isolinhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 coletados em Piracicaba, SP e em Irvine, CA (47A e 37B)

A Análise de Variância (ANOVA) dos seguintes caracteres morfológicos: maior largura do flagelo antenal (LF); comprimento da maior cerda da franja da asa anterior (CSFAA); largura da asa anterior (LAA); comprimento da asa anterior (CAA); comprimento dos apódemas na cápsula genital (CA); distância dos processos ventrais na cápsula genital (DPV), das isolinhagens de *T. pretiosum*, apresentaram diferenças significativas, quando avaliados por meio da ANOVA (Tabela 3).

Os caracteres da asa apresentaram diferenças entre as isolinhagens americanas quando comparadas com a isolinhagem brasileira. A exceção, quanto às diferenças entre as isolinhagens americanas e brasileira foi a maior largura do flagelo antenal (LF) que diferiu entre as isolinhagens 47A e 37B; entretanto, a média para esse caráter na isolinhagem brasileira foi semelhante à das duas americanas (Tabela 4). Nos caracteres

da genitália de *T. pretiosum*, houve diferenças significativas entre a isolinhagem Irvine 47A e Piracicaba, no comprimento dos apódemas (CA). Entretanto, na isolinhagem Irvine 37B, esse carácter foi semelhante ao das outras isolinhagens. Outra diferença ocorreu na distância dos processos ventrais (DVP), sendo as distâncias das isolinhagens americanas (47A e 37B) menores do que as da isolinhagem brasileira (Tabela 3).

Tabela 4 - Médias de tamanho (μm) de caracteres morfológicos isolinhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879

Isolinhagens	LF ¹ $\pm$ EP ²	CSFAA ¹ $\pm$ EP ²	LAA ¹ $\pm$ EP ²	CAA ¹ $\pm$ EP ²	CA ¹ $\pm$ EP ²	DVP ¹ $\pm$ EP ²
Irvine 47A	34,86 $\pm$ 0,96 a	40,83 $\pm$ 1,19 a	240,15 $\pm$ 3,08 ab	475,57 $\pm$ 6,15 a	65,30 $\pm$ 2,07 a	3,72 $\pm$ 0,29 a
Irvine 37B	30,30 $\pm$ 0,79 b	38,43 $\pm$ 1,14 ab	246,84 $\pm$ 4,94 a	474,73 $\pm$ 7,98 a	60,73 $\pm$ 1,59 ab	3,61 $\pm$ 0,25 a
Piracicaba	32,37 $\pm$ 0,88 ab	34,96 $\pm$ 2,12 b	220,31 $\pm$ 3,82 b	422,61 $\pm$ 6,11 b	59,75 $\pm$ 0,59 b	5,71 $\pm$ 0,55 b
	F= 6,8; p=0,003	F= 3,6; p=0,039	F= 3,5; p= 0,04	F= 5,0; p=0,01	F= 3,6; p=0,049	F= 9,9; p< 0,01

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); ²Erro padrão da média. 47A e 37B isolinhagens americanas, Piracicaba isolinhagem brasileira. LF (maior largura do flagelo antenal), CSFAA (comprimento da maior cerda da franja da asa anterior) LAA (largura da asa anterior), CAA (comprimento da asa anterior), CA (comprimento dos apódemas na cápsula genital) e DPV (distância dos processos ventrais na cápsula genita).

4.4 Discussão

Os cruzamentos homogâmicos de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, não apresentaram diferenças estatísticas nas razões sexuais, porém nos cruzamentos heterogâmicos houve diferenças para esse parâmetro, o que sugere certo grau de incompatibilidade reprodutiva entre as linhagens. A incompatibilidade reprodutiva já é conhecida para *T. pretiosum*, *Trichogramma deion* Pinto & Oatman, 1986 e entre *Trichogramma minutum* Riley, 1871 e *Trichogramma platneri* Nagarkatti, 1975, representada por alterações na razão sexual, porém, analisadas de diferentes formas (PINTO et. al., 1991; STOUTHAMER et al., 1996; STOUTHAMER et al., 2000).

Os dois cruzamentos heterogâmicos entre as isolinhagens americanas 47A e 37B (T6 e T8) apresentaram valores de razão sexual semelhantes aos dos cruzamentos homogâmicos dessas isolinhagens (T5 e T9). No entanto, a incompatibilidade observada não segue a mesma tendência na direção dos cruzamentos. Assim, menor razão sexual foi registrada quando se cruzaram machos da isolinhagem Piracicaba com fêmeas da isolinhagem Irvine 47A (T2). No outro cruzamento heterogâmico, entre machos da isolinhagem Piracicaba e fêmeas da isolinhagem Irvine 37B (T3), a razão sexual foi maior (aproximadamente mais de 20% de fêmeas), diferindo de T2. A incompatibilidade registrada na presente pesquisa é considerada “leve”, pois quando se aplica a fórmula para aferição de incompatibilidade proposta por Pinto et al. (1991), não se alcança o valor mínimo sugerido; por outro lado, o autor não utilizou nenhuma análise estatística para comparar as razões sexuais, como a que foi realizado nesta pesquisa, e que mostrou diferenças significativas para este parâmetro.

Não há padrão entre os dados de fertilidade e os cruzamentos homogâmicos ou heterogâmicos testados. Assim, a incompatibilidade sexual observada não influenciou a fertilidade (número de descendentes) de *T. pretiosum*. Deve-se considerar que as isolinhagens efetivamente apresentam fertilidades diferentes (capítulo 2), sendo este parâmetro biológico inerente a tais isolinhagens. Outro fator a se considerar é que as espécies de *Trichogramma* são haplodiploides, sendo que não há necessidade de cópula para que a fêmeas ovipositem (SORATI; NEWMAN; HOFFMANN, 1996; PREZOTTI et al., 2004). Sendo assim, mesmo com incompatibilidade, o potencial reprodutivo da fêmea é mantido, pois a fêmea de *T.*

pretiosum não fertilizada oviposita normalmente, porém, gera apenas machos (partenogênese arrenótoca).

A incompatibilidade pode estar relacionada à morte dos imaturos, como observado em *T. deion*, em que a inseminação do ovo pelo espermatozoide ocorre e a fertilização também, mas os imaturos que originariam fêmeas morrem (STOUTHAMER et al., 2000). No presente experimento, não há como chegar à mesma conclusão, pelo fato da fertilidade ter sido semelhante nos cruzamentos testados, sem uma relação direta entre fertilidade e razão sexual. Pode-se supor que tal evento não ocorreu nos diferentes cruzamentos de *T. pretiosum*, pois foi gerado um mesmo número de indivíduos nos cruzamentos, que registraram diferentes razões sexuais. Para que a incompatibilidade de *T. pretiosum* seja devido à morte de imaturos, deveriam ocorrer cruzamentos com maior proporção de machos e menor fertilidade em razão da morte de imaturos, que gerariam fêmeas. A incompatibilidade sexual isoladamente não deve ser o único caráter para a separação de espécies, e quando ocorre a incompatibilidade nas espécies morfológicamente semelhantes, o termo a ser adotado para discriminar cada uma deve ser “*forma*” (PINTO et al., 1991). “*Forma*” é um termo neutro apropriado para casos de estudos incompletos para a determinação de nível de espécies (MAYR, 1969).

Quanto à análise morfométrica, os três grupos formados por meio da análise dos componentes principais (ACP) de *T. pretiosum* estão em consonância com os dados obtidos nos cruzamentos. A isolinhagem Piracicaba ficou separada e as duas isolinhagens americanas agruparam-se. Esse resultado era esperado, uma vez que as duas foram coletadas na mesma localidade (Irvine, CA, EUA), na mesma área de cultivo e no mesmo hospedeiro (tomateiro).

A Análise de Variância (ANOVA) efetuada para as estruturas morfológicas: LF- maior largura do flagelo antenal; CSFAA- comprimento da maior cerda da franja da asa anterior; LAA- largura da asa anterior; CAA- comprimento da asa anterior; CA- comprimento da apódemas na cápsula genital e DVP- distância dos processos ventrais na cápsula genital, demonstra a mesma constância dos resultados obtidos para a incompatibilidade sexual e ACP; ou seja, as isolinhagens americanas diferem da brasileira. Este resultado é mais pronunciado para a CAA e DV; para as demais estruturas não há diferenças estatísticas para pelo menos uma das isolinhagens americanas, que assemelham-se à brasileira. Uma exceção ocorre para o caráter LF, pois para esta estrutura a isolinhagem americana (37B) é igual à isolinhagem

Piracicaba. As características da genitália são mais confiáveis para a identificação taxonômica de *Trichogramma*, pois apresentam menor variação intraespecífica (NAGARKATTI; NAGARAJA, 1971). Assim, com base na ANOVA, para as medidas do comprimento dos apódemas (CA) e da distância dos processos ventrais (DVP), fica evidente o distanciamento entre as isolinhagens americanas e a brasileira.

Ao se analisarem os dados biológicos (cruzamentos) em conjunto com a análise morfométrica, observa-se a incompatibilidade entre as isolinhagens brasileira e americanas, sendo as diferenças morfométricas mais pronunciadas do que as diferenças biológicas (incompatibilidade reprodutiva). Essa incompatibilidade pode apontar que no futuro as isolinhagens poderão sofrer um processo de especiação por cladogênese (a divisão de uma linhagem em duas ou mais espécies, que comumente ocorre quando populações ficam separadas por isolamento geográfico ou de barreiras físicas) (BROW; LOMOLINO, 1998). A variabilidade genética que leva a essa especiação, é um fenômeno natural que ocorre por meio de mutações que geram novos polimorfismos (alelos) e novos genótipos (combinações alélicas) que surgem por recombinação genética da reprodução sexuada. Junto a está variabilidade está o fato que elementos ambientais e nutricionais, como o hospedeiro, influenciam o fenótipo dos parasitoides do gênero *Trichogramma* (MARSTON; ERLER 1973; GRENIER et al., 2001; JERVIS; COPLAND; HARVEY 2005).

Mais estudos principalmente de filogenia e genética de populações são necessários para essa conclusão e também mais tempo é necessário para se avaliar se a incompatibilidade aumentará; sendo a afirmativa, de evolução da espécie, aqui apresentada apenas uma inferência, com base nos consistentes resultados biológicos e morfométricos obtidos.

4.5 Conclusão

Por meio dos dados biológicos e morfométricos das isolinhagens americanas e brasileira, geneticamente variáveis, de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, pode-se concluir que há, entre elas, uma leve incompatibilidade reprodutiva e diferenças morfológicas mais pronunciadas.

REFERÊNCIAS

BLACKITH, R.E.; REYMENT, R.A. **Multivariate Morphometrics**. London: Academic Press, 1971. 412p.

BROWN, J.H.; LOMOLINO, M.V. **Biogeography**. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates 1998. 692p.

CERUTTI F.; BIGLER F. Quality assessment of *Trichogramma brassicae* in the laboratory. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 75, 19-26, 1995.

DEMÉTRIO, C.G.B.; HINDE, J. Half-normal plots and overdispersion. **Glim Newsletter**, Oxford, v. 27, p. 19-26, 1997.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, Berlim, v. 3, p. 294-299, 1994.

FOURNIER, F.; BOIVIN, G. Comparative Dispersal of *Trichogramma evanescens* and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera : Trichogrammatidae) in Relation to Environmental Conditions. **Environmental Entomology**, Lahan, v. 29, n. 1, p. 55–63, 2000.

GRENIER, S.; GRILLE, G.; BASSO, C.; PINTUREAU, B. Effects of the host species and the number of parasitoids per host on the size of some *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.11, p. 21-26, 2001.

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**, Berlim, v. 138, p. 315–391, 2014.

HINDE, J.; DEMÉTRIO, C.G.B. Overdispersion: models and estimation. **Computational Statistics & Data Analysis**, Amsterdã, v. 27, p. 151-170, 1998.

KAZMER. D.J.; LUCK, R.F. Field-tests of the size-fitness hypothesis in the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum*. **Ecology**, Tempe, v. 76, p. 412-425, 1995.

KOTTEK, M.; GRIESER, J.; BECK, C.; RUDOLF, B.; RUBEL, F. World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. **Meteorologische Zeitschrift**, Berlim, v. 15, n. 3, p. 259–263, 1 jun. 2006.

LI, C.C. **Population Genetics**. Chicago: University of Chicago Press, 1955. 366p.

MARSTON, N.; ERLER, L.R.. Host influence on the bionomics of *Trichogramma minutum*. **Annals of Entomological Society of America**, Lanhan, v. 66, p. 1155-1162, 1973.

MAYR, E. **Populações, espécies e evolução**. São Paulo: Nacional, 1977. 485p.

MAYR, E. **Principles of systematic zoology**. New York: McGraw-Hill, 1969. 434p.

NAGARKATTI, S.; NAGARAJA, H. Redescriptions of some Knowns species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) showing the importance of the male genitalia as a diagnostic character. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham, v. 61, p. 13-31, 1971.

NAGARKATTI, S. Two new species of *Trichogramma* from the USA. **Entomophaga**, Paris, v. 20, p. 245-248, 1975.

NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society. Series A (General)**, London v. 135, p. 370-384, 1972.

PINTO, J.D.; VELTEN, R.K.; PLATNER, G.R.; OATMAN, E.R. Phenotypic plasticity and taxonomic character in *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Annals of Entomological Society of America**, Lanhan, v. 82, p. 414-425, 1989.

PINTO, J.D.; STOUTHAMER, R.; PLATNER, G.R.; OATMAN, E.R. Variation in Reproductive Compatibility in *Trichogramma* and Its Taxonomic Significance (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 84, n.1, p. 37-46, 1991.

PINTO, J.D.; STOUTHAMER, R.; PLATNER, G.R. A new cryptic species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) from the Mojave Desert of California as determined by morphological, reproductive and molecular data. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, Washington, v. 99, p. 238-247, 1997.

PREZOTTI, L.; PARRA, J.R.P.; VENCOVSKY, R.; COELHO, A.S.G.; CRUZ, I. Effect of the size of the founder population on the quality of sexual populations of *Trichogramma pretiosum*, in laboratory. **Biological Control**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 174-180, 2004.

QUERINO, R.B.; ZUCCHI, R.A. Análise Morfométrica em Espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 5, p. 583-588, 2004.

QUERINO, R.B.; ZUCCHI, R.A. **Guia de Identificação de Trichogramma Para o Brasil**. Brasília: Embrapa, 2011. 103p.

R DEVELOPMENT CORE TEAM R. R version 2.15.1. Vienna, 2010. Disponível em: <www.R-project.org>. Acesso em: 15 Jul. 2012.

REYMENT, R.A.; BLACKITH, R.E.; CAMPBELL, N.A. **Multivariate morphometrics**. New York: Academic Press, 1981. 233p.

RICHARD STOUTHAMER, PETRA JOCHEMSEN, GARY R. PLATNER, AND JOHN D. PINTO. Crossing Incompatibility Between *Trichogramma minutum* and *T. platneri* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): Implications for Application in Biological Control. **Environmental Entomology**, Lanhan, v. 29, n. 4, p. 832-837, 2000.

SAS INSTUTUTE. **SAS system**: SAS/STAT version 9.1. Cary, 2003.

SORATI, M.; NEWMAN, M.; HOFFMANN, A.A. Inbreeding and incompatibility in *Trichogramma nr. brassicae*: evidence and implications for quality control. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 78, n. 1991, p. 283–290, 1996.

SORATI, M.; NEWMAN, M.; HOFFMANN, A.A. Inbreeding and incompatibility in *Trichogramma nr. brassicae*: evidence and implications for quality control. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 78, n. 1991, p. 283–290, 1996.

STOUTHAMER, R.; LUCK, R.F.; PINTO, J.D.; PLATNER, G.R.; STEPHENS, B. Non-reciprocal cross-incompatibility in *Trichogramma deion*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 80, p. 481-489, 1996.

JERVIS, M.A.; COPLAND, M.J.W.; HARVEY, J.A. The Life Cycle. In: JERVIS, M.A. **Insect as Natural Enemies: A Practical Perspective**. Dordrecht: Springer, 2005. cap. 2, p. 73-165.

THOMSON, L.J.; HOFFMANN, A.A. Laboratory fecundity as predictor of field success in *Trichogramma carverae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v. 95, n. 5, p. 912-917, 2002.

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

5 ESTABELECIMENTO DE *Trichogramma pretiosum* RILEY, 1879, IMPORTADO DA COLÔMBIA, EM UM NOVO AGROECOSSISTEMA BRASILEIRO.

Resumo

Poucos estudos foram realizados para aferir se uma linhagem (população) liberada em um programa de Controle Biológico Aplicado de fato se estabelece na área de liberação. Considerando-se este fato, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar, por meio da análise da citocromo c oxidase subunidade 1 (COI) do DNA mitocondrial, o possível estabelecimento de uma linhagem de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, proveniente de Palmira, VAC, Colômbia, utilizada em um programa de Controle Biológico Aplicado realizado há mais de duas décadas em Petrolina, PE, Brasil. Esta linhagem foi comparada com linhagens de *T. pretiosum* de diferentes regiões do Brasil. Uma reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para amplificar um fragmento do gene mitocondrial (mtDNA) citocromo c oxidase subunidade 1 (COI) das diferentes linhagens avaliadas, sendo este fragmento de DNA posteriormente, sequenciado. Na análise das sequências das 10 linhagens, observaram-se três haplótipos mitocondriais, sendo que a linhagem proveniente de Petrolina, "PE" possui um haplótipo diferente em relação às demais linhagens brasileiras. Por outro lado, o haplótipo da linhagem "PE" foi idêntico a um haplótipo colombiano. A partir dos resultados sugere-se que uma linhagem de *T. pretiosum*, introduzida em Petrolina, PE no perímetro irrigado há 22 anos, trazida de Palmira, VAC, Colômbia, se estabeleceu naquela região.

Palavras-chave: Controle Biológico Aplicado; Marcador mitocondrial; Análise de risco; Controle de *Tuta absoluta*

Abstract

Few studies have been carried out to assess if a strain (population) released in an Applied Biological Control program is actually established in the release area. Therefore, the present study aimed to evaluate, through the analysis of cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) from mitochondrial DNA, the possible establishment of one *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 line, from Palmira, VAC, Colombia, used in an Applied Biological Control program performed more than two decades ago, in Petrolina, PE, Brazil. This line was compared to *T. pretiosum* lines from different regions of Brazil. A polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify a fragment of mitochondrial gene (mtDNA) cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) from the different tested lines and this DNA fragment was subsequently sequenced. In the analysis of sequences of 10 strains, there were three mitochondrial haplotypes, and the line from Petrolina, "PE" has a different haplotype compared to other Brazilian strains. On the other hand, the haplotype of "PE" line was identical to one Colombian haplotype. The results suggest that a line of *T. pretiosum*, introduced in Petrolina, PE in the irrigation perimeter 22 years ago, brought from Palmira, VAC, Colombia, established in that region.

Keywords: Applied biological control; Mitochondrial marker; Risk analysis; *Tuta absoluta* control

5.1 Introdução

A introdução de inimigos naturais exóticos à fauna do local de liberação, se realizado sem estudos prévios pode constituir um risco ao meio ambiente, por diversas razões, como competição/extinção de inimigos naturais nativos, ocupação de nichos e habitats não desejáveis e parasitismo de espécies não alvo (WAJNBERG; SCOTT; QUIMBY, 2001; BIGLER; BABENDREIER; KUHLMANN, 2006, COCK et al., 2010). Em casos de programas de controle biológico aplicado o esperado é que o inimigo natural não se estabeleça no local de liberação, sendo que supostamente fatores abióticos contribuem para o não estabelecimento (BOIVIN et al., 2006). O estabelecimento no agroecossistema de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 para o controle de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) é dificultado, uma vez que os insetos que se desenvolvem no ovo desta praga são menores e menos competitivos, sendo que a ação do parasitoide neste caso deve ser semelhante a de inseticidas (VASCONCELOS, 2012). Por outro lado, pelo fato do Brasil se um país tropical sem condições climáticas extremas e com uma biodiversidade rica, o estabelecimento de insetos usados em programas de controle biológico aplicado não é difícil de acontecer. Um exemplo disso é o caso do controle biológico da broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1862 que é controlada pelo parasitoide larval *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 importado de Trinidad & Tobago, em programas de que fazem uso de liberações massais em vastas extensões (PARRA et al., 2010). Dados não publicados mostram que em amostragens realizadas atualmente em canaviais na região de Ribeirão Preto, SP o parasitoide exótico *C. flavipes* é encontrado espontaneamente em número superior aos dípteros parasitoides nativos *Lydella minense* (Townsend, 1927) e *Billaea claripalpis* (Wulp, 1896), este último predominante na região, anteriormente à introdução de *C. flavipes*.

Para se minimizar os riscos da introdução de um inimigo natural exótico é conveniente que se utilizem insetos da própria fauna, ou que se introduzam espécies já existentes no local. Este é o caso de um eficiente programa de controle biológico aplicado executado na região do Submédio São Francisco. Este programa de controle biológico teve como praga alvo a traça-do-tomateiro, *T. absoluta*, que foi controlada por *T. pretiosum*, importado da Colômbia (HAJI et al., 2002). Deve-se considerar que *T. pretiosum* é um parasitoide com ampla ocorrência no Brasil, sendo relatado em diversos estados brasileiros (QUERINO; ZUCCHI, 2011). O referido

programa foi realizado numa parceria entre a Embrapa Semi-Árido com o apoio de empresas particulares e instituições publicas; durante o período de um (1) ano os parasitoides eram importados diretamente da Colômbia para a liberação; até que um polo de criação massal do parasitoide fosse criado na região de Petrolina-PE (HAJI et al., 2002). Os parasitoides importados utilizados neste programa foram coletados, especificamente, na cidade de Palmira, Departamento (equivalente a um estado) do Valle do Cauca na Colômbia (VELASQUEZ- informação pessoal¹).

Segundo Stouthamer (2006) técnicas moleculares como uso de marcadores moleculares do tipo microssatélite, ITS, RAPD, ISSR e COI podem ser utilizadas para identificação das espécies ou até mesmo linhagens de parasitoides para programas de controle biológico. Na literatura entomológica atual é relatado que linhagens geneticamente diferentes demonstraram diferenças no desempenho reprodutivo e/ou comportamental (CERUTTI; BIGLER, 1995; SORATI; NEWMAN; HOFFMANN, 1996;. THOMSON; HOFFMANN, 2002; WAJNBERG, 2010; GUZMÁN-LARRALDE et al., 2013). No entanto, poucos estudos foram realizados para aferir se uma linhagem (população) liberada em um programa de controle biológico aplicado de fato se estabeleceu na área de liberação.

Considerando-se o pouco conhecimento em relação ao estabelecimento de linhagens de *T. pretiosum* exóticas, em novos agroecossistemas, liberadas de forma inundativa, devido à sua utilização como agente de controle biológico aplicado, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar, por meio da análise da citocromo c oxidase subunidade 1 (COI) do DNA mitocondrial, o possível estabelecimento de uma linhagem de *T. pretiosum* proveniente de Palmira, VAC, Colômbia utilizada em um programa de controle biológico aplicado há duas décadas em Petrolina, PE, Brasil, comparando-a com linhagens de *T. pretiosum* de diferentes regiões do Brasil.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Linhagens avaliadas

As linhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 utilizadas no estudo foram coletadas em diferentes regiões do Brasil, em diferentes épocas e culturas,

¹Jades Jimenez ; Productos Biologicos Perkins Ltda; Palmira, Valle, Colômbia.

sendo destas linhagens algumas coletadas com cartelas “armadilhas”, com ovos inviabilizados do hospedeiro alternativo *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) e outras coletadas diretamente em ovos dos hospedeiros naturais. Todas as informações sobre as linhagens constam na Tabela 1 e a distribuição geográfica pode ser observada na Figura 1. As linhagens “RV” e “MT” foram obtidas diretamente de criações mantidas na Embrapa Soja (Londrina, PR) e Universidade Federal do Paraná (UFPR), respectivamente. A linhagem colombiana, “NAR”, faz parte de um trabalho de levantamento populacional de *Trichogramma* realizado pelo “United States Department of Agriculture” (USDA). Os espécimes foram coletados na cidade de Sandoná, Narinõ, Colômbia mantidos em etanol. As demais linhagens fazem parte do “banco de linhagens” do Laboratório de Biologia de Insetos- ESALQ/USP e foram obtidas por meio de pesquisadores de diferentes instituições de ensino e pesquisa de seis estados do Brasil (Tabela 1).

Tabela 1- Sigla das linhagens, data e local de coleta, hospedeiro utilizado para coleta, cultura, coletor e presença ou ausência do endossimbionte *Wolbachia*

¹Linhagem mantida no Laboratório de Biologia de Insetos-Esalq/USP; ² e ³ Linhagens enviadas mortas e conservadas em etanol,

Sigla das linhagens	Data	Local	Hospedeiro	Cultura	Coletor	<i>Wolbachia</i>
SC-1 ¹	mar/04	Itajaí-SC	<i>Tuta absoluta</i>	Tomateiro	Coelho Jr, A. ⁱ	Sim
SC-2 ¹	out/00	Jaguaruna-SC	<i>Erinnyis ello</i>	Mandioca	Schmitt, A.T. ⁱⁱ	Sim
RS ¹	abr/08	Pelotas, RS	<i>Anagasta kuehniella</i>	Pereira	Nava, D.E. ⁱⁱⁱ	Não
PR ¹	mar/08	Colombo, PR	<i>Pseudaletia sequax</i>	Trigo	Foerster, L.A. ^{iv}	Não
SP ¹	mar/13	Piracicaba, SP	<i>Anagasta kuehniella</i>	Milho	Coelho Jr, A. ^v	Não
ES ¹	ago/10 ⁵	Alegre, ES	<i>Anagasta kuehniella</i>	Tomateiro	Pratissoli, D. ^{vi}	Não
RV ²	nov/05	Rio Verde, GO	<i>Chrysodeixis includens</i>	Soja	Bueno, R. ^{vi}	Não
MT ³	nov/12	Tangará da Serra, MT	<i>Heliothis virescens</i>	Soja	Paixão, M.F. ^{vii}	Não
PE ¹	jul/08	Petrolina, PE	<i>Dacus</i> sp.	Flor-de-Seda	Paranhos, B.A.J. ^{viii}	Não
NAR ⁴	jan/07	Sandoná, NAR, CO	-	-	Gates, M. ^{ix}	Não

respectivamente, do Laboratório de Entomologia da Embrapa Soja (Londrina, PR) e do Laboratório de Controle Integrado de Insetos da Universidade Federal do Paraná (UFPR); ⁴ Linhagem coletada em Sondona, Nariño, Colômbia e morta e conservada em etano; ⁵ data em que a linhagem começou a ser criada na Esalq/USP. ⁱAloisio Coelho Jr, na época da coleta estagiário na Epagri-EEI; ⁱⁱDrª Áurea Tereza Schmitt Epagri-EEI, ⁱⁱⁱDr Dori Edson Nava Embrapa Clima Temperado, ^{iv}Prof Luiz Amilton Foerster UFPR; ^vAloisio Coelho Jr Doutorando Esalq/USP; ^{vi}Prof. Driceu Pratissoli Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ^{vii}Profª Regiane Bueno Unesp- Botucatu na época da coleta doutoranda Esalq/USP; ^{viii}Magda Fernanda Paixão doutoranda UFPR; ^{ix}Drª Beatriz A. J. Paranhos Embrapa Semi-Árido; ^xMichael Gates USDA.

Figura 1- Distribuição geográfica das linhagens de *T. pretiosum* utilizadas no experimento. A- Itajaí-SC; B- Jaguaruna-SC; C- Pelotas-RS; D- Colombo-PR; E-Piracicaba-SP; F- Alegre-ES; G- Rio Verde-GO; H- Tangará da Serra-MT; I- Petrolina-PE; J- Sandoná, Nariño, Colombia

5.2.2 Amplificação e sequenciamento da CO1

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para amplificar um fragmento do gene mitocondrial (mtDNA) citocromo c oxidase subunidade 1 (COI), comumente utilizado para identificar diferenças em espécies ou populações por meio de sequências de DNA (HEBERT et al., 2003). A PCR foi realizada num volume final de 25 μ L: contendo 2 μ L de DNA genômico (concentração não determinado), 1 X Tampão de PCR ThermoPol (New England BioLabs, Ipswich, MA, EUA), 1mMMgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 4% (v/v) de BSA (NEB), 1 Unidade de Taq polimerase (NEB) e 0,2 μ M de um dos iniciadores (“primers”) LCO1490 e HCO2198 (FOLMER et al., 1994). As reações foram realizadas dois termocicladores, um Mastercycler® ep gradient S (Eppendorf North America, Inc., Nova Iorque, NY, EUA) e um MultiGene™ OptiMax Thermal Cycler (Labnet International Inc., Edison, NJ, EUA); com seguinte programação: 2 min. a 94°C, para a desnaturação inicial do DNA; seguido de cinco ciclos de 30 segundos a 94°C, 1,5 min. a 45°C e 1 min. a 72°C; seguido de mais 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1,5 min. a 51°C e 1 min. a 72°C; finalizado com 5 min. a 72°C para extensão. A amplificação foi confirmada por um gel de eletroforese dos produtos da PCR. A purificação do DNA amplificado foi realizada por meio de um kit de purificação Wizard® PCR Preps DNA (Promega, Madison, WI, EUA).

Um total de 10 espécimes foram sequenciados para as linhagens “SP”, “MT” e “RV”, das linhagens “ES” e “PR” foram sequenciados cinco, e das linhagens “RS” e “PE” por se tratarem de linhagens de isofêmeas apenas um (1) espécime foi sequenciado, bem como apenas um (1) foi sequenciado das linhagens “SC-1” e “SC-2” por serem linhagens infectadas pelo endossimbionte *Wolbachia*. O sequenciamento do DNA de todas as linhagens, exceto “MT” e “RV” foi realizado em ambas as direções (senso e anti-senso) no núcleo de instrumentação do Instituto de Genômica da Universidade de Califórnia-UCR. O sequenciamento das linhagens “MT” e “RV” foi realizado no Laboratório Multiusuários Centralizado da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-ESALQ. Os sequenciamentos foram realizados pelo método de Sanger, Nicklen, e Coulson (1977). Todas as sequências foram alinhadas e cortadas manualmente utilizando-se o programa BioEdit 7.0.5.3 (HALL, 1999).

5.3 Resultados

Entre as linhagens em que a COI foi sequenciada para mais de um espécime (“ES”, “PR”, “SP”, “MT” e “RV”) não foi verificada variabilidade, ou seja, todos os exemplares da mesma linhagem apresentaram a mesma sequência de COI. Por este motivo apenas uma sequência de cada linhagem foi utilizada para representar todos os espécimes sequenciados (Tabela 2).

Não foi observada uma grande diversidade de haplótipos entre as linhagens coletadas em diferentes culturas, hospedeiros e períodos. As diferenças encontradas para a COI estão nas duas linhagens infectadas por *Wolbachia* “SC-1” e “SC-2” que diferem de todas as outras em sítios na posição de pares de base 127, 418, 572; no par de base 628, estes haplótipos se assemelham às linhagens “PE” e “NAR” e diferem dos demais. A isolinhagem proveniente de Petrolina “PE” difere das demais linhagens brasileiras em dois sítios da COI, 343 e 628, sendo semelhante à linhagem colombiana “NAR” que também difere das demais linhagens brasileiras nestes dois sítios (Tabela 2).

Tabela 2- Linhagens (haplótipos) e seus respectivos sítios variáveis. Números colocados na horizontal no cabeçalho da tabela correspondem à posição em pares de base dos sítios polimórficos dentro do fragmento do gene COI

Sigla das linhagens	Posição no fragmento de COI				
	127	343	418	572	628
SC-1	A	T	C	C	T
SC-2	A	T	C	C	T
RS ¹	T	T	T	T	C
PR ¹	T	T	T	T	C
SP ¹	T	T	T	T	C
ES ¹	T	T	T	T	C
RV ²	T	T	T	T	C
MT ³	T	T	T	T	C
PE ¹	T	C	T	T	T
NAR ⁴	T	C	T	T	T

¹ Linhagem mantida no Laboratório de Biologia de Insetos-Esalq/USP; ² e ³ Linhagens enviadas mortas e conservadas em etanol, respectivamente, do Laboratório de Entomologia da Embrapa Soja (Londrina, PR) e do Laboratório de Controle Integrado de Insetos da Universidade Federal do Paraná (UFPR); ⁴ Linhagem coletada em Sondona, Nariño, Colômbia e morta e conservada em etano

5.4 Discussão

Apenas três haplótipos mitocondriais foram encontrados entre as nove linhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 analisadas, sendo que um dos haplótipos pertence às linhagens infectadas pelo endossimbionte *Wolbachia*, que leva à incompatibilidade reprodutiva, partenogênese ou feminização. Ao se comparar número de haplótipos encontrados neste trabalho, com outras pesquisas que avaliam a diversidade genética de indivíduos coletados em ambiente natural e prontamente analisados, sem passar por uma etapa de criação de laboratório, este número de haplótipos é baixo (RUGMAN-JONES et al., 2012). Os locais de coleta das linhagens são distantes entre si, bem como as coletas foram realizadas em diferentes culturas e em diferentes épocas, o que reforça a suposição de diversidade de haplótipos; porém, deve-se considerar que as linhagens foram mantidas em criações de laboratório, em ovos dos hospedeiros alternativos *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) ou *Sitotroga cerealella* Olivier, 1789, por diferentes períodos, que variou de um (1) ano para linhagem “SP” até 14 anos para a linhagem SC-2. O fato dos insetos terem sido criados em laboratório, e em ovos de hospedeiros alternativos, pode ter sido um fator importante para a possível perda de variabilidade de COI das populações, uma vez que somente os haplótipos de indivíduos que adaptam-se às condições de laboratório se mantêm na população. Além disso, esta afirmação pode estar ligada ao fato de que todas as linhagens foram coletadas em ambientes agrícolas, pois nestes agroecossistemas a pouca variabilidade genética, aparenta não ser uma exceção, considerando-se a quantidade de insetos partenogenéticos encontrados nestes ambientes quando comparados a ecossistemas naturais (HOFFMANN et al., 2008). Programas de controle biológico, bem sucedidos que utilizaram insetos com reprodução partenogenética telítica também são relatados em áreas agrícolas (LAING; HERATY, 1981; van LENTEREN et al., 1997).

A sequência da COI da linhagem “PE”, proveniente de Petrolina, PE é diferente da sequência da COI das demais linhagens, provenientes de outras regiões do Brasil; por outro lado, é semelhante à sequência da COI de uma linhagem colombiana, coletada na cidade de Sondoná no Departamento de Nariño (Tabela 1). Esta semelhança dos haplótipos configura um forte indício de que a linhagem importada do Valle do Cauca (VELASQUEZ- informação pessoal),

Departamento próximo a Nariño, se estabeleceu em Petrolina há 20 anos quando foi liberada massalmente em um programa para controle biológico da traça-do-tomateiro (HAJI et al., 2002). Deve-se considerar que Sandoná, Nariño e Palmira, Valle do Cauca, são cidades situadas a oeste das cordilheiras (IGAC, 2015) e assim, como o ocorrido com as linhagens brasileiras, este deve ser o haplótipo mais comumente encontrado em criações de laboratório na Colômbia, e provavelmente estão geograficamente isoladas das brasileiras, considerando-se as cordilheiras do continente sul-americano.

Está hipótese de estabelecimento se torna mais forte ao se considerar que a linhagem “PE” linhagem foi coletada em ovos de *Dacus* sp. em flor-de-seda [*Calotropis procera* (Aiton, 1811)] uma planta naturalizada comumente encontrada no semi-árido brasileiro (KOCH et al., 2015) e não em plantas de tomateiro, cultura onde *T. pretiosum* foi liberado há 20 anos atrás. Em contrapartida, as condições climáticas do local de origem da linhagem colombiana (Palmira, VAC, Colômbia) são distintas de Petrolina, PE, onde foram liberadas. Desta forma, o esperado era que a linhagem não se estabelecesse no nordeste do Brasil (BOIVIN et al., 2006). Palmira possui um clima tropical com estação seca- AW de acordo com a escala de Köppen (KOTTEK et al., 2006), com uma altitude de 1009 metros, temperatura anual média máxima de 29,6°C e média mínima de 18,4°C e precipitação pluviométrica anual de 908 mm (IDEAM, 2015). Petrolina possui um clima semi-árido quente- BSH de acordo com a escala de Köppen, está localizada a 325 metros acima do nível do mar com temperatura anual média máxima de 32,5°C e média mínima de 21,4°C, com precipitação pluviométrica anual de 577,4 mm (INMET, 2015). Porém, como descrito nos capítulos 2, desta tese, isolinhagens de *T. pretiosum* introduzidas do sul da Califórnia, EUA, apresentaram elevada taxa de parasitismo em condições de campo no sudeste do Brasil, sendo a condição climática de ambas regiões também distintas. Fournier e Boivin (2000) também descrevem que *Trichogramma evanescens* Westwood, 1833 introduzido do Egito no Canadá apresentou um parasitismo satisfatório em campo.

O haplótipo colombiano, encontrado na linhagem “PE”, possivelmente está presente somente na região do Vale do São Francisco, na Bahia e Pernambuco, próximo de onde foi liberado há 20 anos, por se tratar de um cinturão irrigado no meio de uma região de semiárido (CODEVASF, 1999). O bioma, clima, vegetação e solo daquela região são bem distintos do restante do Brasil (IBGE, 2015). Levando-

se em consideração os dados climáticos, de vegetação e biomas, pode-se aplicar neste caso o princípio de ecorregiões descrito por Cock et al. (2006). Segundo os referidos autores ecorregiões fornecem informações úteis para a introdução de inimigos naturais sem riscos de o agente migrar para regiões não alvo, como possivelmente é o caso da linhagem colombiana liberada em Petrolina nos anos 90.

A presente pesquisa mostra por meio do sequenciamento da subunidade 1 da citocromo c oxidase (COI), fortes evidências do estabelecimento de uma linhagem colombiana em Petrolina, PE, introduzidas naquele local durante um programa de controle biológico; realizado há 20 anos. Para um maior conhecimento da dinâmica de *T. pretiosum* “colombiano” naquela região mais estudos são necessários, principalmente avaliando-se a COI de linhagens coletadas em regiões próximas ao Submédio São Francisco. A diversidade genética de linhagens de *T. pretiosum* brasileiras também precisam ser melhor estudadas, coletando-se indivíduos em hospedeiros naturais e prontamente analisadas quanto a sua sequência da COI, sem passar por longos períodos em condições de criação de laboratório, para maior robustez dos dados encontrados nesta pesquisa. Desta forma, possivelmente uma maior diversidade de haplótipos poderá ser encontrado nas linhagens brasileiras.

Assim, pode-se dizer que existem fortes indícios que uma linhagem de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, introduzida em Petrolina, PE no perímetro irrigado há 22 anos, trazida de Palmira, VAC, Colômbia, se estabeleceu naquela região.

REFERÊNCIAS

- BOIVIN, G.; KÖLLIKER-OTT, U. M.; BALE, J. S.; BIGLER, F. Assessing the establishment potential of inundative biological control agents. In: BIGLER, F.; BABENDREIER, D.; KUHLMANN, U. **Environmental Impact of Invertebrates for Biological Control of Arthropods: Methods and Risk Assessment**. Wallingford: CABI, 2006. cap. 6, p. 98-113.
- CERUTTI, F.; BIGLER, F. Quality assessment of *Trichogramma brassicae* in the laboratory. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 75, 19-26, 1995.
- COCK, M.J.W.; LENTEREN, J.C. van; BRODEUR, J.; BARRATT, B.I. P.; BIGLER, F.; BOLCKMANS, K.; CÔNSOLI, F.L.; HAAS, F.; MASON, P.G.; PARRA, J.R.P. Do new Access and Benefit Sharing procedures under the Convention on Biological Diversity threaten the future of biological control?. **BioControl**, Dordrecht, v. 55, p. 199-218, 2010.
- COMPANHIA DE DESENVOLVIMENTO DOS VALES DO SÃO FRANCISCO E DO PARNAÍBA (CODEVASF), **O modelo de irrigação CODEVASF**, Brasília, 1999. 26p.
- F BIGLER, F.; BABENDREIER, D.; KUHLMANN, U. **Environmental Impact of Invertebrates for Biological Control of Arthropods: Methods and Risk Assessment**. Wallingford: CABI, 2006. 299p.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, Berlim, v. 3, p. 294-299, 1994.
- FOURNIER, F.; BOIVIN, G. Comparative Dispersal of *Trichogramma evanescens* and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera : Trichogrammatidae) in Relation to Environmental Conditions. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 29, n. 1, p. 55–63, 2000.
- 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**, Berlim, v. 138, p. 315–391, 2014.
- HAJI, F.N.P.; PREZOTTI, L.; CARNEIRO, J.S.; ALENCAR, J.A. *Trichogramma pretiosum* para o controle de pragas no tomateiro industrial. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. **Controle biológico no Brasil- parasitóides e predadores**. Barueri: Manole, 2002. cap. 28, p. 477-494.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 95–98, 1999.

HEBERT, P.D.N.; CYMINSKA, A.; BALL, S.L.; WAARD, J.R.de. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London- Series B**, London, v. 270, 313-321, 2003.

HOFFMANN, A.A.; REYNOLDS, K.T.; NASH, M.A.; WEEKS, A.R. A high incidence of parthenogenesis in agricultural pests. **Proceedings of the Royal Society of London - Series B**, London, v. 275, n. 1650, p. 2473-2481, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <mapas.ibge.gov.br>. Acesso em: 14 fev. 2015.

INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES DE COLOMBIA (IDEAM). Disponível em: <institucional.ideam.gov.co>. Acesso em: 10 fev. 2015.

INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI (IGAC), Disponível em: <www.igac.gov.co/igac>. Acesso em: 10 fev. 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). Disponível em: <www.inmet.gov.br>. Acesso em: 8 fev. 2015.

KOCH, I.; RAPINI, A.; SIMÕES, A.O.; KINOSHITA, L.S.; SPINA, A.P.; CASTELLO, A.C.D. **Apocynaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB80340>>. Acesso em: 20 Abr. 2015.

KOTTEK, M.; GRIESER, J.; BECK, C.; RUDOLF, B.; RUBEL, F. World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. **Meteorologische Zeitschrift**, Berlim, v 15, n. 3, p. 259–263, 1 jun. 2006.

LAING, J.E.; HERATY, J.M. Establishment in Canada of the parasite *apanteles pedias* Nixon on the spotted tentiform leafminer, *Phyllonorycter blancardella* (Fabr.) (Lepidoptera, Gracillariidae). **Environmental Entomology**, Lanhan, v. 10, n. 6, p. 933-935, 1981.

LENTEREN, J.C. van; DROST, Y.C.; VAN ROERMUND, H.J.W.; POSTHUMA-DOODEMAN, C.J.A.M. Aphelinid parasitoids as sustainable biological control agents in greenhouses. **Journal of Applied Entomology**, Berlim, v. 121, n. 9-10, p. 473-485, 1997.

RUGMAN-JONES, P.F.; HODDLE, M.S.; AMRICH, R.; HERATY, J.M.; STOUTHAMER-INGEL, C.E.; STOUTHAMER, R. Phylogeographic structure, outbreeding depression, and reluctant virgin oviposition in the bean thrips, *Caliothrips fasciatus* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), in California. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham, v. 102, p. 698-709, 2012.

PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; PINTO, A.S. Bioecological control of pests as key component for sustainable sugarcane production,. In: CORTEZ, L.A.B. **Sugarcane bioethanol R&D for productivity and sustainability**. São Paulo: Blucher, 2010. cap. 11, p. 441-450.

QUERINO, R.B.; ZUCCHI, R.A. **Guia de Identificação de Trichogramma Para o Brasil**. Brasília: Embrapa, 2011. 103p.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SORATI, M.; NEWMAN, M.; HOFFMANN, A.A. Inbreeding and incompatibility in *Trichogramma brassicae*: Evidence and implications for quality control **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 78, n. 3, p. 283-290, 1996.

STOUTHAMER, R. Molecular Methods for the identification of Biological Control Agents at the species and strains level. In: BIGLER, F.; BABENDREIER, D.; KUHLMANN, U. **Environmental Impact of Invertebrates for Biological Control of Arthropods: Methods and Risk Assessment**, Wallingford: CABI, 2006. cap. 11, p. 187-201

THOMSON, L.J.; HOFFMANN, A.A. Laboratory fecundity as predictor of field success in *Trichogramma carverae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v. 95, n. 5, p. 912-917, 2002.

Vasconcelos, G. dos R. **Seleção de linhagens e efeito do hospedeiro na qualidade de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomateiro**. 2012. 77p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

WAJNBERG, E.; SCOTT, J.K.; QUIMBY, P.C. **Evaluating Indirect Ecological Effects of Biological**. Wallingford: CABI, 2001. 288p.

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