CRIAÇÃO “IN VITRO” DO ECTOPARASITÓIDE LARVAL
***Bracon hebetor* SAY, 1857 (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)**

SANDRA REGINA MAGRO

Engenheira Agrônoma

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

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências, Área de
Concentração: Entomologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Outubro - 2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Magro, Sandra Regina

Criação "*in vitro*" do ectoparasitóide larval *Bracon hebetor* SAY, 1857
(Hymenoptera : braconidae) / Sandra Regina Magro. - - Piracicaba : 2000.
78 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Controle biológico 2. Cultivo "*in vitro*" 3. Dieta artificial 4. Ectoparasito 5.
Inseto-nocivo 6. Relação hospedeiro-parasito I. Título

CDD 595.798

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

“Se a história das ciências ensina aos pesquisadores de hoje, igualmente cria uma ligação entre eles e todos aqueles que, no passado, se deram a tarefa de recuar as fronteiras do desconhecido. As lições do passado, as pesquisas do presente e um olhar para o futuro participam juntos do avanço para desvendar e compreender o mundo em que vivemos.”

Eng^a agrônoma Veridiana Victória Rosseti

A todos aqueles que fizeram ciência e a todos aqueles que ainda a farão

Dedico

À minha família, em especial à “dona” Nilce e “seo” Raphael, meus pais, presença constante em minha vida. Sinal de força, estímulo e incentivo. Não mediram esforços para que chegasse até aqui. Eles me ensinaram viver

Ofereço

À mulher forte, corajosa e lutadora – minha mãe. Que me ensinou que a conquista é feita de pequenas lutas diárias e que é preciso acreditar e ser forte para continuar sempre!

A minha homenagem

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José R. P. Parra, professor titular do Departamento de Entomologia Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, pela orientação, por ter me proporcionado esta grande experiência de estudo e pesquisa e também pelo exemplo de dedicação e profissionalismo;

À Dra. Beatriz S. Corrêa-Ferreira, pelo apoio e incentivo à minha carreira científica;

Ao Professor Dr. Sinval Silveira Neto e à Dra. Marinéia L. Hadadd, pelo apoio nas análises estatísticas; e a todos os professores do Departamento, pelos ensinamentos proporcionados;

Ao Dr. Paulo S. M. Botelho, da UFSCar, pelo fornecimento de parte do material biológico para a manutenção dos experimentos;

Ao Dr. Fernando L. Cônsoli, pelos ensinamentos e pelas discussões que tanto me ajudaram na resolução de problemas e à Sílvia M. Gomes e Dr. Simon A. Grenier, do INRA-INSA, França, pelo apoio no desenvolvimento desta pesquisa;

Ao Prof. Dr. Márcio C. Silva-Filho e sua equipe, Veridiana Santos, Juliana Dantas e Patrícia Pompermayer, pelo auxílio na quantificação de proteínas e análise de eletroforese;

Ao Prof. Lino Neto, da UFV, pelas discussões e apoio científico;

Ao meu companheiro Luciano, presença forte e motivadora. Meu carinho e agradecimento por tantos momentos de ajuda e compreensão;

Aos amigos Érica Crespo e Lúcio, Ranyse Querino, Erica Frazão e Paulo, Rogério Brunherotto e Cia, Rodrigo Almeida, Eduardo Sgarbieiro, Reymar Coutinho e tantos outros que dividiram comigo as dificuldades, os anseios e as diversões no decorrer desses anos de curso;

À Jane Eyre Gabriel e Raquel Caon Fin, pela amizade e solidariedade;

Ao Prof Evôneo e “dona” Aida, amigos de coração e afinidade. Meu respeito e admiração;

A todos os amigos e colaboradores do Laboratório de Biologia dos Insetos: Neide, Peter, Negri, Crébio, Maurício, Dori, Rosa, Diogo, Susana, Ana Lia, Adriana, Eduardo e Patrícia pela presença amiga e cooperação para a construção desse trabalho;

Aos amigos que permaneceram em Londrina, especialmente ao Júnior, Jaime e Inês, que tanto me motivaram e não me deixaram desanimar diante das dificuldades; e à Lucia, Clarice, Wilsimar, Cláudia, Viviane, Joacir e Jovenil;

Aos meus irmãos Sônia, Berenice, Mauro, Solange, Ezylda, Edson e Adriana, pela presença, sustento, motivação, tolerância, cumplicidade e por me terem dado condições, juntamente com meus pais, de ter chegado até aqui. Meu mais sincero obrigado. E aos meus sobrinhos e afilhados, por toda a alegria e entusiasmo;

Aos funcionários do Departamento, especialmente Ana Gabriela, João Forti e Regina Moraes, e às bibliotecárias Kátia Ferraz, Eliana Garcia, Silvia Zinsly e Ângela Mota pela colaboração;

A todos os colegas do laboratório de Biologia dos Insetos e do setor de Entomologia da ESALQ/USP, pelo convívio e amizade;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos durante a realização do Curso de Pós-Graduação;

A Deus, pelo caminho e pela oportunidade!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO.....	xii
SUMMARY	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISAO DE LITERATURA	3
2.1. Hospedeiros de <i>Bracon hebetor</i> Say, 1857 e viabilidade de sua utilização para controle de pragas	3
2.2. Biologia e Parasitismo de <i>B. hebetor</i>	5
2.3. Criação de parasitóides “ <i>in vitro</i> ”	6
2.4. Necessidades nutricionais dos insetos e composição básica de dietas artificiais.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Manutenção da população de parasitóide	15
3.2 Criação dos lepidópteros destinados aos estudos biológicos.	17
3.3 Determinação do ínstar em que ocorre maior paralisação e parasitismo por <i>B. hebetor</i> , dentre as espécies <i>A. gemmatalis</i> , <i>D.</i> <i>saccharalis</i> , <i>H. virescens</i> e <i>S. frugiperda</i>	17

3.4 Seleção do hospedeiro para o desenvolvimento do ectoparasitóide <i>B. hebetor</i>	18
3.5 Capacidade de paralisação e de parasitismo por <i>B. hebetor</i> sobre o hospedeiro padrão, <i>A. kuehniella</i> , quando criado sobre diferentes hospedeiros (teste de agressividade)	19
3.6 Preparo das dietas artificiais para criação de <i>B. hebetor</i>	21
3.7 Avaliação das dietas artificiais para a criação de <i>B. hebetor</i>	23
3.7.1 Capacidade de paralisação e parasitismo por <i>B. hebetor</i> , criado nas diferentes dietas e sobre o hospedeiro natural <i>A. kuehniella</i> (teste de agressividade).....	25
3.7.2 Qualidade dos insetos produzidos “ <i>in vivo</i> ” e “ <i>in vitro</i> ” (teste de longevidade e de fecundidade)	25
3.8 Avaliação da morfologia externa da glândula salivar de <i>B. hebetor</i> e estudo de seu conteúdo protéico	26
3.8.1 Extração das glândulas salivares de larvas de <i>B. hebetor</i> quando criadas sobre o hospedeiro natural e sobre dieta artificial.....	26
3.8.2 Estudo da morfologia externa das glândulas salivares de larvas de <i>B. hebetor</i>	27
3.8.3 Quantificação de proteína.....	27
3.8.4 Análise das proteínas através de eletroforese.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Determinação do instar em que ocorre maior paralisação e parasitismo por <i>Bracon hebetor</i> Say, 1857 (Hym.; Braconidae), dentre as espécies <i>Anticarsia gemmatilis</i> Hübner, 1818 (Lep.; Noctuidae); <i>Diatraea saccharalis</i> (Fabricius, 1794) (Lep.; Crambidae); <i>Heliothis virescens</i> (Fabricius, 1781) (Lep.; Noctuidae) e <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797) (Lep.; Noctuidae).	28

4.2 Seleção do hospedeiro para o desenvolvimento do ectoparasitóide <i>B. hebetor</i>	32
4.2.1 Capacidade de paralisação e de parasitismo por <i>B. hebetor</i> sobre o hospedeiro padrão, <i>A. kuehniella</i> , quando criado sobre diferentes hospedeiros (teste de agressividade)	37
4.3 Avaliação das dietas artificiais para a criação de <i>B. hebetor</i>	44
4.3.1 Capacidade de paralisação e parasitismo por <i>Bracon hebetor</i> criado nas diferentes dietas e sobre o hospedeiro natural <i>A. kuehniella</i> (teste de agressividade).....	53
4.3.2 Qualidade dos insetos produzidos “ <i>in vivo</i> ” e “ <i>in vitro</i> ” (teste de longevidade e fecundidade).....	57
5. CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE TABELAS

Tabela nº	Página
1. Composição (%) das dietas artificiais utilizadas para a criação “ <i>in vitro</i> ” de <i>Bracon hebetor</i> .	22
2. Capacidade de paralisação e parasitismo de <i>Bracon hebetor</i> sobre diferentes ínstares larvais das espécies: <i>A. gemmatalis</i> , <i>D. saccharalis</i> , <i>H. virescens</i> e <i>S. frugiperda</i> . Temperatura: 25°±2°C; Umidade relativa: 60%± 10% e fotofase de 14 horas..	31
3. Porcentagem média de parasitismo de <i>Bracon hebetor</i> sobre quatro espécies de lepidópteros. Temperatura: 25° ± 2° C; Umidade relativa: 60%± 10% e 14 horas de fotofase.....	32
4. Duração de fases imaturas e ciclo total (ovo - adulto) de <i>Bracon hebetor</i> criado sobre sete espécies de lepidópteros. Temperatura: 25° ± 2° C; Umidade relativa: 60%± 10% e fotofase de 14 horas.....	35
5. Viabilidade de fases imaturas e ciclo total (ovo - adulto) de <i>Bracon hebetor</i> criado sobre sete lepidópteros. Temperatura: 25° ± 2° C; Umidade relativa: 60%± 10% e fotofase de 14 horas.....	36
6. Duração de fases e total (ovo-adulto) de <i>Bracon hebetor</i> criado sobre sete dietas artificiais e sobre <i>A. kuehniella</i> . Temperatura: 25° ± 2° C; Umidade relativa: 60%± 10% e 14 horas de fotofase.....	46
7. Viabilidade de fases e do ciclo total (ovo-adulto) de <i>Bracon hebetor</i> criado sobre sete dietas artificiais e sobre <i>A. kuehniella</i> como	

hospedeiro natural. Temperatura: $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{ C}$; Umidade relativa: $60\% \pm 10\%$ e 14 horas de fotofase.....	47
8. Capacidade de paralisação e de parasitismo, durante 72 horas, de <i>Bracon hebetor</i> criado sobre sete dietas artificiais e hospedeiro natural (<i>A. kuehniella</i>). Temperatura: $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{ C}$, Umidade relativa: $60 \pm 10\%$ e de 14 horas de fotofase.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura nº	Página
1. Frascos para individualização dos casais de <i>Bracon hebetor</i> para parasitismo (A) e placas de Petri para acondicionamento das lagartas parasitadas (B).....	16
2. Seqüência de preparo do sistema para criação “ <i>in vitro</i> ” de <i>Bracon hebetor</i> . A, B e C - distensão do parafilme formando uma fina película; D - parafilme acondicionado sobre placa de petri plástica (2,0 x 1,0 cm); colocação da dieta sobre o filme (E); sobreposição da dieta com outro parafilme igualmente distendido (F); G e H acondicionamento do sistema de criação em placa de petri plástica (6,0 x 2,0 cm)..	24
3 Correlação entre paralisação e parasitismo de <i>Bracon hebetor</i> sobre quatro espécies de lepidópteros: <i>A. gemmatalis</i> , <i>S. frugiperda</i> , <i>H. virescens</i> e <i>D. saccharalis</i> . Temperatura: $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$; Umidade relativa: $60\% \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.....	29
4. Relação entre paralisação (%) e parasitismo (%) de <i>Bracon hebetor</i> criado em cinco lepidópteros sobre o hospedeiro <i>A. kuehniella</i> . Temperatura: $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$; Umidade relativa: $60\% \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. Colunas de mesma cor, seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade	38
5. Fenograma UPGMA por Distância Euclidiana Média (A) e distribuição tridimensional dos hospedeiros pela análise de componentes principais (B) para avaliação do efeito do hospedeiro no desenvolvimento (duração e viabilidade das fases, formação de casulo e deformação de	

- pupas e/ou adultos) de *Bracon hebetor*. Hospedeiros: 1 *A. kuehniella*; 2 *A. gemmatalis*; 3 *D. saccharalis*; 4 *C. cephalonica*; 5 *S. frugiperda*; 6 *S. cerealella*; 7 *H. virescens*. (CCC=0,944 e C=0,333 para o gráfico A) 42
6. Fenograma UPGMA por Distância Euclidiana Média (A) e distribuição tridimensional dos hospedeiros pela análise de componentes principais (B) para avaliação do efeito do hospedeiro no desenvolvimento e no parasitismo de *Bracon hebetor*. Hospedeiros: 1 *A. kuehniella*; 3 *D. saccharalis*; 4 *C. cephalonica*; 6 *S. cerealella*; 7 *H. virescens*.. (CCC=0,903 e C=1,0 para o gráfico A)..... 43
7. Médias de pupas de *Bracon hebetor*, que não formaram casulo quando criadas em diferentes dietas artificiais e sobre *A. kuehniella* (hospedeiro). Letras iguais nas colunas indicam que não houve diferença significativa, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste Tukey. Médias transformadas em $\arcsen \sqrt{(x + \alpha)} / 100$ 49
8. Desenvolvimento de *Bracon hebetor* sobre o hospedeiro natural *A. kuehniella*. Detalhe em A- ovos de *B. hebetor*; B- formação de casulo (larvas com 96-100 horas); C- casulo e mecônio; D- adultos (aumento 10X).. 50
9. Desenvolvimento de *Bracon hebetor* sobre o Dieta artificial. Detalhe em A- ovos sobre a dieta; B- larvas em início da formação do casulo (144-148 horas); C- pupas sem casulo (aumento 21X) (m-mecônio) e D- adultos (aumento 11X)..... 51
10. Glândula salivar de *Bracon hebetor* (dc- ducto comum; b- bifurcação e rg- região secretora). Aumento 46X..... 54
11. Valores médios de longevidade para adultos de *Bracon hebetor* criados sobre *A. kuehniella* (hospedeiro) e sete dietas artificiais. Temperatura: $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, Umidade relativa: $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14

- horas. (Colunas de mesma cor, seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 1% de probabilidade). 58
12. Ritmo de postura de *Bracon hebetor* quando criado sobre *A. kuehniella* (hospedeiro) e em sete dietas artificiais. Temperatura: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, Umidade relativa: $60\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas 59
13. Viabilidade média do ciclo total da progênie (F1) dos insetos criados sobre as sete dietas artificiais, comparado aos criados sobre o hospedeiro natural. Temperatura: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, Umidade relativa: $60\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. (Colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade). 61
14. Influência da idade das fêmeas de *Bracon hebetor* criadas em *A. kuehniella* (hospedeiro) e duas dietas artificiais (1 e 7), na razão sexual (valores médios) da primeira geração. Temperatura: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, Umidade relativa: $60\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. 62
15. Fenograma obtido da análise de agrupamento para sete dietas e hospedeiro natural testados para *Bracon hebetor*. Fenograma UPGMA por Distância Euclidiana Média. Grau de correlação fenética (CCC): 0,847; Grau de Encademento (C): 0,667; $P(35\%) = 0,577$. (números de 1 a 7 correspondem às dietas; 8 corresponde ao hospedeiro natural, *A. kuehniella*)..... 63
16. Gráfico de distribuição tridimensional das dietas e hospedeiro natural pela análise de componentes principais, para avaliação do comportamento de diferentes dietas no desenvolvimento de *Bracon hebetor* (números de 1 a 7 correspondem às dietas; 8 corresponde ao hospedeiro natural, *A. kuehniella*) 65

CRIAÇÃO “IN VITRO” DO ECTOPARASITÓIDE LARVAL
***Bracon hebetor* SAY, 1857 (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)**

Autora: SANDRA REGINA MAGRO

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO POSTALI PARRA

RESUMO

Com o objetivo de se desenvolver uma dieta artificial para a criação “*in vitro*” de *B. hebetor*, avaliou-se a influência de diferentes espécies de lagartas, hospedeiras ou não, para sua criação “*in vivo*”, a fim de selecionar o mais adequado para extração dos hototecidos pupais, desde que este é o principal componente na confecção de uma dieta artificial para ectoparasitóides. Assim, realizou-se o estudo da biologia de *B. hebetor*, em condições controladas de temperatura ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($60\pm 10\%$) e fotoperíodo (fotofase de 14 horas), sobre sete lagartas de lepidópteros, *Anagasta kuehniella* (Zeller), *Corcyra cephalonica* Stainton e *Sitotroga cerealella* (Olivier) (hospedeiros naturais) e *Diatraea saccharalis* (Fabricius), *Heliothis virescens* (Fabricius), *Anticarsia gemmatilis* Hübner, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (insetos criados rotineiramente no laboratório de Biologia de Insetos da ESALQ/USP e, portanto, de fácil obtenção). A duração do ciclo biológico (ovo-adulto) e respectiva viabilidade foram afetadas em função do hospedeiro utilizado. *D. saccharalis* foi o único hospedeiro não natural que proporcionou resultados semelhantes àqueles obtidos sobre *A. kuehniella*, *C. cephalonica* e *S. cerealella*; quanto a agressividade, *D. saccharalis* produziu insetos com capacidade de paralisação e parasitismo semelhantes àqueles criados sobre as

traças, sendo esta espécie selecionada, juntamente com o hospedeiro natural, *A. kuehniella*, para a extração dos holotecidos pupais. À partir destes holotecidos, foram elaboradas sete dietas artificiais com proporções variadas de holotecidos pupais, gema de ovo, leite semi-desnatado, hidrolisado de lactoalbumina, soro fetal bovino, solução de extrato de levedura água destilada e mistura de sais. A dieta contendo 60% de holotecidos pupais de *D. saccharalis*, 12% de soro fetal bovino, 12% de hidrolisado de lactoalbumina, 16% de gema de ovo, apresentou similaridade ao hospedeiro natural, sendo que a duração do ciclo (ovo-adulto) não diferiu estatisticamente e os adultos prontamente paralisaram e parasitaram a traça, embora numa proporção menor àquela encontrada para aqueles criados sobre *A. kuehniella*. Insetos criados "*in vitro*" apresentaram valores de longevidade de fêmeas estatisticamente semelhantes aos obtidos quando este foi criado sobre o hospedeiro natural; entretanto, cerca de 60% das larvas desenvolvidas sobre as dietas não confeccionaram casulo protetivo na fase de pupa. Não foi verificada diferença morfológica nas glândulas salivares dos insetos que produziram ou não seda, sendo esta deficiência, provavelmente devida à diferenças protéicas no conteúdo das glândulas, pois os valores de proteína foram menores nos insetos criados "*in vitro*".

“IN VITRO” REARING OF LARVAL ECTOPARASITOID
***Bracon hebetor* SAY, 1857 (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)**

Author: SANDRA REGINA MAGRO

Adviser: Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO POSTALI PARRA

SUMMARY

With the goal of developing an artificial diet for “*in vitro*” rearing of *B. hebetor*, the influence of different lepidopteran species - either host or not - was evaluated for “*in vivo*” rearing in order to select the most suitable pupal holotissue extraction, since this is the main feature in the making of an artificial diet for ectoparasitoids. Thus, the biology of *B. hebetor* was studied under controlled temperature conditions ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), relative humidity ($60\pm 10\%$) and photoperiod (14-hour photophase) on seven lepidopteran larvae: *Anagasta kuehniella* (Zeller), *Corcyra cephalonica* Stainton and *Sitotroga cerealella* (Olivier) (natural hosts) and *Diatraea saccharalis* (Fabricius), *Heliothis virescens* (Fabricius), *Anticarsia gemmatilis* Hübner, and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (insects regularly reared at the Insect Biology laboratory of ESALQ/USP, therefore easily obtained). The duration of the biological cycle (egg-adult) and respective viability was affected according to the host used. *D. saccharalis* was the only not-natural host providing results similar to those found on *A. kuehniella*, *C. cephalonica* and *S. cerealella*; regarding aggressiveness, *D. saccharalis* produced insects with paralyzing and parasitism capacities similar to those reared on grain stored moths, and this species was selected together with

the natural host, *A. kuehniella*, for pupal holotissues extraction. Through these holotissues, seven artificial diets were prepared with varied ratios of pupal holotissues, egg yolk, semi-skimmed milk, lactalbumin hydrolysate, bovine fetal serum, yeast extract solution, distilled water and salt mixture. The diet containing 60% pupal holotissues of *D. saccharalis*, 12% bovine fetal serum, 12% lactalbumin hydrolysate, and 16% egg yolk showed similarity towards the natural host, and the life cycle (egg-adult) did not differ statistically, with adults readily paralyzing and parasitizing the larvae, although in a lower rate than that found for those reared on *A. kuehniella*. The “*in vitro*”-reared insects presented female longevity values statistically similar to those obtained when rearing was performed on the natural host; however, 60% larvae developed on the diets failed to spin the protective cocoon at the pupal stage. No morphological difference was observed in the salivary glands of the insects producing or not silk, which is probably due to the protein differences of the content of the glands, once the protein values were lower for the “*in vitro*”-reared insects.

1. INTRODUÇÃO

O controle de pragas de grãos armazenados, atualmente, é feito através expurgo com fosfina ou brometo de metila e de polvilhamento ou pulverizações com fosforados ou piretróides. Embora normalmente seja eficiente, a utilização contínua e indiscriminada de inseticidas pode acarretar sérios problemas, como a presença de resíduos tóxicos nos produtos (Schulz & Laborius, 1986) e a resistência de insetos a estes inseticidas (Guedes, 1991). Estes problemas têm despertado um crescente interesse pelo controle biológico destas pragas, seja ele isolado ou integrado a outras táticas de controle, dentro de uma filosofia de Manejo Integrado de Pragas (MIP).

Em armazéns tem sido observada a atividade de *Bracon hebetor* Say, 1857 (Hym.: Braconidae) associado a muitas traças, sendo este ectoparasitóide considerado por muitos autores como um promissor agente de controle biológico destes insetos-praga, proporcionando, em alguns casos, melhores resultados do que o controle químico convencional (Woll *et al.*, 1987; Cline *et al.*, 1984). Inoue (1997) constatou redução na população da praga e nas perdas, quando associou *Trichogramma pretiosum* Riley e *B. hebetor* para o controle de *Sitotroga cerealella* (Olivier, 1789) (Lep.; Gelechiidae), em milho armazenado.

Contudo, a produção massal de inimigos naturais tem se revelado como um dos principais entraves para a utilização do controle biológico de insetos, especialmente em se tratando de liberações inundativas, pois sua produção depende da manutenção de criação massal de seu hospedeiro

(criação de parasitóides “*in vivo*”). Para simplificar a produção destes agentes de controle biológico, reduzindo os custos de produção, pesquisas têm sido conduzidas em vários laboratórios, com o objetivo de desenvolver técnicas que permitam sua criação em meios artificiais (produção “*in vitro*”) (Parra & Cònsoli, 1992; Grenier, 1997; Cònsoli & Parra, 1997a; 1999). Para tanto, é fundamental o conhecimento de características nutricionais e bioquímicas de ambos, hospedeiro e parasitóide (ou predador), e respectivas interações para assegurar o sucesso desta forma de controle (Thompson, 1986).

O histórico da criação “*in vitro*” de insetos vem de longa data, sendo que o primeiro a criar um parasitóide em dieta artificial foi Prell em 1915¹ (citado por Cònsoli & Parra, 1997a); entretanto, foi à partir da década de 40, com os trabalhos de G. Fraenkel sobre exigências nutricionais de pragas de grãos armazenados que houve uma grande evolução na área de criação de insetos em meios artificiais, verificando-se maiores avanços nas últimas três décadas, o que facilitou a produção de inimigos naturais sobre hospedeiros criados nestas dietas (Parra, 1999). A produção “*in vitro*” tem avançado nos últimos anos e hoje já existem vários casos de sucesso de produção destes inimigos naturais em dietas artificiais (Cònsoli & Parra, 1997a; 1999). Destes trabalhos, entretanto, poucos são os relacionados com a criação “*in vitro*” de ectoparasitóides, como *B. hebetor* e espécies afins.

Assim, o objetivo desta pesquisa foi, a partir do estudo biológico em sete hospedeiros (criação “*in vivo*”), definir o mais adequado, para servir como base para o desenvolvimento de uma dieta artificial e de um sistema para criação de *B. hebetor* “*in vitro*”, pois, dessa forma, além de se reduzirem os custos de produção, tal sistema poderá servir como modelo de produção “*in vitro*” para ectoparasitóides e para aprofundamento dos estudos das interações parasitóides e hospedeiros.

¹ PRELL, H. Zur biologie der tachinen *Parasetigena segrega* Rdi und *Panzeria rudis* Fall. **Z. angew. Entomol.** 3: 57-148, 1915.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Hospedeiros de *Bracon hebetor* Say, 1857 e viabilidade de sua utilização para controle de pragas

B. hebetor (Hym.; Braconidae) possui um grande número de hospedeiros, havendo referência de sua ocorrência em laboratório e em condições naturais. Quase todas as espécies de lepidópteros que atacam produtos armazenados são por ele parasitadas (Payne, 1934² citado por Serra, 1992). Os hospedeiros mais freqüentes são: *Anagasta kuhniella* (Zeller) (Parra *et al.*, 1989; Shonouda & Nasr, 1998), *Ephestia cautella* (Walker) (Woll *et al.*, 1987; Hagstrum, 1983), *Cadra cautella* (Walker) (Keever *et al.*, 1985, 1986; Cline & Press, 1990; Cline *et al.*, 1984; Brower & Press, 1990; Cline, 1989), *Plodia interpunctella* (Hueb.) (Keever *et al.*, 1985, 1986; Brower & Press, 1990; Reinert & King, 1971; Jervis *et al.*, 1994), *Corcyra cephalonica* Stainton e *Helicoverpa armigera* Hbn. (Nikam & Pawar, 1993).

O Controle Biológico por inimigos naturais em armazéns pode ser viável desde que haja modificações na forma de controle convencional e no ambiente de armazenamento, favorecendo os inimigos naturais presentes e aqueles liberados em grandes quantidades, sejam eles parasitóides ou

predadores (Hainess³, 1984, citado por Inoue, 1997). Portanto, o desenvolvimento e sucesso de um programa de Controle Biológico exigem a cooperação entre institutos de pesquisa, serviços de extensão e produtores, além da disponibilidade dos inimigos naturais a serem liberados (Hassan, 1993).

Press⁴ et al. (1982), citados por Cline et al. (1984), verificaram que *B. hebetor* é eficiente no controle de traças de produtos armazenados, tais como *Ephestia elutella* (Hübner), *Cadra fugiliella* (Gregson), *A. kuehniella* e *P. interpunctella*, reduzindo a população de todas as espécies; Woll et al. (1987) verificaram que este parasitóide controlou 100% da população de *E. cautella*. Cline et al. (1984) constataram, ainda, que *B. hebetor* controlou também a traça-do-amendoim, *C. cautella*, ficando demonstrado o seu potencial como agente de controle biológico em armazéns. Prozell & Schöller (1998) verificaram a ocorrência natural de *B. hebetor* em armazéns de padarias, auxiliando no controle de *A. kuehniella*.

Em alguns casos, como na criação de hospedeiros alternativos para obtenção de ovos para a multiplicação de *Trichogramma*, *B. hebetor* chega a dizimar tais sistemas de produção. Assim, a produção de ovos de *A. kuehniella*, para multiplicação de *Trichogramma galloi* Zucchi e *T. pretiosum* Riley, foi reduzido em 69% em Piracicaba/SP, devido à presença de *B. hebetor*. Este braconídeo é mais prejudicial em altas temperaturas (Parra et al., 1989), sendo atraído pelo "frass" de *A. kuehniella* (Parra et al., 1996).

A liberação de predadores e parasitóides, os quais atacam diferentes fases do desenvolvimento da praga, pode melhorar a eficiência do controle

² PAYNE, N.M. The differential effect of environmental factors upon *Microbracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) and its host, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). II **Ecological Monographs**, Lawrence, 4 (1): 1-45, 1934.

³ HAINESS, C. P. Biological methods for integrated control of insects and mites in tropical stored products. **Tropical Stored Products Information**, 48: 17-25, 1984.

⁴ PRESS, J.W., CLINE, L.D. & FLAHERTY B.L. A comparison of two parasitoids, *Bracon hebetor* (Hym.: Braconidae) and *Venturia canescens* (Hym.: Ichneumonidae), and a predator *Xylocoris flavipes* (Hem.: Anthocoridae) in suppressing residual populations of the almond moth, *Ephestia cautella* (Lep.: Pyralidae). **J. Kans. Entomol. Soc.** 55: 725-728, 1982.

biológico e superar o complexo de pragas em produtos armazenados (Keever, *et al.* 1986). Brower & Press (1990) citaram experiências positivas quanto à utilização da associação de parasitóides para Programas de Controle Biológico de lepidópteros-praga em grãos armazenados. Eles salientaram que o emprego de inimigos naturais, incluindo *B. hebetor*, proporcionou melhores resultados do que o controle convencional com Malathion em amendoim. Inoue (1997) encontrou perspectivas de controle de *S. cerealella* em milho armazenado, quando este parasitóide foi associado a *T. pretiosum*.

2.2. Biologia e Parasitismo de *B. hebetor*

Serra (1992) estudando a bioecologia de *B. hebetor* e utilizando *A. kuehniella* como hospedeiro, constatou que houve uma relação inversa entre a duração do desenvolvimento deste braconídeo e a elevação da temperatura em todas as fases do seu ciclo, bem como na longevidade dos adultos. O limiar térmico inferior de desenvolvimento para este parasitóide foi de 13,9°C e a constante térmica de 150,8 GD. A temperatura mais adequada para a criação do parasitóide, segundo o mesmo autor, é a de 32°C, sendo constatado que *B. hebetor* promove a paralisação do hospedeiro em temperaturas superiores a 8°C e oviposita quando a temperatura do ambiente estiver acima de 14°C.

Quanto à idade do hospedeiro, Serra (1992) verificou que *B. hebetor* paralisa igualmente lagartas de quarto e quinto ínstar, mas o parasitismo foi significativamente maior naquelas de quinto ínstar. Hagstrum (1983) também observou que a frequência de ataque de *B. hebetor* sobre *E. cautella* aumentou em lagartas de último ínstar. Estudando o efeito do tamanho de dois hospedeiros para o desenvolvimento de *B. hebetor*, Taylor (1988) observou que

ocorreu menor taxa de sobrevivência para insetos criados sobre hospedeiros menores, para as duas espécies hospedeiras testadas.

A tabela de vida de fertilidade de *B. hebetor* sobre *C. cephalonica*, foi estudada por Nikam & Pawar (1993). Estes constataram que a duração da fase imatura e a longevidade deste ectoparasitóide foram de 13 e 37,5 dias, respectivamente, enquanto a relação macho: fêmea da descendência foi 1,9:1. Estes autores verificaram ainda que a capacidade inata de aumento foi de 0,215 por fêmea por dia e que a população multiplicou-se 52,12 vezes em um período de 18,38 dias (uma geração).

Serra (1992) observou, a 25°C, que a duração da fase larval foi de 14,5 dias, com longevidade das fêmeas de 18,7 dias e razão sexual de 0,7, nesta condição térmica. Quanto à capacidade de parasitismo e ritmo de postura o mesmo autor constatou que, em média, uma fêmea de *B. hebetor* deposita 231 ovos, com uma grande variação, oscilando entre 6 e 631 ovos por fêmea. A quantidade média de ovos colocada por dia também foi variável. Nikam & Pawar (1993) verificaram que o número médio da progênie deste parasitóide foi de 258,9, com uma pequena variação nos valores observados.

2.3. Criação de parasitóides “*in vitro*”

Para a consolidação de programas de controle biológico com inimigos naturais, é necessária a obtenção de grande quantidade de agentes de controle com qualidade e baixo custo de produção (Grenier *et al.*, 1994). Uma alternativa para este problema seria a criação “*in vitro*” desses inimigos naturais.

Dos países que iniciaram as pesquisas de criação “*in vitro*” de *Trichogramma* na década de 70, apenas a China obteve o domínio dessa

técnica de produção em larga escala, o que permite a liberação desses insetos em áreas extensas, para o controle das mais diversas pragas (Cônsoli, 1997). Países como a França, EUA e, recentemente, o Brasil também buscam o desenvolvimento e aprimoramento dessa nova técnica de criação, que proporcionará grandes avanços no sistema atual de criação de parasitóides (Grenier, 1997).

A importância destes insetos, especialmente parasitóides e predadores, como agentes de Controle tem estimulado o interesse em estudos dietéticos, visando a criação massal sobre meios sintéticos, como alternativa para redução dos custos de produção. O desenvolvimento de tais tecnologias “*in vitro*” requer conhecimentos de fisiologia e metabolismo de parasitóides e um entendimento da natureza das interações parasitóide/hospedeiro.

Métodos de criação “*in vitro*” têm sido usados para examinar as exigências nutricionais quantitativas e qualitativas, bem como a bioquímica nutricional, sendo que o aperfeiçoamento destas técnicas depende de estudos e conhecimento de fisiologia do parasitóide, nutrição, genética e comportamento (Thompson, 1986). Apesar dessas limitações, tecnologias de criação estão disponíveis e muitos parasitóides/predadores podem ser criados continuamente sobre meios artificiais (Guerra *et al.*, 1993; Thompson, 1999).

Cônsoli e Parra (1997a) citaram Prell⁵ (1915) como o primeiro autor a criar um parasitóide, *Parasetigena agilis*, em dieta artificial para estudos da sua biologia. Entretanto, o interesse pela utilização desta técnica de criação para produção de insetos para uso em programas de controle biológico começou a aumentar na década de 70. Os mesmos autores relataram que técnicas “*in vitro*” já permitiram a criação de 71 espécies de parasitóides, obtendo-se adultos em 53 delas. As pesquisas estão concentradas nas ordens Diptera e Hymenoptera, com 16 e 55 espécies estudadas, respectivamente. A ordem

⁵ PRELL, H. 1915. Zur biologie der tachinen *Parasetigena segregata* Rdi und *Panzeria rudis* Fall. **Z. Angew. Entomol.** 3: 57-148.

Hymenoptera, no entanto, tem apresentado maior número de casos bem sucedidos.

O primeiro relato de criação de *Trichogramma pretiosum* Riley, de ovo a adulto, em dieta artificial, sem adição de componentes de ovos do inseto hospedeiro foi feito por Hoffman *et al.* (1974). Os autores verificaram que a porcentagem de pupação e emergência dos adultos foram semelhantes para os dois sistemas de criação (*"in vivo"* e *"in vitro"*). Os parasitóides criados sobre dieta artificial acasalaram e ovipositaram sem dificuldade; contudo, aproximadamente 60% dos adultos criados em meio artificial não expandiram completamente as asas. Na América do Sul, Parra e Cònsoli (1992) foram os primeiros a obter a criação de um parasitóide (*T. pretiosum*) *"in vitro"* embora com baixa viabilidade e grande deformação de abdômens e asas dos parasitóides produzidos. Cònsoli & Parra (1996) estudaram a biologia de *T. pretiosum* e *T. galloi* Zucchi criados sobre hospedeiro alternativo e sobre dieta artificial e verificaram que o desenvolvimento de ovo-adulto foi alongado para *T. pretiosum* criado em dieta artificial; por outro lado, não foram observadas diferenças para *T. galloi* produzido nos dois sistemas de criação (*"in vivo"* e *"in vitro"*). Embora tenha havido problemas de má formação de abdômens e asas e redução na viabilidade dos parasitóides criados *"in vitro"*, não foram observadas diferenças no tamanho dos adultos e na morfologia do aparelho genital, quando os parasitóides foram provenientes dos dois sistemas de criação. Em trabalho subsequente, Cònsoli & Parra (1997b) verificaram que as duas espécies deste parasitóide mostraram diferenças nas exigências nutricionais para seu desenvolvimento, sendo entretanto essencial, para ambas, hemolinfa de inseto (70%) e gema de ovo (20%). Os autores concluíram que a má formação de asa estava relacionada com a alta umidade nos recipientes de criação, sendo esta característica observada em *T. galloi*, quando criado também sobre hospedeiro natural em condição de alta umidade relativa.

Nordlund *et al.* (1997) pesquisando a viabilidade de *T. minutum*, Riley, quando criado *"in vitro"* por 10 gerações consecutivas, constataram que

fêmeas criadas “*in vitro*” foram maiores, mais longevas e parasitaram mais ovos de *Helicoverpa zea* (Boddie), quando comparadas àquelas criadas “*in vivo*”. A porcentagem de emergência dos adultos foi semelhante para os dois sistemas de criação; entretanto, houve maior índice de deformação de adultos naquela população criada “*in vitro*”, para todas as gerações.

A maioria das dietas utilizadas para a criação dos parasitóides apresenta na sua composição algum componente de inseto, normalmente hemolinfa, holotécidos pupais ou extrato dos ovos dos hospedeiros. Trabalho recente de Xie, *et al.* (1997) mostrou a criação de *T. minutum* e *T. brassicae* Bezdenko, de ovo a adulto, em dietas sem componentes de insetos, sendo que a melhor dieta proporcionou viabilidade larval de 94% e pupal de 28% para *T. minutum*. Estes estudos representam um avanço no desenvolvimento da criação destes parasitóides “*in vitro*”, pois eliminam a necessidade de criação simultânea de outra espécie de inseto.

Thompson (1975) utilizou dieta líquida dissolvida em pedaços de algodão, para o ectoparasitóide *Exeristes roborator* (Fabricius), transferindo larvas para dietas novas sempre que havia ressecamento; este autor obteve viabilidade total de 30% e os machos apresentaram tamanho semelhante àqueles criados em hospedeiro natural. O maior problema encontrado neste procedimento de criação foi que o líquido livre envolvia e matava larvas do parasitóide, particularmente nos primeiros ínstares. Contrastando com os endoparasitóides, *E. roborator* não apresenta adaptações respiratórias ou alterações essenciais para viver em meios líquidos. Por outro lado, quando se adicionou agente gelificante na dieta líquida, os parasitóides apresentaram crescimento e desenvolvimento comparáveis àqueles criados sobre duas espécies de hospedeiros naturais [*Pectinophora gossypiella* (Saunders) e *Phthorimaea operculella* (Zeller)]. A porcentagem de parasitóides obtidos foi superior a 80%, maior do que quando criados em hospedeiros naturais. Os parasitóides criados “*in vitro*” foram comparáveis, em tamanho, àqueles criados “*in vivo*” e, muitas vezes, com uma proporção maior de fêmeas. As fêmeas

criadas "*in vitro*" foram normais com relação a alimentação e prontamente ovipositaram, com uma produção adequada de ovos para a espécie.

Bracon mellitor Say e *Catolaccus grandis* Burks, importantes ectoparasitóides de *Anthonomus grandis* Boheman, foram criados com comparável sucesso sobre dietas contendo hemolinfa de inseto de diferentes fontes; contudo, a porcentagem de pupação e emergência de adultos foram muito menores, para as duas espécies, quando comparados aos insetos criados sobre o hospedeiro natural (Guerra, 1992). No ano seguinte, Guerra *et al.* (1993) trabalhando com os mesmos parasitóides em dietas artificiais desprovidas de componentes de insetos, observaram que o ciclo de vida de ambos foi reduzido significativamente quando comparado à criação "*in vivo*". A emergência de adultos foi maior para *C. grandis* criado "*in vitro*" e não diferiu estatisticamente do controle para *B. mellitor* criado em dieta artificial.

Guerra & Martinez (1994) utilizaram a dieta previamente desenvolvida por Guerra *et al.* (1993), para a criação de *C. grandis* e, neste caso, números significativamente superiores de ovos foram conseguidos quando utilizou-se o sistema de criação fechado "*in vitro*", comparado àquele obtido no método de criação "*in vivo*", utilizando-se larvas do bicudo do algodoeiro como hospedeiro. O período larval e a duração do ciclo de vida (ovo-adulto) foram significativamente menores quando utilizou-se o método de criação "*in vivo*", embora a diferença numérica tenha sido menor do que um dia. Por outro lado, a produção de adultos foi significativamente maior (25%) quando criados "*in vitro*". Os resultados indicam que não houve efeito no comportamento geral do parasitóide, acasalamento, fecundidade e fertilidade quando comparado ao parasitóide criado "*in vivo*".

C. grandis foi criado em cinco dietas artificiais por Rojas *et al.* (1996), verificando-se que não houve diferença na razão sexual da progênie das fêmeas criadas tanto sobre o hospedeiro natural como em dieta artificial; apesar disto, o peso das pupas foi significativamente menor do que o controle e as fêmeas produzidas "*in vitro*" produziram menos ovos. Estes resultados

demonstraram haver uma correlação entre o peso das pupas e a fecundidade para este ectoparasitóide.

Em trabalho subsequente, Rojas *et al.* (1997) descreveram a viabilidade do uso de dietas artificiais para a criação massal de *C. grandis*, uma vez que os parasitóides foram prontamente aptos ao parasitismo e controle da praga e os custos de produção drasticamente reduzidos. Testes de campo demonstraram a potencialidade deste agente de controle biológico quando criado "*in vitro*" (Morales-Ramos *et al.*, 1998).

Registro da criação de *B. hebetor* sobre dieta artificial encapsulada em parafilme foi feito por Xie *et al.*, (1989). O parasitóide completou o desenvolvimento larval em 12-13 dias, na temperatura de 26-28°C e umidade relativa de 75-80%. As viabilidades das fases de ovo, larva e pupa foram respectivamente 72, 48 e 24%. Yazlovetsky *et al.* (1992) estudaram a possibilidade de criação deste mesmo ectoparasitóide em meio oligídico, constatando o desenvolvimento do segundo ínstar até o estágio de pupa, com cerca de 80% de adultos normais.

2.4. Necessidades nutricionais dos insetos e composição básica de dietas artificiais.

O crescimento, desenvolvimento e reprodução de insetos são diretamente correlacionados com a quantidade e a qualidade do alimento ingerido. Dessa forma, a quantidade e a qualidade do alimento consumido na fase larval afetam a taxa de crescimento, o tempo de desenvolvimento, peso do corpo, sobrevivência, bem como a longevidade, fecundidade, movimentação e capacidade de competição dos adultos (Parra, 1991).

Os insetos têm como exigências nutricionais básicas aminoácidos, vitaminas e sais minerais (nutrientes essenciais) e carboidratos, lipídios e esteróis (nutrientes não essenciais) (Parra, 1991). Scriber & Slansky (1981) salientam que a nutrição quantitativa considera que não é somente importante, para o inseto, as exigências nutricionais básicas, mas a proporção de alimento ingerido, digerido, assimilado e convertido em tecidos de crescimento.

Anastatus japonicum Ashmead, *Telenomus dendrolimusi* Chu, *Dibrachys cavus* Walker, *B.hebetor*, *B. greeni* Ashmead e várias espécies do gênero *Trichogramma* foram criadas em dieta artificial composta basicamente por hemolinfa, gema de ovo, mistura de sais, leite semi-desnatado e anticontaminantes (em diferentes proporções para cada caso), tendo havido desenvolvimento completo de ovo (ou larvas neonatas) até adulto (trabalhos citados por Li, 1992).

A hemolinfa tem numerosas funções nos insetos. As principais são transporte de nutrientes e de fatores hormonais e estocagem de diversos materiais (Mullins, 1985). Ela é, portanto, rica em compostos específicos aos insetos (aminoácidos e fatores de crescimento). Os constituintes da hemolinfa são proteínas e aminoácidos, glicídios, lipídios e minerais (Chapman, 1969).

As proteínas ingeridas são degradadas enzimaticamente em aminoácidos, os quais são absorvidos na parede intestinal. Os aminoácidos asseguram, de uma parte, a manutenção do organismo (proteínas de estrutura, enzimas), e de outra parte, seu crescimento (produção de novas substâncias celulares, progênie). Do ponto de vista nutritivo, os aminoácidos são classificados em essenciais ou não essenciais. Todos os insetos que não apresentam simbiontes precisam dos L-isômeros de 10 aminoácidos indispensáveis: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina (Dadd, 1985; Parra, 1999). House (1963), citando os trabalhos de Haidak (1937)⁶ e Butler (1943)⁷, descreveu os

⁶ HAYDAK, M.H. 1937. The influence of pure carbohydrate diet on newly emerged honeybees. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 30, 258-262.

efeitos da falta de proteína na dieta de *Apis mellifera*, ocorrendo atraso em muitos processos fisiológicos podendo, inclusive, levar à morte. Em colméias privadas de pólen por longos períodos, as abelhas ficaram paralisadas, os pêlos foram perdidos, as asas tornaram-se quebradiças e a mortalidade foi alta.

Os açúcares (carboidratos) são necessários para a maioria dos insetos estudados até hoje, a fim de se obter um crescimento ótimo. O principal papel metabólico dos carboidratos é o suprimento de energia e, tem-se que sua deficiência causa baixa vitalidade (House, 1963). Os carboidratos podem ser convertidos em gorduras para o armazenamento e contribuir para a produção de aminoácidos; assim, os carboidratos, gorduras e proteínas são envolvidas em ciclos de reações produtoras de energia (Parra, 1999). Além do valor nutritivo e energético dos carboidratos, eles são fagoestimulantes. As enzimas digestivas disponíveis nos insetos hidrolisam este açúcar em monômeros (pequenas moléculas isoladas como os monossacarídeos) que são, então, absorvidas no do intestino (Dadd, 1985). A hemolinfa contém, essencialmente, a trealose.

Os constituintes inorgânicos são úteis em graus diversos, de acordo com as espécies. Os carbonatos, os fosfatos, o potássio e o magnésio são os mais comuns na hemolinfa dos insetos; sendo os três últimos os mais freqüentemente necessários aos insetos (Dadd, 1985). Os sais minerais são importantes para o balanceamento iônico e a permeabilidade da membrana dos insetos (Parra, 1999).

Do ponto de vista nutricional, para numerosas espécies, os lipídios são sobretudo importantes para as formas jovens (Dadd, 1985). Na hemolinfa, os diglicerídios predominam. Os insetos utilizam lipídios e podem sintetizá-los a partir de proteínas e carboidratos (Parra, 1991).

A utilização de gema de ovos de galinha é uma forma de se fornecer ao meio, lipídios. Ela apresenta, também, o colesterol e outros elementos como

⁷ BUTLER, C.G. Bee paralysis, may disease, etc. **Bee World**, 24,3-7.

a colina e as vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis; contém protídeos, pouco de glicídios e numerosos cátions (Grenier, 1986⁸ citado por Volkoff, 1990).

Entre os lipídios, somente os esteróis são sempre exigidos, pois os artrópodos, diferentemente dos vertebrados, não são capazes de sintetizá-los a partir dos acetatos. Os esteróis são utilizados pelos insetos como componentes da estrutura das células e eles contribuem na síntese reguladora do crescimento e na “muda” (Parra, 1991). Todos os insetos podem satisfazer suas necessidades de esteróis utilizando o colesterol presente na gema do ovo (Dadd, 1985).

A gema do ovo apresenta, ainda, um grande número de fatores ditos “de crescimento”. Os mais importantes, para os insetos em geral, são as vitaminas B (cofator de enzimas), os fatores lipogênicos (colina e mio-inositol) e ácido ascórbico. As vitaminas são substâncias orgânicas, exigidas em pequenas quantidades desde que não podem ser sintetizadas. Elas atuam nos processos metabólicos, fornecendo componentes estruturais das enzimas (Parra, 1999). Quanto ao leite de vaca, ele é utilizado pela presença de proteínas, glicídios e sais minerais (Volkoff, 1990).

⁸ GRENIER, S. 1986. Biologie et physiologie des relations hôtes parasitoïdes chez 3 Tachinaires (Diptera: Tachinidae) d'intérêt agronomique. Développement en milieux artificiels. Lutte biologique. **Thèse Docteur d'Etat es Sciences**. Lyon. IDE 8604, 156p., 68 fig.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos biológicos de *Bracon hebetor* Say, 1857 (Hym.; Braconidae) foram realizados no Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba/SP. Utilizaram-se câmaras climatizadas reguladas à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, UR de $60\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas para acondicionamento de todo material vivo e condução das pesquisas.

3.1 Manutenção da população de parasitóide

A criação estoque de *B. hebetor* foi iniciada com a coleta de adultos da população infestante da criação de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lep.; Pyralidae) utilizada para a produção de *Trichogramma* spp., no Laboratório de Biologia de Insetos da ESALQ/USP.

Casais do ectoparasitóide individualizados em frascos cilíndricos de vidro (2,0cm de diâmetro x 4,5cm altura), providos de tampa de borracha, receberam diariamente uma lagarta de quinto ínstar de *A. kuehniella*, pois, segundo Serra (1992), é o ínstar preferido pelo parasitóide. Após 24 horas, as lagartas já paralisadas e parasitadas foram removidas dos frascos e

transferidas para placas de Petri (6,0cm x 2,0cm), sendo mantidas nas condições de ambiente descritas anteriormente até a emergência dos adultos (Figura 1).

Figura 1. Frascos para individualização dos casais de *Bracon hebetor* para parasitismo (A) e placas de Petri para acondicionamento das lagartas parasitadas (B).

3.2 Criação dos lepidópteros destinados aos estudos biológicos.

Os insetos utilizados para os estudos biológicos de *B. hebetor* foram: *A. kuehniella*; *Sitotroga cerealella* (Olivier, 1819) (Lep.; Gelechiidae), *Corcyra cephalonica* (Stainton, 1865) (Lep.; Pyralidae), *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lep.; Crambidae), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lep.; Noctuidae), *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lep.; Noctuidae) e *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781) (Lep.; Noctuidae).

As traças de produtos armazenados (*A. kuehniella*, *S. cerealella* e *C. cephalonica*) foram criadas segundo os métodos propostos por Parra (1997); Bleicher *et al.*, (1987) e Bernardi *et al.* (2000), respectivamente.

A lagarta-do-cartucho-do-milho (*S. frugiperda*), da maçã-do-algodoeiro (*H. virescens*), a broca da cana-de-açúcar (*D. saccharalis*) e a lagarta da soja (*A. gemmatilis*) foram criadas em dietas artificiais conforme Nalim (1991), Moretti & Parra (1983), Parra e Mishfeldt (1992) e Greene *et al.* (1976), respectivamente. As dietas foram oferecidas às lagartas recém-eclodidas em tubos de vidro cilíndricos (2,5cm de diâmetro x 8,5cm de altura) tampados com chumaço de algodão hidrófugo, segundo a metodologia de Parra (1999).

3.3 Determinação do ínstar em que ocorre maior paralisação e parasitismo por *B. hebetor*, dentre as espécies *A. gemmatilis*, *D. saccharalis*, *H. virescens* e *S. frugiperda*.

Foram oferecidas a casais individualizados de *B. hebetor*, lagartas das espécies *D. saccharalis*, *S. frugiperda*, *A. gemmatilis* e *H. virescens* em

três ínstaros (3º, 4º e 5º ínstaros), sendo o período de exposição, das lagartas aos ectoparasitóides, de 24 horas. Após este período, as lagartas foram removidas dos frascos e avaliou-se a porcentagem de lagartas paralisadas e parasitadas

Cada tratamento (ínstar/espécie) foi composto de 25 repetições, num delineamento inteiramente casualizado.

Após a análise de variância, para comparação entre as médias, utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, sendo as médias transformadas em $\arcsen \sqrt{(x + \alpha)/100}$.

3.4 Seleção do hospedeiro para o desenvolvimento do ectoparasitóide *B. hebetor*.

Casais de *B. hebetor* individualizados receberam uma lagarta de último ínstar (quinto) das espécies *A. kuehniella*, *S. cerealella* e *C. cephalonica*, por ser este o ínstar preferido, segundo Hagstrum (1983) e Serra (1992); foram oferecidas também lagartas de terceiro ínstar de *D. saccharalis* e de quarto ínstar das espécies *S. frugiperda*, *H. virescens* e *A. gemmatilis*, a partir dos resultados do item 3.3 .

As lagartas ficaram expostas ao parasitismo por 24 horas sendo, após este período, retiradas do frasco e colocadas, individualmente, em placas de Petri plásticas (6,0cm x 2,0cm). Em cada lagarta foi permitido o desenvolvimento de apenas um parasitóide, deixando-se apenas um ovo e removendo-se os excedentes. Totalizaram-se 50 repetições para cada tratamento.

As observações foram realizadas diariamente até a emergência dos adultos, anotando-se os períodos de incubação e tempo de desenvolvimento larval e pupal do parasitóide e respectivas viabilidades. Foi também observada a porcentagem de deformação de pupas e adultos e formação de casulo protetivo.

Os parâmetros duração das fases e viabilidades foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade, num delineamento inteiramente casualizado, sendo os dados, em porcentagem, transformados em $\arcsen \sqrt{(x + \alpha)/100}$.

3.5 Capacidade de paralisação e de parasitismo por *B. hebetor* sobre o hospedeiro padrão, *A. kuehniella*, quando criado sobre diferentes hospedeiros (teste de agressividade)

Adultos de *B. hebetor* com um dia de vida, emergidos de cada hospedeiro (item 3.4), foram avaliados quanto à agressividade (capacidade de paralisação e parasitismo) em relação à *A. kuehniella*. Para tanto, separaram-se 40 lagartas de último ínstar desta traça em caixas gerbox (10cm x 10cm x 3cm), colocando-se a seguir um casal de *B. hebetor* que aí permaneceu por 72 horas, totalizando 10 repetições para cada tratamento, número este baseado em Ulyett⁹ (1945) citado por Serra (1992). Após este período, os adultos foram retirados, avaliando-se o número de lagartas paralisadas e parasitadas. Aguardou-se o desenvolvimento larval e pupal do ectoparasitóide para contagem dos adultos e avaliação da razão sexual da espécie.

⁹ ULLYETT, C.G. Distribution of progeny by *Microbracon hebetor* Say. *Journal of the Entomological Society of Southern Africa*, Pretoria, 8: 123-131, 1945.

Para análise, as porcentagens de paralisação e de parasitismo foram transformadas em $\arcsen \sqrt{(x + \alpha)/100}$, submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Para a razão sexual, utilizou-se o teste não paramétrico de X^2 (com correção de Yates, 5% de probabilidade e 1 GL.).

Foram realizadas duas análises de agrupamento ("cluster analysis") e de componentes principais para a seleção do hospedeiro no qual o parasitóide apresentou melhor "desempenho" ("adaptação"). Para a primeira, foi preparada uma matriz T/C, com vetores padronizados a partir da média, sendo ajustados 12 caracteres referentes apenas ao ciclo biológico do parasitóide (período de incubação, duração das fases de larva e pupa e do ciclo total, e viabilidade dos mesmos; capacidade inicial de parasitismo, porcentagem de não formação de casulos, deformações de pupa e/ou adulto e número de adultos obtidos); para a segunda, foram ajustados 14 caracteres, sendo somados aos caracteres biológicos citados anteriormente, os parâmetros de agressividade (porcentagem de paralisação e parasitismo) e sete OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) (tratamentos). Para a análise de agrupamento, utilizou-se como coeficiente de semelhança a distância euclidiana média e como algoritmo de agrupamento o método não ponderado de agrupamento aos pares por média aritmética (UPGMA), sendo os ajustes avaliados pelo grau de correlação cofenética (CCC), grau de encadeamento (C) e pela proporção de fusões a diferentes níveis (P). Para a análise de componentes principais, a partir dos dados das matrizes T/C, foram obtidos os autovalores, autovetores e os eixos ortogonais que permitiram a confecção dos gráficos tridimensionais (Silveira Neto, 1986). Foi utilizado o programa estatístico MOBAE – Modelos Bioestatísticos Aplicados a Entomologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ; a análise – Módulo: Análise de Agrupamento foi baseada em Curi (1982).

3.6 Preparo das dietas artificiais para criação de *B. hebetor*

Para a confecção da dieta artificial para criação 'in vitro' de *B. hebetor* foram utilizados holotecidos pupais de *D. saccharalis* e *A. kuehniella* (insetos que proporcionaram o melhor desempenho de *B. hebetor* em 3.5), adicionados a diferentes quantidades de outros nutrientes que permitiram a elaboração de sete dietas utilizadas para avaliar o desenvolvimento deste ectoparasitóide (Tabela 1). Todo o procedimento de preparo das dietas foi realizado em capela de fluxo laminar, mantendo-se as condições assépticas do meio.

Para a extração dos holotecidos pupais, pupas de 24 a 48 horas de *A. kuehniella* e *D. saccharalis*, criadas em dieta artificial segundo Parra (1997) e Parra & Mishfeldt (1992), respectivamente, foram submetidas a tratamento térmico (água aquecida a 60-62°C, durante 10 minutos), para evitar a melanização da hemolinfa pela ação das fenoloxidasas. Em seguida, o material foi esterilizado superficialmente em solução de hipoclorito de sódio 2%, por 10 minutos, sendo posteriormente lavado por duas vezes consecutivas em água destilada.

Após este tratamento, as pupas foram colocadas dentro de uma seringa descartável de 15ml e comprimidas com o auxílio do êmbolo, sendo o líquido, oriundo do maceramento, coletado em recipiente adequado e centrifugado a 2.000 rpm por 3 minutos.

O material precipitado foi descartado, sendo utilizado apenas o sobrenadante; este foi utilizado imediatamente ou armazenado a -18°C até o momento de preparo das dietas.

Tabela 1. Composição (%) das dietas artificiais utilizadas para avaliar o desenvolvimento “*in vitro*” de *Bracon hebetor*.

	Dietas						
	1 ¹	2	3	4	5	6	7 ²
Holotecidos pupais de <i>D. saccharalis</i>	60	50	50	-	-	-	40
Holotecidos pupais de <i>A. kuehniella</i>	-	-	-	60	50	50	-
Soro fetal bovino	12	15	10	12	15	10	-
Hidrolisado de lactoalbumina	12	15	10	12	15	10	-
Solução de extrato de levedura	-	-	10	-	-	10	-
Gema de ovo	16	20	20	16	20	20	20
Leite semi desnatado	-	-	-	-	-	-	20
Água destilada	-	-	-	-	-	-	10
Mistura de sais de Neisenheimer ³	-	-	-	-	-	-	10
Anticontaminantes ⁴	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6

¹ Dieta para criação “*in vitro*” de *Trichogramma galloi* e *T. pretiosum* (Consoli, 1997)

² Dieta desenvolvida na França para criação “*in vitro*” de *Trichogramma* spp. (Gomes, com. pes.)

³ Formulação [(NaCl 7,5g; KCl 0,1g; NaHCO₃ 0,2g)/litro de água destilada]

⁴ Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina (Antibiotic-Antimycotic GIBCO BRL)

3.7 Avaliação das dietas artificiais para a criação de *B. hebetor*

As dietas foram oferecidas aos parasitóides em placas de Petri plásticas (2,0 x 1,0 cm), sendo colocados 150 µl do meio entre duas lâminas de parafilme (Parafilm®) distendido (Figura2). Os ovos de *B. hebetor*, obtidos do parasitismo sobre *A. kuehniella*, foram transferidos para o parafilme com o auxílio de um pincel, sendo em número de 20 para cada placa. O material foi acondicionado em câmara climatizada (temperatura: 25° ± 2° C; umidade relativa: 60 ± 10%; fotofase: 14 horas) para o acompanhamento diário do desenvolvimento do ectoparasitóide.

Foram avaliados, para cada dieta, a duração das fases de ovo, larva, pupa e ciclo total e suas respectivas viabilidades, bem como a longevidade dos adultos e fecundidade das fêmeas. Procedeu-se à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Apenas as médias de viabilidade foram transformadas em $\arcsen \sqrt{(x + \alpha) / 100}$.

Cada tratamento (dieta) constou de cinco repetições, e todos os parâmetros foram avaliados simultaneamente para parasitóides criados sobre o hospedeiro natural (*A. kuehniella*), servindo como fonte de comparação (testemunha).

Avaliou-se o comportamento das diferentes dietas através da análise de agrupamento e de componentes principais. Foi preparada uma matriz T/C com vetores padronizados a partir da média. Foram ajustados 15 caracteres (período de incubação, duração das fases de larva, pupa, ciclo total e viabilidade das mesmas; porcentagem de não formação de casulo, número de adultos obtidos, porcentagem de paralisação e de parasitismo, longevidade de machos e fêmeas e número total de ovos colocados/fêmea) e oito OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) (tratamentos). A análise foi semelhante àquela descrita no item 3.5.

Figura 2. Seqüência de preparo do sistema para criação “*in vitro*” de *Bracon hebetor*. A, B e C - distensão do parafilme formando uma fina película; D - parafilme acondicionado sobre placa de petri plástica (2,0 x 1,0 cm); colocação da dieta sobre o filme (E); sobreposição da dieta com outro parafilme igualmente distendido (F); G e H- acondicionamento do sistema de criação em placa de petri plástica (6,0 x 2,0 cm).

3.7.1 Capacidade de paralisação e parasitismo por *B. hebetor*, criado nas diferentes dietas e sobre o hospedeiro natural *A. kuehniella* (teste de agressividade)

Para se testar a agressividade de *B. hebetor* criado sobre as diferentes dietas artificiais, bem como sobre o hospedeiro natural, separaram-se 40 lagartas de último ínstar de *A. kuehniella* em caixas gerbox (10cm x 10cm x 3cm) e introduziu-se um casal de *B. hebetor* recém emergido (de 0 a 24 horas), que aí permaneceu por 72 horas, totalizando 10 repetições para cada tratamento, número este baseado em Ulliyett¹⁰ (1945), citado por Serra (1992).

Findo o prazo de exposição, os adultos foram retirados sendo computado o número de lagartas paralisadas e parasitadas. Aguardou-se o desenvolvimento larval e pupal do ectoparasitóide para contagem dos adultos e para avaliação da razão sexual da espécie. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, sendo os valores em porcentagem transformados em $\arcsen \sqrt{(x + \alpha) / 100}$. Para a razão sexual, utilizou-se o teste não paramétrico de X² (com correção de Yates, 5% de probabilidade e 1 GL.)

O ensaio foi mantido em condições controladas, com temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

3.7.2 Qualidade dos insetos produzidos 'in vivo' e 'in vitro' (teste de longevidade e de fecundidade)

Para determinação da longevidade e ritmo de postura do ectoparasitóide, adultos recém emergidos de *B. hebetor*, obtidos das diferentes dietas e do hospedeiro natural foram separados em casais, colocados em

¹⁰ ULLYETT, C.G. Distribution of progeny by *Microbracon hebetor* Say. *Journal of the Entomological Society of Southern Africa*, Pretoria, 8: 123-131, 1945.

frascos de vidro e receberam, diariamente, uma lagarta de último instar de *A. kuehniella* até a morte da fêmea. Para cada repetição foi avaliada a longevidade de machos e fêmeas, o número de ovos depositados sobre o hospedeiro, viabilidade total (porcentagem de adultos em relação ao número de ovos depositados/fêmea/dia) e razão sexual da geração F1.

Os dados foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, sendo as médias transformadas em $\arcsen \sqrt{(x + \alpha) / 100}$.

3.8 Avaliação da morfologia externa da glândula salivar de *B. hebetor* e estudo de seu conteúdo protéico

3.8.1 Extração das glândulas salivares de larvas de *B. hebetor* quando criadas sobre o hospedeiro natural e sobre dieta artificial

A partir da metodologia descrita no item 3.1, foram obtidos ovos de *B. hebetor* com idade entre 0 e 4 horas; entretanto, foram utilizadas apenas fêmeas virgens, a fim de se obterem apenas indivíduos machos (partenogênese arrenótoca). As lagartas de *A. kuehniella* contendo os ovos do parasitóide, foram mantidas em câmara climatizada (temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas). O mesmo procedimento foi adotado para os insetos que foram criados '*in vitro*', sendo, entretanto, os ovos removidos do corpo das lagartas logo após o parasitismo e transferidos para a dieta (item 3.7).

Para extração das glândulas foram utilizadas larvas de *B. hebetor* com idade entre 96-100 horas e 120-124 horas, idades correspondentes ao início da fase de pré-pupa para os insetos criados sobre o hospedeiro natural (*A. kuehniella*) e sobre a dieta artificial 7 (menor produção de casulo, conforme o item 3.5), respectivamente. A glândula foi extraída do inseto vivo, imerso em

solução tampão tris-HCl [3,25g tris-HCl (0,2M) e 0,87g NaCl (0,15M)/100ml de água destilada] pH 4,8, através de uma incisão na região anterior do corpo. As glândulas salivares coletadas, imersas em solução tampão, foram armazenadas em geladeira (temperatura de 10°C).

3.8.2 Estudo da morfologia externa das glândulas salivares de larvas de *B. hebetor*

Para estudo da morfologia externa, 15 glândulas de cada tratamento (dieta natural e artificial) foram analisadas em microscopia óptica, sendo observada sua estrutura geral externa.

3.8.3 Quantificação de proteína

Trinta glândulas de cada tratamento, armazenadas em 100 µl de solução tampão, foram maceradas e submetidas à quantificação de proteína, através do método de Bradford (1976), utilizando-se soro de albumina bovina (BSA) como padrão.

3.8.4 Análise das proteínas através de eletroforese

As proteínas das amostras (item 3.8.3) foram separadas por eletroforese em gel desnaturante de gradiente (de 8 a 12%) de poliacrilamida segundo Sambrook *et al.* (1989). Após a separação eletroforética, o gel foi submetido à coloração com prata, utilizando-se o kit Silver Stan Plus (Bio-Rad), de acordo com as especificações do fabricante.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do ínstar em que ocorre maior paralisação e parasitismo por *Bracon hebetor* Say, 1857 (Hym.; Braconidae), dentre as espécies *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lep.; Noctuidae); *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lep.; Crambidae); *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781) (Lep.; Noctuidae) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lep.; Noctuidae).

Pôde-se verificar que houve uma alta correlação positiva ($R=0,8819$) entre a atividade de paralisação e de parasitismo por *B. hebetor* para as quatro espécies de lepidópteros estudadas (Figura 3).

Verificando-se isoladamente a capacidade de paralisação de *B. hebetor* sobre as quatro espécies, constatou-se que não houve diferença na preferência pelos ínstaras para *D. saccharalis* e *A. gemmatalis*, tendo havido, no entanto, uma paralisação diferencial entre as duas espécies, de 90 e 60% respectivamente. Portanto, para estes dois lepidópteros, *B. hebetor* paralisa indistintamente lagartas de terceiro, quarto ou quinto ínstaras. Para *H. virescens* e *S. frugiperda*, não houve diferença estatística na paralisação entre o quarto e o quinto ínstaras, embora tenha ocorrido uma tendência numérica de maior

paralisação no quarto ínstar (88 e 80% respectivamente, para as duas espécies citadas) (Tabela 2).

Figura 3. Correlação entre paralisação e parasitismo de *Bracon hebetor* sobre quatro espécies de lepidópteros: *A. gemmatalis*, *S. frugiperda*, *H. virescens* e *D. saccharalis*. Temperatura: $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$; Umidade relativa: $60\%\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

Por outro lado, considerando-se a capacidade de parasitismo de *B. hebetor* sobre as quatro espécies de lepidópteros, pôde-se verificar que, exceto para *D. saccharalis*, o quarto ínstar foi “preferido” pelo ectoparasitóide. Para *D. saccharalis* ocorreu maior parasitismo no terceiro ínstar (92%), diferindo significativamente do quarto e quinto ínstares com valores de 64% e 68%, respectivamente. Apesar de ter havido uma tendência numérica de “preferência” de *B. hebetor* pelo quarto ínstar, para *H. virescens* e *S. frugiperda*, não houve diferença estatística entre este e o quinto ínstar, e para *A. gemmatilis* o parasitismo, em todos os ínstares, foi semelhante estatisticamente.

Ficou claro que *B. hebetor* faz distinção quanto à idade do hospedeiro, “preferindo”, de modo geral, lagartas maiores, como foi observado também por Serra (1992) e Taylor (1988). Evidenciou-se ainda a “preferência” do parasitóide por lagartas de *D. saccharalis* (independente do ínstar testado), apresentando uma média de 75% de parasitismo, estatisticamente superior às demais espécies, vindo a seguir *H. virescens* (56%); as lagartas de *S. frugiperda* e *A. gemmatilis* foram as menos parasitadas (Tabela 3).

Castilho *et al.* (1987) estudaram o parasitismo de *B. hebetor* sobre *D. saccharalis* em condições de laboratório, sendo esta a única espécie, dentre as avaliadas na presente pesquisa, citada como hospedeiro deste parasitóide. Entretanto, as espécies utilizadas neste trabalho foram selecionadas para este estudo pelo fato do parasitóide apresentar possibilidade de desenvolvimento sobre elas e por serem rotineiramente criadas no laboratório de Biologia de Insetos da ESALQ/USP e, portanto, fáceis de serem manipuladas para extração de holotecidos, visando à criação do ectoparasitóide “*in vitro*”.

Tabela 2. Capacidade de paralisação e parasitismo de *Bracon hebetor* sobre diferentes ínstaes larvais das espécies: *A. gemmatalis*, *D. saccharalis*, *H. virescens* e *S. frugiperda*. Temperatura: 25°±2°C; Umidade relativa: 60%± 10% e fotofase de 14 horas.

Ínstaes	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	
	% Paralisação	% Parasitismo
3º	48,00 ± 8 A	24,00 ± 4 A
4º	60,00 ± 8.94 A	44,00 ± 9,79 A
5º	68,00 ± 8 A	28,00 ± 4,89 A
	<i>Diatraea saccharalis</i>	
3º	96,00 ± 4 A	92,00 ± 4,89 A
4º	88,00 ± 4 A	64,00 ± 4 B
5º	92,00 ± 4,89 A	68,00 ± 4,89 B
	<i>Heliothis virescens</i>	
3º	54,00 ± 4 B	40,00 ± 6,32 B
4º	88,00 ± 4,89 A	76,67 ± 9,89 A
5º	80,00 ± 6,32 AB	48,00 ± 10,19 AB
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	
3º	32,00 ± 4,89 B	16,00 ± 4 B
4º	80,00 ± 6,32 A	48,00 ± 8 A
5º	68,00 ± 8 A	32,00 ± 8 AB

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Médias transformadas em $\arcsen\sqrt{(x + \alpha)/100}$

Tabela 3. Porcentagem média de parasitismo de *Bracon hebetor* sobre quatro espécies de lepidópteros. Temperatura: $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$; Umidade relativa: $60\% \pm 10\%$ e 14 horas de fotofase.

Espécie	Parasitismo (%)	
<i>Diatraea saccharalis</i>	$74,67 \pm 3,63$	a
<i>Heliothis virescens</i>	$56,00 \pm 4,00$	b
<i>Spodoptera frugiperda</i>	$32,00 \pm 2,62$	c
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	$32,00 \pm 2,62$	c

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Médias transformadas em $\arcsen \sqrt{(x + \alpha)/100}$.

4.2 Seleção do hospedeiro para o desenvolvimento do ectoparasitóide *B. hebetor*.

O hospedeiro afetou o tempo de desenvolvimento de *B. hebetor*, sendo o ciclo total (ovo-adulto) do parasitóide variável de 12 a 13,5 dias, dependendo do hospedeiro utilizado. Ciclos mais longos foram observados quando *B. hebetor* foi criado em lagartas de *H. virescens* e *D. saccharalis*, apresentando valores superiores a 13 dias; entretanto, estes valores não diferiram estatisticamente daqueles encontrados quando o inseto foi criado sobre seus hospedeiros naturais [*Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) e *Corcyra cephalonica* (Stainton, 1865), ambos da família Pyralidae] e sobre lagartas de *S. frugiperda* (Tabela 4). Ciclos menores foram observados quando se

utilizaram como hospedeiros *A. gemmatalis* e *Sitotroga cerealella* (Oliver, 1789) (Lep.: Gelechiidae), com valores estatisticamente inferiores apenas àqueles obtidos nas criações sobre *D. saccharalis* e *H. virescens*. Ahmed *et al.* (1985) verificaram que a duração do ciclo total de *B. hebetor* quando criado sobre *A. kuehniella* foi de 13,3 dias, nas mesmas condições de temperatura do presente experimento. Valores superiores a estes foram verificados por Serra (1992), que constatou uma duração de 14,5 dias para o ciclo de ovo-adulto deste ectoparasitóide sobre *A. kuehniella*.

Com relação à fase larval, o maior valor foi constatado no desenvolvimento do parasitóide sobre *H. virescens*, com 5,9 dias, sendo este valor estatisticamente superior àqueles obtidos nas outras espécies. Houve uma tendência de redução deste período quando os insetos foram criados sobre as três traças dos grãos armazenados (hospedeiros naturais) resultando na duração de 4,5 dias para a fase larval. A indicação de que *D. saccharalis* é um bom hospedeiro para a criação de *B. hebetor* ficou confirmada pelo valor da fase larval próximo àquele obtido nos hospedeiros naturais. O hospedeiro teve, em geral, pouca influência sobre o período de incubação e sobre a fase pupal de *B. hebetor*.

A viabilidade total (ovo-adulto) do ectoparasitóide foi drasticamente afetada pelo hospedeiro (Tabela 5). A traça *S. cerealella* proporcionou o melhor resultado, com 92% de viabilidade total para a criação deste ectoparasitóide, sendo que, valores estatisticamente semelhantes foram obtidos quando se criou *B. hebetor* sobre *A. kuehniella* e *C. cephalonica* (90 e 86% respectivamente). Mais uma vez, *D. saccharalis* se mostrou um hospedeiro adequado, com viabilidade de 76%, não diferindo dos resultados obtidos sobre as traças. Os demais hospedeiros apresentaram viabilidades totais estatisticamente inferiores, variáveis de 10 a 30%. Castilho *et al.* (1987) verificaram viabilidade total para *B. hebetor*, criado sobre *D. saccharalis*, em torno de 45%, sendo que a viabilidade dos ovos foi de 55% e as de larva e pupa foram superiores a 85 e 95% respectivamente; embora os referidos autores tenham estudado a biologia

a 28°C, os valores de viabilidade larval e pupal foram semelhantes aos observados neste trabalho.

Os valores de viabilidade total foram influenciados pelos resultados da viabilidade larval, demonstrando a inadequação de certos alimentos (lagartas não hospedeiras naturais) para o desenvolvimento pré-imaginal deste parasitóide. Não houve variação na viabilidade pupal para todos os tratamentos. Entretanto, como houve grande mortalidade larval quando os insetos foram criados sobre *A. gemmatalis*, *H. virescens* e *S. frugiperda*, o número de indivíduos avaliado com relação à viabilidade pupal foi pequeno, com confiabilidade reduzida para a discussão dos resultados.

O hospedeiro afetou também a porcentagem de pupas e adultos deformados. Dessa forma, ocorreu uma maior porcentagem de indivíduos com deformação na fase de pupa e/ou adulto quando os parasitóides se desenvolveram em *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*, com 7 e 9%, respectivamente. Dos outros hospedeiros não se originaram insetos deformados, e os adultos prontamente parasitaram. Outro fator levado em consideração para a seleção de uma espécie para a criação de *B. hebetor* foi a capacidade de produção de seda e formação de casulos protetivos. Assim, insetos criados sobre *S. frugiperda*, *A. gemmatalis*, *H. virescens* e *D. saccharalis* resultaram respectivamente 75, 70, 57 e 22% de pupas sem a formação de casulo, observando-se apenas 12, 8 e 2% para insetos criados em *S. cerealella*, *C. cephalonica* e *A. kuehniella*, respectivamente. Mais uma vez ficou demonstrado, com estes valores, que o lepidóptero mais próximo aos hospedeiros naturais, em termos de qualidade, para a criação do parasitóide, foi *D. saccharalis*.

Tabela 4. Duração de fases imaturas e ciclo total (ovo - adulto) de *Bracon hebetor* criado sobre sete espécies de lepidópteros. Temperatura: $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$; Umidade relativa: $60\% \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

Espécies	Duração das fases (dias)			
	Ovo	Larva	Pupa	Ciclo total
<i>Heliothis virescens</i>	$1,40 \pm 0,071 \text{ c}$	$5,87 \pm 0,285 \text{ a}$	$6,55 \pm 0,245 \text{ a}$	$13,44 \pm 0,245 \text{ a}$
<i>Diatraea saccharalis</i>	$1,58 \pm 0,072 \text{ bc}$	$4,55 \pm 0,113 \text{ b}$	$6,74 \pm 0,072 \text{ a}$	$13,24 \pm 0,148 \text{ a}$
<i>Anagasta kuehniella</i>	$1,82 \pm 0,054 \text{ ab}$	$4,45 \pm 0,094 \text{ b}$	$6,65 \pm 0,072 \text{ a}$	$12,87 \pm 0,075 \text{ ab}$
<i>Corcyra cephalonica</i>	$2,00 \pm 0 \text{ a}$	$4,59 \pm 0,072 \text{ b}$	$6,67 \pm 0,087 \text{ a}$	$12,74 \pm 0,096 \text{ abc}$
<i>Spodoptera frugiperda</i>	$1,52 \pm 0,068 \text{ bc}$	$4,94 \pm 0,187 \text{ b}$	$6,39 \pm 0,203 \text{ ab}$	$12,52 \pm 0,312 \text{ abc}$
<i>Sitotroga cerealella</i>	$1,68 \pm 0,069 \text{ abc}$	$4,61 \pm 0,070 \text{ b}$	$6,20 \pm 0,069 \text{ ab}$	$11,99 \pm 0,073 \text{ bc}$
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	$1,49 \pm 0,074 \text{ bc}$	$5,05 \pm 0,171 \text{ b}$	$5,71 \pm 0,113 \text{ b}$	$12,28 \pm 0,206 \text{ bc}$

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 5. Viabilidade de fases imaturas e ciclo total (ovo - adulto) de *Bracon hebetor* criado sobre sete lepidópteros. Temperatura: 25° ± 2° C; Umidade relativa: 60%± 10% e fotofase de 14 horas.

Espécies	Viabilidade (%)			
	Ovo	Larva	Pupa	Ciclo total
<i>Sitotroga cerealella</i>	100,00 ± 0,00 a	98,00 ± 2,00 a	94,00 ± 2,45 a	92,00 ± 2,00 a
<i>Corcyra cephalonica</i>	98,00 ± 2,00 a	94,00 ± 4,00 a	93,56 ± 2,64 a	86,00 ± 4,00 a
<i>Anagasta kuehniella</i>	100,00 ± 0,00 a	92,00 ± 4,89 a	98,00 ± 2,00 a	90,00 ± 4,47 a
<i>Diatraea saccharalis</i>	100,00 ± 0,00 a	90,00 ± 5,47 a	84,92 ± 4,95 a	76,00 ± 5,10 a
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	94,00 ± 4,00 a	35,44 ± 9,32 b	77,14 ± 11,38 a	27,99 ± 9,69 b
<i>Spodoptera frugiperda</i>	98,00 ± 2,00 a	32,88 ± 9,92 b	60,00 ± 21,60 a	21,99 ± 9,16 b
<i>Heliothis virescens</i>	94,00 ± 2,45 a	15,33 ± 5,71 b	75,00 ± 25,00 a	9,99 ± 5,48 b

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade. Médias transformadas em $\arcsen \sqrt{(x + \alpha)/100}$.

4.2.1 Capacidade de paralisação e de parasitismo por *B. hebetor* sobre o hospedeiro padrão, *A. kuehniella*, quando criado sobre diferentes hospedeiros (teste de agressividade)

Os testes de agressividade demonstraram que insetos que tiveram como hospedeiros lagartas de 3º instar de *D. saccharalis* paralisaram em torno de 80% as lagartas de último instar de *A. kuehniella*, não diferindo significativamente daqueles criados sobre as traças *A. kuehniella*, *C. cephalonica* e *S. cerealella* (Figura 4). Os parasitóides criados sobre a lagarta-da-maçã-do-algodoeiro, foram menos agressivos, paralisando apenas cerca de 20% das lagartas oferecidas. Em relação ao parasitismo, insetos criados sobre *A. kuehniella* parasitaram mais, quando comparados àqueles criados sobre *D. saccharalis*. Entretanto, não houve diferença na capacidade de parasitismo entre os adultos produzidos sobre este último e aqueles criados sobre as outras traças. Novamente, insetos criados sobre *H. virescens* apresentaram uma menor capacidade de parasitismo, com apenas 2,4% do total de lagartas oferecidas sendo parasitadas.

Os adultos oriundos dos diferentes hospedeiros (naturais e/ou alternativos) foram fecundos e prontamente parasitaram lagartas de último instar de *A. kuehniella*, embora numa proporção menor para os que tiveram *D. saccharalis* e *H. virescens* como hospedeiros. A razão sexual da primeira geração dos insetos criados sobre os diferentes hospedeiros foi de 0,68; 0,42; 0,79; 0,68 e 0,64 respectivamente para *A. kuehniella*, *D. saccharalis*, *C. cephalonica*, *S. cerealella* e *H. virescens*. Pelo teste de X^2 (com correção de Yates, 5% de probabilidade e 1 GL) constatou-se que não houve diferença entre a frequência esperada de machos e fêmeas verificada na criação estoque do parasitóide sobre seu hospedeiro natural *A. kuehniella*, e aquela verificada nos diferentes tratamentos, indicando que a variação do hospedeiro não afetou

a proporção de machos e fêmeas da primeira geração. Serra (1992) encontrou uma razão sexual de 0,74 para este ectoparasitóide quando criado sobre lagartas de último ínstar de *A. kuehniella*, valor próximo àqueles verificados no presente trabalho; Castilho *et al.* (1987) observaram uma razão sexual em torno de 0,45 para *B. hebetor* criado sobre lagartas de *D. saccharalis*.

Figura 4. Relação entre paralisação (%) e parasitismo (%) de *Bracon hebetor* criado em cinco lepidópteros sobre o hospedeiro *A. kuehniella*. Temperatura: $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$; Umidade relativa: $60\% \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. Colunas de mesma cor, seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Os hospedeiros *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* não foram avaliados pois não deram origem a adultos do parasitóide em número suficiente para serem comparados no presente experimento.

Embora *D. saccharalis* tenha se mostrado, dentre os lepidópteros, o mais adequado para desenvolvimento de *B. hebetor*, ainda assim, com relação ao parasitismo, foi inferior a *A. kuehniella*, considerado hospedeiro padrão para este parasitóide (Figura 4).

Diante dos dados anteriormente discutidos e mediante a análise de agrupamento, pôde-se verificar que quando são avaliados apenas os aspectos biológicos para criação do ectoparasitóide (duração das fases de ovo, larva e pupa e do ciclo total, bem como suas respectivas viabilidades, formação de casulo protetivo, deformação, aceitação do hospedeiro e número de adultos obtidos) *D. saccharalis* destacou-se como hospedeiro adequado, apresentando resultados semelhantes aos obtidos quando o inseto foi criado sobre as traças dos grãos armazenados, principalmente *A. kuehniella*. Constatou-se alta similaridade entre as lagartas de *D. saccharalis* e *A. kuehniella* para a criação do ectoparasitóide *B. hebetor*, com uma confiabilidade de 89% (Figura 5a). A análise de componentes principais confirmou esta hipótese, pois agrupou em um mesmo quadrante *A. kuehniella*, *D. saccharalis* e *C. cephalonica* com cerca de 93% de acerto, considerando-se os eixos x, y e z que são influenciados pela viabilidade e duração das fases (Figura 5b).

Pode-se dizer que *D. saccharalis* possui características nutricionais para a criação de *B. hebetor* semelhantes às encontradas nos hospedeiros naturais. Castilho *et al.* (1987) encontraram valores elevados de viabilidade total (ovo-adulto) e duração de ciclo de 8 dias em condições de laboratório, coincidindo com os valores obtidos neste trabalho; entretanto, quando os insetos foram liberados em campo buscando-se o controle da broca-da-cana-de-açúcar, não houve recuperação deste ectoparasitóide. Provavelmente, isso tenha ocorrido devido à diferença no habitat e pelo hábito alimentar da referida broca, uma vez que *B. hebetor* ocorre principalmente em armazéns, como

agente controlador de pragas dos grãos armazenados (Keever *et al.*, 1985; 1986).

A qualidade do inseto produzido em laboratório é de fundamental importância para programas de controle biológico, uma vez que espera-se a produção de insetos semelhantes àqueles obtidos na natureza. Dessa forma, além dos parâmetros da criação de *B. hebetor*, somaram-se, para análise, os valores do desempenho dos insetos produzidos (capacidade de paralisação e parasitismo) e foi obtido um novo agrupamento de hospedeiros, desta vez descartando-se as lagartas de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*, uma vez que tais hospedeiros não proporcionaram bom desenvolvimento do ectoparasitóide.

Dessa forma, pela análise verificou-se um agrupamento, com 82% de acerto, das traças *A. kuehniella* e *C. cephalonica*, sendo estes os hospedeiros que deram origem aos insetos com maior proximidade de duração das fases, viabilidade e padrões de agressividade. Os demais hospedeiros uniram-se depois, mas com baixa confiabilidade (inferiores a 70%) (Figura 6a). Pela análise de componentes principais (Figura 6b) confirma-se esta hipótese, agrupando-se as referidas traças, sendo que o fator que mais influenciou (com 56,18%) foi a capacidade de parasitismo, através do eixo x.

S. cerealella, embora seja hospedeiro e tenha proporcionado elevada viabilidade total e insetos que paralisaram e parasitaram com a mesma eficiência daqueles insetos criados sobre *C. cephalonica*, permaneceu destacado neste grupo, pois os insetos criados sobre ela apresentaram duração de ciclo menor, provavelmente pelo diminuto tamanho do hospedeiro.

Poderia discutir-se ter havido um condicionamento pré-imaginal dos parasitóides, pois todo o processo de criação e manutenção da colônia foi em lagartas de *A. kuehniella* e isso pode explicar o bom desempenho de *B. hebetor* sobre este hospedeiro; entretanto, os bons resultados de parasitismo registrados para as outras espécies de traças, diminuem a importância desta hipótese.

Em termos gerais, os insetos que se mostraram adequados para a criação de *B. hebetor* foram *A. kuehniella* e *C. cephalonica*. Além do valor nutricional dos mesmos, outros fatores como hábito alimentar e local de ataque, tamanho, características comportamentais e até filogenia poderiam explicar tais diferenças no desenvolvimento biológico de *B. hebetor*. Em trabalhos de produção 'in vitro' deste ectoparasitóide, que serão baseados nesta pesquisa, há necessidade de hemolinfa ou holotécidos pupais; neste caso o tamanho do inseto, para se conseguir uma quantidade adequada destes componentes, é de grande importância. Assim, *D. saccharalis* poderá ser utilizada, pelos resultados obtidos na presente pesquisa e pelo seu maior tamanho em relação às traças dos cereais, bem como pelo fato de já ter se conseguido bons resultados com seus holotécidos pupais e hemolinfa para criação de espécies de *Trichogramma* "in vitro" (Cônsoli, 1997; Cônsoli & Parra, 1996; Cônsoli & Parra, 1997b); e por já ter proporcionado desenvolvimento deste ectoparasitóide em trabalho preliminar realizado por Magro *et al.* (1998).

Figura 5. Fenograma UPGMA por Distância Euclidiana Média (A) e distribuição tridimensional dos hospedeiros pela análise de componentes principais (B) para avaliação do efeito do hospedeiro no desenvolvimento (duração e viabilidade das fases, formação de casulo e deformação de pupas e/ou adultos) de *Bracon hebetor*. Hospedeiros: 1 *A. kuehniella*; 2 *A. gemmatalis*; 3 *D. saccharalis*; 4 *C. cephalonica*; 5 *S. frugiperda*; 6 *S. cerealella*; 7 *H. virescens*. (CCC=0,944 e C=0,333 para o gráfico A).

Figura 6. Fenograma UPGMA por Distância Euclidiana Média (A) e distribuição tridimensional dos hospedeiros pela análise de componentes principais (B) para avaliação do efeito do hospedeiro no desenvolvimento e no parasitismo de *Bracon hebetor*. Hospedeiros: 1 *A. kuehniella*; 3 *D. saccharalis*; 4 *C. cephalonica*; 6 *S. cerealella*; 7 *H. virescens*. (CCC=0,903 e C=1,0 para o gráfico A).

4.3 Avaliação das dietas artificiais para a criação de *B. hebetor*

O desenvolvimento pré-imaginal de *B. hebetor* foi influenciado pela dieta utilizada, nas diferentes fases de desenvolvimento. De modo geral, as dietas que continham em sua formulação suspensão de holotécidos pupais (HTP) de *A. kuehniella* (dietas 4, 5 e 6) levaram a um desenvolvimento mais longo das fases imaturas, com duração de aproximadamente 17 dias para o ciclo total (ovo-adulto), valor significativamente superior ao obtido quando os parasitóides foram criados sobre o hospedeiro natural, *A. kuehniella* (15,5 dias) (Tabela 6). Valores intermediários foram observados nas dietas 7 e 3 (que tinham em comum holotécidos pupais de *D. saccharalis* e gema de ovo), sendo que estes não diferiram dos valores obtidos sobre o hospedeiro natural. As dietas 1 e 2, que continham em sua formulação suspensão de holotécidos pupais de *D. saccharalis* nas proporções de 60 e 50%, respectivamente, proporcionaram duração do ciclo total dos parasitóides, semelhante àqueles criados sobre *A. kuehniella* (Tabela 6). Guerra (1992) também verificou que houve diferença na duração do ciclo de *Catolaccus grandis* Burks e *Bracon mellitor* Say criados “*in vitro*” quando utilizou hemolinhas de diferentes insetos como componente principal da dieta, sendo que o tempo de desenvolvimento variou, dependente do hospedeiro utilizado, entre 11 e 12,5 dias para estes braconídeos.

Não houve variação na duração do período de incubação de *B. hebetor* para os diferentes tratamentos, sendo este valor próximo a um dia e meio (Tabela 6).

A duração da fase larval foi a mais afetada pelos diferentes alimentos. Valores de duração desta fase, observados nos diferentes meios, foram sempre numericamente superiores àquele obtido sobre o hospedeiro natural. As dietas 2, 4, 5, 6 e 7 apresentaram duração da fase larval superior a 7 dias comparados aos 5,8 dias obtidos sobre hospedeiro natural, que foi

significativamente inferior. As dietas 1 (60% de HTP de *D. saccharalis*) e 3 (50% de HTP de *D. saccharalis* acrescida de mais uma fonte de proteína - extrato de levedura) foram semelhantes estatisticamente ao hospedeiro *A. kuehniella*.

Por outro lado, a duração da fase pupal foi pouco influenciada pelas dietas; houve até um alongamento desta fase na dieta natural, embora diferindo apenas da dieta 2 (HTP de *D. saccharalis*) (Tabela 6).

Com estes dados verifica-se que as dietas que apresentaram em sua composição holotécidos pupais de *D. saccharalis*, nas diferentes concentrações (dietas 1, 2, 3 e 7), proporcionaram uma duração de ciclo total (ovo-adulto) semelhante àquela verificada nos insetos desenvolvidos sobre o hospedeiro natural (*A. kuehniella*) (Tabela 6). Contudo, dessas quatro, as dietas 1 e 3 foram as que se destacaram por não apresentarem diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados relativos à duração do ciclo, quando comparadas aos insetos criados sobre *A. kuehniella*.

Todas as dietas apresentaram características nutricionais que proporcionaram o desenvolvimento total do parasitóide, em maior ou menor escala, sugerindo a potencialidade de criação deste inseto sobre meios sintéticos e mostraram que o sistema utilizado apresentou-se adequado, possibilitando às larvas a aquisição do alimento e posteriormente desenvolvimento até a fase adulta.

A quantidade de dieta oferecida aos parasitóides (150 μ l / 20 ovos) foi suficiente para o desenvolvimento de até 14 insetos (número máximo obtido por repetição), tendo havido ainda sobra de alimento.

A viabilidade dos ovos foi maior no hospedeiro natural. Isto é facilmente explicado, pois nos testes das dietas, os ovos foram transferidos para as placas com o auxílio de um pincel, e este procedimento pode ter danificado o córion de alguns, inviabilizando-os. Maiores prejuízos ocorreram nas dietas 5 e 6 com 56 e 64% de viabilidade de ovos, respectivamente (Tabela 7); as demais dietas apresentaram variação entre 66 e 78% para tal viabilidade e não diferiram daquele valor obtido sobre *A. kuehniella* (88%).

Tabela 6. Duração de fases e total (ovo-adulto) de *Bracon hebetor* criado sobre sete dietas artificiais e sobre *A. kuehniella*. Temperatura: $25^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C; Umidade relativa: $60\% \pm 10\%$ e 14 horas de fotofase.

Tratamentos	Duração das fases (dias)			
	Ovo	Larva	Pupa	Ciclo total
Dieta 1 (Ds)	$1,58 \pm 0,121$ a	$6,27 \pm 0,231$ bc	$7,46 \pm 0,206$ ab	$15,30 \pm 0,200$ c
Dieta 2 (Ds)	$1,30 \pm 0,122$ a	$7,11 \pm 0,323$ ab	$7,04 \pm 0,088$ b	$15,45 \pm 0,244$ c
Dieta 3 (Ds)	$1,61 \pm 0,149$ a	$6,81 \pm 0,165$ abc	$7,88 \pm 0,220$ ab	$16,30 \pm 0,371$ abc
Dieta 4 (Ak)	$1,79 \pm 0,096$ a	$7,56 \pm 0,208$ a	$7,65 \pm 0,242$ ab	$17,00 \pm 0,129$ a
Dieta 5 (Ak)	$1,75 \pm 0,147$ a	$7,62 \pm 0,197$ a	$7,65 \pm 0,187$ ab	$17,02 \pm 0,327$ a
Dieta 6 (Ak)	$1,76 \pm 0,080$ a	$7,43 \pm 0,137$ a	$8,05 \pm 0,354$ ab	$17,24 \pm 0,261$ a
Dieta 7 (Ds)	$1,64 \pm 0,107$ a	$7,41 \pm 0,161$ a	$7,60 \pm 0,235$ ab	$16,66 \pm 0,209$ ab
<i>A. kuehniella</i>	$1,58 \pm 0,133$ a	$5,84 \pm 0,350$ c	$8,18 \pm 0,138$ a	$15,59 \pm 0,221$ bc

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.
(Ds ou Ak – representam dietas à base de holotécidos pupais de *D. saccharalis* e *A. kuehniella*, respectivamente)

Tabela 7. Viabilidade de fases e do ciclo total (ovo-adulto) de *Bracon hebetor* criado sobre sete dietas artificiais e sobre *A. kuehniella* como hospedeiro natural. Temperatura: 25° ± 2° C; Umidade relativa: 60%± 10% e 14 horas de fotofase.

Tratamentos	Viabilidade (%)			
	Ovo	Larva	Pupa	Ciclo total
Dieta 1 (Ds)	73,00 ± 4,64 ab	50,63 ± 8,81 bc	100,00 ± 0,00 a	36,00 ± 6,00 bc
Dieta 2 (Ds)	66,00 ± 5,34 ab	26,69 ± 5,46 c	100,00 ± 0,00a	17,00 ± 3,39 cd
Dieta 3 (Ds)	75,20 ± 7,48 ab	36,03 ± 5,03 bc	100,00 ± 0,00a	27,00 ± 4,64 bcd
Dieta 4 (Ak)	78,00 ± 4,06 ab	33,89 ± 4,61 bc	91,66 ± 5,27 a	24,42 ± 3,74 bcd
Dieta 5 (Ak)	56,00 ± 8,57 b	34,21 ± 1,62 bc	95,00 ± 5,00 a	18,25 ± 3,25 cd
Dieta 6 (Ak)	64,00 ± 4,85 b	23,53 ± 6,84 c	96,67 ± 3,33 a	13,17 ± 2,15 cd
Dieta 7 (Ds)	76,00 ± 6,96 ab	59,13 ± 7,35 b	98,57 ± 1,43 a	43,07 ± 4,70 b
<i>A. kuehniella</i>	88,00 ± 5,83 a	92,25 ± 4,75 a	91,25 ± 3,91 a	74,01 ± 6,89 a

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.
(Ds ou Ak – representam dietas à base de holotécidos pupais de *D. saccharalis* e *A. kuehniella*, respectivamente)

A viabilidade larval foi significativamente diferente entre os tratamentos. Todas as dietas proporcionaram valores de viabilidade inferiores àquela obtida no hospedeiro natural (92%) (Tabela 7). As maiores viabilidades foram obtidas nos meios artificiais 7 e 1, com 59 e 50% de viabilidade larval, respectivamente. Estes valores foram estatisticamente iguais aos obtidos nas dietas 3, 4 e 5, que apresentaram viabilidade em torno de 30%. Embora não tenha havido diferença estatística entre estes valores, as dietas 7 e 1 indicam, numericamente, maior adequação nutricional para o desenvolvimento deste ectoparasitóide.

A viabilidade pupal foi alta em todos os tratamentos, não havendo diferença entre eles; entretanto, a viabilidade do ciclo total foi variável, dependendo do substrato de criação. Indubitavelmente, a maior viabilidade ocorreu sobre o hospedeiro natural (74%), valor este próximo ao verificado por Serra (1992), que encontrou uma viabilidade total, para *B. hebetor* sobre *A. kuehniella*, de 60,1%. Dentre as dietas, a de número 7 superou numericamente as demais, com 43% de viabilidade total, embora sem diferir significativamente daqueles observados sobre as dietas 1, 3 e 4, que proporcionaram 36, 27 e 24% de viabilidade, respectivamente. As dietas 2, 5 e 6 foram estatisticamente menos viáveis de que a 7, mas semelhantes a 1, com índices inferiores a 20%.

Há necessidade de adaptações e aperfeiçoamentos, visando melhorar este sistema de criação, especialmente no que diz respeito à transferência de ovos do parasitóide, pois a inviabilidade dos ovos, comprovadamente ocasionada pelo manuseio, foi um dos grandes responsáveis pela baixa viabilidade total.

Um outro parâmetro utilizado em busca de uma dieta com características nutricionais adequadas para a criação de *B. hebetor* foi a formação de casulo protetivo. Apenas cerca de 2% das pupas oriundas de larvas que se desenvolveram sobre o hospedeiro natural não formaram casulo (Figuras 7, 8 e 9). O mesmo não ocorreu nos insetos criados nas dietas artificiais, pois foram encontrados nas dietas 1 e 3, 20 e 30% de pupas sem

casulo, respectivamente. Nas demais dietas, foram registrados de 60 a 70% de pupas sem casulo, valores significativamente superiores aos encontrados para insetos criados sobre *A. kuehniella*.

Mais uma vez verifica-se a superioridade da dieta 1 em relação às demais, pois esta além de proporcionar uma duração de ciclo do parasitóide semelhante àquela verificada sobre o hospedeiro natural (Tabela 6) e também uma alta viabilidade (Tabela 7), levou ao desenvolvimento de maior número de pupas com casulo (apenas 20% sem produção de seda) (Figura 7), sendo dentre as dietas aquela que mais se aproximou do hospedeiro natural.

Figura 7. Médias de pupas de *Bracon hebetor*, que não formaram casulo quando criadas em diferentes dietas artificiais e sobre *A. kuehniella* (hospedeiro). Letras iguais nas colunas indicam que não houve diferença significativa, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Médias transformadas em $\arcsen \sqrt{(x + \alpha)/100}$. (Ds ou Ak – representam dietas à base de holotecidos pupais de *D. saccharalis* e *A. kuehniella*, respectivamente)

Figura 8. Desenvolvimento de *Bracon hebetor* sobre o hospedeiro natural, *A. kuehniella*. Detalhe em A- ovos de *B. hebetor*; B- formação de casulo (larvas com 96-100 horas); C- casulo e mecônio; D- adultos (aumento 10X).

Figura 9. Desenvolvimento de *Bracon hebetor* sobre a dieta artificial. Detalhe em A- ovos sobre a dieta; B- larvas em 'início' da formação do casulo (120-124 horas); C- pupas sem casulo (aumento 21X) (m-mecônio) e D- adultos (aumento 11X).

A ausência de casulo protetivo, para parasitóides criados em dieta artificial também foi relatada por Guerra (1992) para *B. mellitor* Say. Este autor verificou que aproximadamente 65% das pupas não formaram casulo. Entretanto, naquele caso, esta forma atípica de pupação não afetou a sobrevivência pupal ou a emergência dos adultos.

Prudhomme *et al.* (1985) descreveram que a alimentação por um certo período obrigatório em cada ínstar é fundamental para sobrevivência e ecdise bem sucedida; a falta de alimento reduziu o peso do corpo de *B. mori* e também afetou drasticamente a glândula de seda. A falta de alimento durante os períodos de alimentação apresenta efeito similar; contudo, esses processos são reversíveis e a produção de seda é retomada quando as larvas são realimentadas; aquelas que ficam sem se alimentar produzem casulos pouco fibrosos, utilizando apenas a seda que havia sido depositada antes do período de inanição (Sehnal & Akai, 1990). Os mesmos autores relataram que em condições semelhantes, o conteúdo das glândulas de seda de *Galleria mellonella* L. foi, provavelmente, utilizado como nutriente, uma vez que o peso da glândula foi reduzido e a seda gradativamente exaurida.

Pelas análises em microscopia óptica, não foi observada diferença na morfologia externa das glândulas salivares dos insetos criados “*in vivo*” e “*in vitro*”. De modo geral, pode-se dizer que cada inseto possui um par de glândulas localizadas lateralmente ao corpo do inseto, cada uma apresenta uma bifurcação, dando origem a dois ‘braços’, e, delas, podem se distinguir apenas duas regiões: um ducto comum (onde haveria a junção do par de glândulas) e uma região secretora (Figura 10). Há necessidade de um estudo aprofundado, através de análise de ultraestrutura da glândula para caracterização das regiões e de suas funções.

A quantificação de proteína (Bradford, 1976) das amostras de glândulas dos insetos que se alimentaram sobre o hospedeiro natural (*A. kuehniella*) e aqueles que se alimentaram na dieta 7, indicou que houve mais proteína no primeiro caso, sendo encontrados 3,196 microgramas de proteína

por microlitro de amostra, comparados aos 0,849 microgramas observados nas glândulas coletadas dos insetos criados sobre a dieta 7 (a repetição desta análise confirmou estes dados – dados não mostrados). A separação das proteínas por eletroforese indicou que, aparentemente, não houve diferença qualitativa entre as amostras (bandas próximas a 30 kilodaltons). Porém, há um indício de que as glândulas dos insetos criados sobre a dieta artificial continham menor quantidade de proteínas, evidenciada pela menor intensidade de coloração dessas bandas.

Este trabalho sugere que possivelmente haja diferença na concentração de proteína, do conteúdo das glândulas dos insetos criados sobre a traça (hospedeiro natural) e sobre dieta artificial; entretanto, este estudo deve ainda ser aprimorado. Inicialmente, deverá ser aumentado o gradiente do gel de poliacrilamida de 10 a 17%, pois assim se fará possível uma melhor visualização e caracterização das bandas e, conseqüentemente, maior precisão nas semelhanças e diferenças dos conteúdos das amostras. Outra análise que complementaria este trabalho seria o seqüenciamento da proteína obtida na banda, possibilitando, com uma margem pequena de erro, o reconhecimento da proteína componente da seda desse braconídeo.

4.3.1 Capacidade de paralisação e parasitismo por *Bracon hebetor* criado nas diferentes dietas e sobre o hospedeiro natural *A. kuehniella* (teste de agressividade)

A capacidade de paralisação foi semelhante para praticamente todos os tratamentos, exceto para os insetos criados na dieta 3, na qual *B. hebetor* paralisou menos de 50% dos hospedeiros. As demais dietas apresentaram porcentagens de paralisação semelhantes àsquelas observadas nos insetos criados sobre hospedeiro natural (75%), sendo que os parasitóides criados sobre a dieta 7 foram aqueles com valor numérico mais próximo do valor obtido em *A. kuehniella* (Tabela 8).

Figura 10. Glândula salivar de *Bracon hebetor* (dc- ducto comum; b- bifurcação e rg- região secretora). Aumento 46X.

Tabela 8. Capacidade de paralisação e de parasitismo, durante 72 horas, de *Bracon hebetor* criado sobre sete dietas artificiais e hospedeiro natural (*A. kuehniella*). Temperatura: $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, Umidade relativa: $60\pm 10\%$ e de 14 horas de fotofase.

Tratamentos	Porcentagem (média)	
	Paralisação	Parasitismo ¹
<i>A. kuehniella</i>	$75,10 \pm 3,6$ a	$22,86 \pm 2,9$ a
Dieta 7 (Ds)	$71,49 \pm 8,6$ ab	$13,28 \pm 3,2$ ab
Dieta 6 (Ak)	$67,13 \pm 6,1$ ab	$12,11 \pm 1,7$ ab
Dieta 5 (Ak)	$66,13 \pm 3,8$ ab	$9,86 \pm 1,0$ b
Dieta 1 (Ds)	$60,72 \pm 4,4$ ab	$5,8 \pm 8,9$ bc
Dieta 4 (Ak)	$55,81 \pm 4,3$ ab	$5,16 \pm 1,3$ bc
Dieta 2 (Ds)	$54,46 \pm 6,2$ ab	$3,89 \pm 1,3$ c
Dieta 3 (Ds)	$48,68 \pm 8,7$ b	$11,18 \pm 1,7$ ab

¹ Porcentagem de parasitismo sobre o número total de lagartas oferecidas; Colunas seguidas por letras iguais não diferem entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.
(Ds ou Ak – representam dietas à base de holotécidos pupais de *D. saccharalis* e *A. kuehniella*, respectivamente)

A dieta 1 que se destacou por apresentar ciclo biológico do parasitóide com valores próximos àqueles obtidos quando o inseto foi criado sobre o hospedeiro natural, elevada viabilidade e baixa proporção de indivíduos sem formação de casulo, apresentou ainda alta capacidade de paralisação (Tabela 8), apresentando-se como bom substrato para desenvolvimento deste ectoparasitóide, tendo, como único aspecto negativo proporcionar baixo percentual de parasitismo; as dieta 7 e 6 também apresentaram índice elevados de paralisação e parasitismo, comparáveis aos verificados quando o inseto foi criado na dieta 1 e sobre *A. kuehniella* (hospedeiro natural).

Embora na dieta 3 tenha havido baixa paralisação de lagartas, esse valor foi revertido quando se verificou a porcentagem total de lagartas parasitadas (11%), tornando-se estatisticamente igual aos insetos criados sobre o hospedeiro natural. Adultos oriundos da dieta 2 apresentaram a menor capacidade de parasitismo, inferior estatisticamente àqueles criados sobre as dietas 1 e 7 e sobre o hospedeiro natural.

Segundo Morrill (1942) as fêmeas de *B. hebetor* começam a introduzir o ovipositor em lagartas hospedeiras logo após a sua emergência, com o objetivo de paralisá-las, antes de iniciarem a oviposição. Este procedimento possibilita ao parasitóide alimentar-se da hemolinfa que exsuda do corpo do hospedeiro, resultando na sua paralisação motora e, conseqüentemente, facilitando a oviposição (Beard, 1972); a morte do hospedeiro, contudo, demora a acontecer. Doult (1959) verificou que as fêmeas desse parasitóide, antes de ovipositarem, procuram paralisar todos os hospedeiros que houver na proximidade. Segundo Soliman¹¹ (1940), citado por Serra (1992), o número de indivíduos que uma fêmea paralisa em 24 horas varia em função da temperatura e do hospedeiro; para cada 20 lagartas de *A. kuehniella* oferecidas por fêmea, em média foram paralisadas 7, 9 e 14 lagartas respectivamente para as temperaturas de 20, 24 e 32°C. Aparentemente, as dietas artificiais não afetaram esse comportamento biológico de *B. hebetor*.

A razão sexual observada para os insetos provenientes das dietas de 1 a 7 e para o hospedeiro natural foram de 0,54; 0,69; 0,33; 0,70; 0,76; 0,65; 0,52 e 0,68, respectivamente, sendo que apenas o valor obtido na dieta 3 diferiu do esperado pelo teste de X^2 (corrigido de Yates), ao nível de 5% de probabilidade e 1 GL. Exceto por este valor, os demais correspondem àqueles observados por Serra (1992).

¹¹ SOLINAN, H. S. Studies in the biology of *Microbracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae). *Bulletin de la Société Fouad I^{er} d'Entomologie*, Le Caire, 24: 215-247, 1940.

4.3.2. Qualidade dos insetos produzidos “*in vivo*” e “*in vitro*” (teste de longevidade e fecundidade).

Em geral, as fêmeas de *B. hebetor* foram mais longevas do que os machos. A longevidade de machos de *B. hebetor* foi, em média, de 8 dias quando criados sobre o hospedeiro natural (*A. kuehniella*); este valor foi estatisticamente superior aos obtidos quando os parasitóides foram criados sobre as diversas dietas artificiais. Machos oriundos das diferentes dietas apresentaram longevidades variáveis entre 4 e 6 dias. No entanto, as fêmeas do parasitóide criadas sobre as dietas foram tão longevas quanto aquelas criadas sobre o hospedeiro natural, que proporcionou uma longevidade média de 39 dias (Figura 11). Houve, todavia, uma grande variação na duração do período de vida adulta das fêmeas quando compararam-se os tratamentos. Valores em torno de 30 dias foram observados nos insetos provenientes das dietas 2, 7, 5, 4 e 6 sendo observado um valor próximo a 35 dias para a dieta 3 e de aproximadamente 40 dias para a dieta 1; este valor foi o mais próximo, em termos numéricos, àqueles observados quando os parasitóides foram criados sobre a traça, *A. kuehniella*. Nikan & Pawar (1993) verificaram que a longevidade deste ectoparasitóide, quando criado sobre seu hospedeiro natural foi de 37,5 dias para as fêmeas e o período de oviposição de aproximadamente 34 dias, dados coincidentes àqueles observados na presente pesquisa. A longevidade das fêmeas, segundo os resultados obtidos por Serra (1992) foi de cerca de 19 dias, valor inferior ao verificado no presente estudo.

Figura 11. Valores médios de longevidade para adultos de *Bracon hebetor* criados sobre *A. kuehniella* (hospedeiro) e sete dietas artificiais. Temperatura: $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, Umidade relativa: $60\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. (Colunas de mesma cor, seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade). (Ds ou Ak – representam dietas à base de holotécidos pupais de *D. saccharalis* e *A. kuehniella*, respectivamente)

A oviposição de *B. hebetor* foi distribuída durante toda a vida das fêmeas (Figura 12), tendo havido correlação negativa, para todos os tratamentos, entre número de ovos colocados por dia e a idade das fêmeas. Os valores variaram de $-0,40$ a $-0,79$ (exceto para a dieta 4), indicando que quanto mais velhas as fêmeas, menor é o número de ovos por elas colocados.

Figura 12. Ritmo de postura de *Bracon hebetor* quando criado sobre *A. kuehniella* (hospedeiro) e em sete dietas artificiais. Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$, Umidade relativa: $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. (Ds ou Ak – representam dietas à base de holotécidos pupais de *D. saccharalis* e *A. kuehniella*, respectivamente).

O número total médio de ovos colocados pelas fêmeas, durante toda a vida, foi 506, 576, 414, 489, 514, 393, 429 e 408 para insetos criados sobre o hospedeiro natural (*A. kuehniella*) e dietas de 1 a 7, respectivamente. Estes valores são superiores àqueles observados por Serra (1992) que registrou uma média de 231 ovos por fêmea, com uma variação de 6 a 631 ovos, também em *A. kuehniella*.

Os valores de longevidade (fêmeas), parasitismo, ritmo de postura e número total de ovos depositados demonstram a potencialidade da criação '*in vitro*' deste ectoparasitóide, bem como salientam que, para a primeira geração criada sobre o substrato artificial, a não formação de casulo não afetou a performance dos adultos. Há possibilidade, no entanto, que pela criação sucessiva sobre meios sintéticos, possa ocorrer alguma deficiência nutricional, especialmente protéica, uma vez que conhece-se que a seda é formada de proteína (Craig, 1997).

Pôde-se constatar também que a progênie (geração F1) foi igualmente viável para todos os tratamentos testados, apresentando viabilidades de ciclo total (ovo-adulto) em torno de 80% (Figura 13). Entretanto, apesar da grande quantidade de ovos do parasitóide colocados sobre *A. kuehniella* quando criado sobre os diferentes tratamentos e da alta viabilidade de F1, constatou-se neste experimento que, após aproximadamente o 30º dia de vida adulta da geração maternal (criadas sobre as dietas e sobre o hospedeiro natural), a razão sexual da F1 caiu a zero (Figura 14), indicando que houve colocação de ovos não fecundados, que originaram apenas machos. Pelo acompanhamento dos casais, sabe-se que as fêmeas foram copuladas, pois comprovadamente as primeiras posturas originaram machos e fêmeas. Considera-se, neste caso, a possibilidade de, pelo fato dos machos terem longevidade menor (morreram antes), houve esgotamento dos espermatozóides e então as fêmeas passaram a depositar ovos haplóides, dando origem apenas a machos, pois este inseto apresenta partenogênese arrenótoca. Calculando-se a razão sexual da primeira geração, considerando-se apenas os indivíduos

desenvolvidos e emergidos até o trigésimo dia, ela foi de 0,47 e 0,44 para os insetos criados sobre o hospedeiro natural e dieta (média das dietas 1 e 7), respectivamente. Considerando-se o período total de vida e colocação total de ovos, estes valores caíram respectivamente para 0,28 e 0,31. Estes valores foram substancialmente menores aos verificados por Serra (1992), que constatou uma razão sexual de 0,70 para este ectoparasitóide criado sobre *A. kuehniella*; entretanto, Nikam & Pawar (1993) verificaram razão sexual semelhante à do presente trabalho, com um valor de 0,34.

Figura 13. Viabilidade média do ciclo total da progênie (F1) dos insetos criados sobre as sete dietas artificiais, comparada aos criados sobre o hospedeiro natural (*A. kuehniella*). Temperatura: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, Umidade relativa: $60\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. (Colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade). (Ds ou Ak – representam dietas à base de holotécidos pupais de *D. saccharalis* e *A. kuehniella*, respectivamente)

A queda na razão sexual da progênie de parasitóides de ovos após longa duração de vida adulta também foi observada por Corrêa Ferreira & Zamataro (1989), que verificaram que a produção de machos de *Trissolcus basalis* (Woll.) foi superior para fêmeas mais velhas. Em parasitóides do gênero *Bracon*, espécie próxima a *hebetor*, ovos não fertilizados desenvolveram machos haplóides, mas ovos fertilizados, e portanto diplóides, podem dar origem a machos e fêmeas (Holloway *et al.*, 1999). Ode *et al.* (1997) verificaram o efeito da produção de apenas machos por fêmeas de *B. hebetor* não acasaladas ou daquelas em que foram removidos os espermatozóides.

Figura 14. Influência da idade das fêmeas de *Bracon hebetor* criadas em *A. kuehniella* (hospedeiro) e duas dietas artificiais (1 e 7), na razão sexual (valores médios) da primeira geração. Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$, Umidade relativa: $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

Pela análise de agrupamento, constatou-se similaridade entre as dietas 4 e 5, com 72% de aproximação, e da dieta 1 com o hospedeiro natural, a uma probabilidade de 65% de acerto. As demais encontram-se, em diferentes níveis associadas a um ou outro grupo (Figura 15).

Figura 15. Fenograma obtido da análise de agrupamento para sete dietas e hospedeiro natural testados para *Bracon hebetor*. Fenograma UPGMA por Distância Euclidiana Média. Grau de correlação fenética (CCC): 0,847; Grau de Encadramento (C): 0,667; P(35%) = 0,577. (números de 1 a 7 correspondem às dietas; 8 corresponde ao hospedeiro natural, *A. kuehniella*)

Pelos resultados já discutidos observa-se que a dieta 1, a mais adequada também para a criação “*in vitro*” de *Trichogramma pretiosum* Riley e *T. galloi* Zucchi (Cônsoli & Parra, 1997b), foi a dieta que proporcionou condições mais próximas àquelas do hospedeiro natural para a criação de *B. hebetor*.

As dietas 4 e 5 apresentaram elevada proximidade e formaram um grupo bem distinto do descrito anteriormente, sendo, entretanto, menos apropriadas para o desenvolvimento deste ectoparasitóide, provavelmente pela baixa viabilidade encontradas e elevada porcentagem de pupas sem casulo. A este grupo junta-se, com um grau menor de acerto, a dieta 6, sendo demonstrado que holotecidos pupais de *A. kuehniella*, nas diferentes concentrações, foram menos favoráveis ao desenvolvimento de *B. hebetor* do que o de *D. saccharalis* numa concentração de 60% (dieta 1).

A análise de Componentes Principais (Análise de Moure) proporcionou a identificação dos caracteres que mais influenciaram na formação dos agrupamentos. A significância desta análise foi superior a 70%, considerando-se os eixos X, Y e Z (Figura 16).

A viabilidade larval foi o componente que mais influenciou a distribuição das dietas em grupos distintos através dos eixos X, com aproximadamente 40% de acerto. Dessa forma comprova-se a aproximação da dieta 1 e 7 com o hospedeiro natural. Este mesmo componente agrupa as dietas 3 e 2 com baixa viabilidade, que demonstraram proximidade estatística (Tabela 7). Embora a dieta 7 tenha demonstrado altos índices de viabilidade (semelhante estatisticamente à dieta 1), se distingue do grupo hospedeiro/dieta 1 pois apresentou elevada duração do ciclo (elemento de agrupamento para o eixo Z) influenciando com cerca de 16% na distribuição dos agrupamentos. O terceiro componente que influenciou, com aproximadamente 18%, foi a capacidade de paralisação (eixo Y). Neste caso a dieta 1 colocou-se em quadrante distinto da dieta 7 e do hospedeiro natural; entretanto, observando-se as análises estatísticas apresentadas anteriormente (Tabela 8) pôde-se

constatar que não houve diferença significativa entre os valores obtidos nesta dieta (1) e aqueles observados nos insetos originários do hospedeiro natural e da dieta 7.

Com isso, concluí-se que a dieta 1, considerando-se os parâmetros biológicos: duração do ciclo, viabilidade larval e pupal, longevidade das fêmeas, fecundidade e agressividade, é, dentre as dietas testadas, a mais adequada para a criação de *B. hebetor*.

Figura 16. Distribuição tridimensional das dietas e hospedeiro natural pela análise de componentes principais, para avaliação do comportamento de diferentes dietas no desenvolvimento de *Bracon hebetor* (números de 1 a 7 correspondem às dietas; 8 corresponde ao hospedeiro natural, *A. kuehniella*)

4. CONCLUSÕES

1. Independente do hospedeiro de criação “*in vivo*” de *Bracon hebetor* Say, 1857, há correlação positiva entre paralisação e parasitismo;
2. Dentre as espécies não hospedeiras, *B. hebetor* tem preferência por parasitar lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794);
3. O parasitismo pode ser maior no terceiro, quarto ou quinto ínstaes, dependendo da espécie hospedeira e do porte da lagarta;
4. O desenvolvimento biológico (duração e viabilidade) de *B. hebetor* é influenciado pela qualidade do hospedeiro;
5. Lagartas de *D. saccharalis* proporcionam viabilidade total do parasitóide semelhante àsquelas obtidas nos hospedeiros naturais;
6. *B. hebetor* criado sobre *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) apresenta de 7 a 9% de deformação de pupas e/ou adultos;
7. A formação de casulos protetivos de pupas de *B. hebetor* é um indicativo da adequação nutricional do hospedeiro de criação deste ectoparasitóide;
8. Baixo percentual de não formação de casulos em pupas é verificado quando o parasitóide é criado sobre os hospedeiros naturais (traças) e sobre *D. saccharalis*;
9. Dentre os hospedeiros alternativos, *D. saccharalis* é o mais adequado, produzindo insetos aptos a paralisar e parasitar lagartas de 5º ínstar de

Anagasta kuehniella (Zeller, 1879), sendo comparável às traças *Sitotroga cerealella* (Olivier, 1819) e *Corcyra cephalonica* (Stainton, 1865), hospedeiros naturais de parasitóide;

10. *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781) é um hospedeiro inadequado para *B. hebetor*;
11. *A. kuehniella* e *C. cephalonica* são hospedeiros similares para a criação de *B. hebetor* “*in vivo*”;
12. É possível criar *B. hebetor* em dieta artificial (“*in vitro*”);
13. Holotecidos pupais de *D. saccharalis* são mais adequados para a criação de *B. hebetor* “*in vitro*”, em relação a *A. kuehniella* (hospedeiro natural);
14. Insetos criados sobre dietas artificiais apresentam elevada porcentagem de pupas sem casulo;
15. Não há diferença na morfologia externa das glândulas salivares de insetos criados “*in vivo*” ou “*in vitro*”, diferindo, no entanto, sob o ponto de vista protéico;
16. Insetos criados “*in vitro*” são aptos à paralisação e ao parasitismo numa proporção menor, comparado àqueles criados “*in vivo*”;
17. Fêmeas criadas “*in vitro*” são tão longevas quanto aquelas criadas “*in vivo*”;
18. A melhor dieta para a criação de *B. hebetor* contém 60% de holotecidos pupais de *D. saccharalis*, 12% de soro fetal bovino, 12% de hidrolisado de lactoalbumina, 16% de gema de ovo e anticontaminantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, M.S.H.; AL-MALIKY, S.K.; AL-TAWELL, A.A.; JABO, N.F.; AL-HAKKAK, Z.S. Effects of three temperature regimes on rearing and biological activities of *Bracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae). **Journal Stored Product Research**, v.21, n.2, p. 65-68, 1985.
- BEARD, R.L. Effectiveness of paralyzing venom and its relation to host discrimination by braconid wasps. **Annals of the Entomological Society of America**. V.65, n.1, p.90-93, 1972.
- BERNARDI, E.B; HADDAD, M.L.; PARRA, J.R.P. Comparison of artificial diets for rearing *Corcyra cephalonica* (Stainton, 1865) (Lepidoptera: Pyralidae) for *Trichogramma* mass production. **Revista Brasileira de Biologia**, v.60, n.1, p. 45-52, 2000.
- BLEICHER, E.; STEIN, C.P.; PARRA, J.R.P.; RODRIGUEZ FILHO, I.L. Método modificado de criação de *Sitotroga cerealella* (Oliv., 1819) (Lep.: Gelechiidae) para estudos com *Trichogramma*. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.16, n.2, p. 447-451, 1987.
- BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-154, 1976.

- BROWER, J. H.; PRESS, J. W. Interaction of *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in suppressing stored-product moth populations in small inshell peanut storages. **Journal of Economic Entomology**, v.83, n.3, p. 1096-1101, 1990.
- CASTILHO, H.J.; BOTELHO, P.S.M.; ALMEIDA, L.C.; ARAÚJO, J.R. Testes com *Habobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) para o controle biológico da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (F.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 11. Campinas, 1987. **Resumos**. Campinas: SEB, 1987. v. 1, p. 204.
- CHAPMAN, R.F. **The Insects, structure and function**. New York: American Elsevier, 1969, 819 p.
- CLINE, L.D. Effect of host availability and light conditions on light trap catches of *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Economic Entomology**, v.82, n.2, p. 430-432, 1989.
- CLINE, L. D.; PRESS, J. W. Reduction in almond moth (Lepidoptera: Pyralidae) infestation using commercial packaging of foods in combination with the parasitic wasp, *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Economic Entomology**, v.83, n.3, p. 1110-1113, 1990.
- CLINE, L. D.; PRESS, J. W.; FLAHERTY, B. R. Preventing the spread of the almond moth (Lepidoptera: Pyralidae) from infested food debris to adjacent uninfested packages, using the parasite *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Economic Entomology**, v.77, n.2, p. 331-333, 1984.

- CÔNSOLI, F.L. Criação *in vitro* de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 e *T. pretiosum* Riley, 1879 (Hym.: Trichogrammatidae): desenvolvimento de um ovo artificial e aprimoramento de dietas artificiais. Piracicaba, 1997. 153 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- CÔNSOLI, F. L.; PARRA, J.R.P. Biology of *Trichogramma galloi* and *T. pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) reared *in vitro* and *in vivo*. **Annals of the Entomological Society of America**, v.89, n.6, p. 828-834, 1996.
- CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P. Produção ‘*in vitro*’ de parasitóides: criação de *Trichogramma galloi* e *T. pretiosum* no Brasil. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Eds.). **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997a. cap. 10, p. 259-302.
- CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P. Development of an oligidic diet for *in vitro* rearing of *Trichogramma galloi* Zucchi and *Trichogramma pretiosum* Riley. **Biological Control**, v.8, p. 172-176, 1997 b.
- CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P. *In vitro* rearing of parasitoids: constraints and perspectives. **Trends in Entomology**. v. 2, p. 19-32, 1999.
- CORRÊA-FERREIRA, B.S.; ZAMATARO, C.E.O. Capacidade reprodutiva e longevidade dos parasitóides de ovos *Trissolcus basal* (Wollaston) e *Trissolcus mitsukurii* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v.49, n.2, p.621-626, 1989.
- CRAIG, C.L. Evolution of arthropod silks. **Annual Review of Entomology**, v.42, p. 231-267, 1997.
- CURI, P.R. Análise de Agrupamento: Métodos sequenciais, aglomerativos e hierarquicos. **Ciência e Cultura**, v.35, n.10, p. 1416-1429, 1982.

- DADD, R.H. Nutrition: Organisms. In. KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Eds.) **Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology**. Pergamon Press, 1985. vol. 4, p. 313-390.
- DOUTT, R.L. Distribution of eggs by *Microbracon* (Hymenoptera: Braconidae). **Ecology**, v.40, n.2, p.302-303, 1959.
- GREENE, G.L.; LEPPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v.69, p. 487-488, 1976.
- GRENIER, S.A. Desenvolvimento e produção *in vitro* de *Trichogramma*. In. PARRA, J.R.P.; ZUCHHI, R.A. (Eds.) **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. cap. 9, p. 235-258.
- GRENIER, S.; GREANY, P.D.; COHEN, A.C. Potential for mass release of insect parasitoids and predators through development of artificial culture techniques. In: ROSEN, D. (Ed.), **Pest management in the subtropics: Biological Control - A Florida Perspective**. Andover: Intercept, 1994. p.181-205.
- GUEDES, R.N.C. Resistência a inseticidas: desafio para o controle de pragas dos grãos armazenados. **Revista Seiva**, v.50, n.99, p.24-29, 1991.
- GUERRA, A.A. *In vitro* rearing of *Bracon mellitor* and *Catolaccus grandis* with different insect hemolymph-based diets. **Southwestern Entomologist**, v.17, n.2, p.123-126, 1992.
- GUERRA, A.A.; MARTINEZ, S. An *in vitro* rearing system for the propagation of the ectoparasitoid *Catolaccus grandis* **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.72, p. 11-16, 1994.

- GUERRA, A.A.; ROBACKER, K.M.; MARTINEZ, S. 'In vitro' rearing of *Bracon mellitor* e *Catolaccus grandis* with artificial diets devoid of insect components. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.68, p. 303-307, 1993.
- HAGSTRUM, D.W. Self-provisioning with paralyzed hosts and age, density, and concealment of hosts as factors influencing parasitization of *Ephesia cautella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) by *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae). **Environmental Entomology**, v.12, n.6, p.1727-1732, 1983.
- HASSAN, S. A. The mass rearing and utilization of *Trichogramma* to control lepidopterous pests: achievement and outlook. **Pesticide Science**, v.37, p.387-391, 1993.
- HOFFMAN, J.D.; IGNOFFO C. M.; DICKERSON W.A.. 'In vitro' rearing of the endoparasitic wasp, *Trichogramma pretiosum*. **Annals of Entomological Society of America**, v.68, n.2, p. 335-336, 1974.
- HOLLOWAY, A.K.; HEIMPEL, G.E.; STRAND, M.R.; ANTOLIN, M.F. Survival of diploid males in *Bracon* sp. near *hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). **Annals of Entomological Society of America**, v.92, n.1, p. 110-116, 1999.
- HOUSE, H.L. Nutritional disease. In: STEINHAUS, E.A. (Ed.). **Insect Pathology and Advanced Treatise**. New York: Academic Press, 1963, cap.4, p. 133-160.
- INOUE, M. S. R. Bioecologia da traça dos cereais, *Sitotroga cerealella* (Oliver, 1819) e seu controle biológico em milho armazenado com *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 e *Bracon hebetor* Say, 1857. Piracicaba, 1997. 105p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- JERVIS, M.A., KIDD, N.A.C.; ALMEY, H.E. Post-reproductive life in the parasitoid *Bracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 117, p. 72-77, 1994.
- KEEVER, D. W.; ARBOGAST, R. T.; MULLEN, M. A. Population trends and distributions of *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) and lepidopterous pests in commercially stored peanuts. **Environmental Entomology**, v.14, n.6, p. 722-725, 1985.
- KEEVER, D. W.; MULLEN, M. A., PRESS, J. W. & ARBOGAST, R. T. Augmentation of natural enemies for suppressing two major insect pests in stored farmers stock peanuts. **Environmental Entomology**, v.15, n.3, p.767-777, 1986.
- LI, L. *In vitro* rearing of parasitoids of insect pests in China. **Korean Journal Applied Entomology** v. 31, n.3, p.241-246, 1992.
- MAGRO, S.R.; CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P. Criação '*in vitro*' de *Bracon hebetor* Say, 1857 (Hymenoptera: Braconidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA 17. Rio de Janeiro, 1998. **Resumos**. Rio de Janeiro: SEB, 1998. v. 1, p. 215.
- MORALES RAMOS, J.A.; ROJAS, M.G.; COLEMAN, R.J.; KING, E.G. Potential use of *in vitro*-reared *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae) for biological control of the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Biological and Microbial Control**, v.91, n.1, p.101-109, 1998.
- MORETTI, A.C.; PARRA, J.R.P. Biologia comparada e controle de qualidade de *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) (Lep.; Noctuidae) em dieta natural e artificial. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.50, n.1/4, p.7-15, 1983.
- MORRILL Jr., A.W. Notes on the biology of *Microbracon hebetor*. **Journal of Economic Entomology**, v.35, n.4, p.593-594, 1942.

- MULLINS, D. E. Chemistry and physiology of the hemolymph. In. KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Eds.) **Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology**. Pergamon Press, 1985. vol. 3, p. 355-400.
- NALIM, D.M. Biologia, nutrição quantitativa e controle de qualidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lep.; Noctuidae) em duas dietas artificiais. Piracicaba, 1991. 150p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- NIKAM, P.K.; PAWAR C.V. Life tables and intrinsic rate of natural increase of *Bracon hebetor* Say (Hym.; Braconidae) population on *Corcyra cephalonica* Staint. (Lep.; Pyralidae), a key parasitoid of *Helicoverpa armigera* Hbn. (Lep.; Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, v.115, p. 210-213, 1993.
- NORDLUND, D.A.; WU, Z.X.; GREENBERG, S.M. *In vitro* rearing of *Trichogramma minutum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) for ten generations, with quality assessment comparisons of *in vitro* and *in vivo* rearing adults. **Biological Control**, v.9, p. 201-207, 1997.
- ODE, P.J.; ANTOLIN, M.F.; STRAND, M.R. Constrained oviposition and female-biased sex allocation in a parasitic wasp. **Oecologia**, v.109, p.547-555, 1997.
- PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: FEALQ, 1999, 137p.
- PARRA, J.R.P. Técnicas de criação de *Anagasta kuehniella*, hospedeiro alternativo para a criação de *Trichogramma*. In. PARRA, J.R.P.; ZUCHHI, R.A. (Ed.) **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. cap. 4, p. 121-150.

- PARRA, J.R.P. Consumo e utilização de alimentos por insetos In: PANIZZU, A.R.; PARRA, J.R.P.; (Eds.) **Ecologia nutricional de insetos e suas aplicações no manejo de pragas**. CNPq / Ed. Manole 1991. cap. 2, p. 9-65.
- PARRA J.R.P.; CÔNSOLI, F.L. In vitro rearing of *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879. **Ciência e Cultura**, v.44, n.6, p. 407-409, 1992.
- PARRA, J.R.P.; MISHFELDT, L.H. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. In: ANDERSON, T.E.; LEPPLA, N.C. (Eds.) **Advances in insect rearing for research and pest management**. Colorado: Westview Press, 1992, p. 195-209.
- PARRA, J. R. P.; SERRA, H. J. P.; LOPES, J. R. S; SALES Jr, O. Metodologia de criação de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) para produção massal de *Trichogramma* spp. **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, v.18, n.2, p. 403-409, 1989.
- PARRA, J.R.P.; VINSON, S.B.; GOMES, S.M. & CÔNSOLI, F.L. Flight response of *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) in a wind tunnel to volatiles associated with infestations of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Biological Control**, v.6, p. 143-150, 1996.
- PROZELL, S; SCHÖLLER, M. Insect fauna of a bakery, processing organic grain and applying *Trichogramma evanescens* Westwood. **Integrated Protection of Stored Products IOBC Bulletin**. V.21, n.3, p.39-44, 1998.
- PRUDHOMME, J.C.; COUBLE, P.; GAREL, J.P.; DAILLIE, J. Silk synthesis In: KERKUT, G.A.; L.I. GILBERT (Eds.) **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. Vol10. Pergamon Press.1985, p. 571-594.

- REINERT, J.A.; KING, E.W. Action of *Bracon hebetor* Say as a parasite of *Plodia interpunctella* at controlled densities. **Annals of Entomological Society of America**, v.64, n.6, p. 1335-1340, 1971.
- ROJAS, M.G.; MORALES-RAMOS, J.A.; KING, E.G. *In vitro* rearing of boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) ectoparasitoid *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae) on meridic diets. **Biological and Microbial Control**. V.89, n.5, p.1095-1104, 1996.
- ROJAS, M.G.; MORALES-RAMOS, J.A.; KING, E.G. Reduction of cost for mass propagating *Catolaccus grandis* by the use of artificial diet. In: BELTWIDE COTTON CONFERENCES, PROCEEDINGS. New Orleans, 1997. v.2. p. 1197-1199.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANITIS, T. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**, 2 ed. Cold Spring Harbor: Laboratory Press. 1989.
- SCHULZ, F.A.; LABORIUS, G.A. Strategy for bio-integrated control of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Col., Bostrichidae). In: INTERNATIONAL WORKING CONFERENCE OF STORED PRODUCT PROTECTION, 4., Tel Aviv, 1986, p. 497-503.
- SCRIBER, J.M.; SLANSKY Jr., F. The nutritional ecology of immature insects. **Annual Review of Entomology**, v.26, p. 183-211, 1981.
- SEHNAL, F.; AKAY, H. Insect silk gland: their types, development and function, and effects of environmental factors and morphogenetic hormones on them. **International Journal Insect Morphology and Embryology**, v.19, n.2, p.79-132, 1990

- SERRA, H. J. P. Bioecologia do ectoparasito *Habrobracon hebetor* (Say, 1836) (Hymenoptera: Braconidae) em *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae). Piracicaba, 1992. 91p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SHONOUDA, M.L.; NASR, F.N.. Impact of larval-extract (kairomone) of *Ephesia kuehniella* Zell. (Lep.; Puralidae), on the behaviour of the parasitoid *Bracon hebetor* Say (Hym.: Braconidae), **Journal of Applied Entomology**, v.122, p. 33-35, 1998.
- SILVEIRA NETO, S. Análise Fenética. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Ed. Manole 1986. cap. 22, p. 384-407.
- TAYLOR, A.D. Host effects on larval competition in the gregarious parasitoid *Bracon hebetor*. **Journal of Animal Ecology**, v.57, p. 163-172, 1988.
- THOMPSON, S.N. Defined meridic and holidic diets and aseptic feeding procedures for artificially rearing the ectoparasitoid *Exeristes roborator* (Fabricius). **Annals of Entomological Society of America**, v.68, n.2, p.220-226, 1975.
- THOMPSON, S.N. Nutrition and *in vitro* culture of insect parasitoids. **Annual Review of Entomology**, v.31, p. 197-219, 1986.
- THOMPSON, S.N. Nutrition and culture of entomophagous insects. **Annual Review of Entomology**, v.44, p. 561-592, 1999.
- VOLKOFF, A.N.M. Recherches de base pour l'elaboration d'un milieu artificiel brut assurant le development de *Trissolcus basalís* (Woll) (Hymenoptera: Scelionidae), parasitoid oophage de *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae). 1990, 116 p. Le Titre de Docteur de L'Institut National Polytechnique de Toulouse.

- YAZLOVETSKY, I.G.; NEPONNYASHAYA, A.M.; AGEeva, L.I. Optimization of the artificial nutritional diet for the larvae of *Bracon hebetor* (Hymenoptera, Braconidae). **Zoologicheskii Zhurnal** v.71, n.10, p.134-138, 1992.
- XIE, Z.; LI, L.; XIE, Y. *In vitro* culture of *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae). **Chinese Journal of Biological Control**, v.5, n.2, p. 49-51, 1989.
- XIE, Z.N.; WU, Z.X.; NETTLES Jr, W.C.; SALDAÑA, G. & NORDLUND, D.A. *In vitro* culture of *Trichogramma* spp. on artificial diets containing yeast extract and ultracentrifuged chicken egg yolk but devoid of insect components. **Biological Control**, v.8, p. 107-110, 1997.
- WOOL, D.; BROWER, J. H.; KAMIN-BELSKY, N. The relative importance of factors affecting the size of laboratory populations of the almond moth, *Ephesia cautella* (Walker) (Lep., Pyralidae). **Journal of Applied Entomology**, v.104, p. 217-227, 1987.