**CRIAÇÃO *in vitro* DE *Trichogramma pretiosum* RILEY, 1879
(HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE): ASPECTOS
NUTRICIONAIS E BIOQUÍMICOS**

SILVIA MONTEIL GOMES

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO POSTALI PARRA

Co-Orientador: Dr. SIMON ALBERT GRENIER

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Fevereiro - 2002

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Gomes, Silvia Monteil

Criação *in vitro* de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera :
Trichogrammatidae) : aspectos nutricionais e bioquímicos / Silvia Monteil Gomes. -
Piracicaba, 2002.
95 p.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.
Bibliografia.

1. Controle biológico (Fitossanidade) 2. Hymenoptera 3. Insetos parasitas I. Título

CDD 595.79

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

Ao meu irmão André (*in memoriam*);

**À minha mãe Claudie, pelo exemplo de força e
coragem nos momentos mais difíceis e
também pelo apoio e incentivo**

Dedico

Ao meu pai Luiz Henrique pelo seu amor e carinho

Ofereço

Agradecimentos

- Ao Dr. José Roberto Postali Parra, Professor Titular do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), pelas valiosas discussões e oportunidade de realizar o Curso;
- Ao Dr. Simon Albert Grenier, Diretor de Pesquisa do INRA (França) pelos valiosos ensinamentos, incansável dedicação, carinho e incentivo durante todo o período que estive em seu laboratório;
- Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Entomologia do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, pelos ensinamentos transmitidos durante o Curso;
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos no Brasil;
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos na França;
- À Bibliotecária Eliana M. Garcia pela revisão das referências bibliográficas;
- À Josette Gillaud pela dedicação nas análises bioquímicas;
- Aos Funcionários e amigos do Laboratoire de Biologie Appliquée, Insectes et Interactions, Patrice Bolland, Gabrielle Duport, Josette Gillaud, François Lassablière, Benjamin Nilo e Isabelle Rahioui, pelo agradável convívio diário e pela amizade durante a estadia na França;

- Aos Pesquisadores Bernard Delobel, Paul Nardon e Gérard Febvay pelas proveitosas discussões na Biblioteca do “Labo” e pelos valiosos ensinamentos;
- Ao Técnico do Laboratoire de Biologie Appliquée, Insectes et Interactions, Patrice Bolland, pelas discussões, sugestões e, sobretudo, pela amizade;
- À “Famille Lyonnaise”, Alexandre Santos, Flávia A.M. Sousa, João Araújo Júnior, Silene Pires e Tereza Queiroz, pelos inesquecíveis momentos que passamos juntos na França;
- À Georgette Artru, Marie Pierre Artru, Françoise Bernard, Sylvie e Jacques Broizat, Caroline Doyen, François Gierès, Simone Rousselot, Julie Vuillermet, Delphine Vuillermet, Jérôme e Laurent Bernard pela acolhida e apoio na França;
- À minha prima Christiane Monteil pela alegria do reencontro e exemplo de coragem;
- Ao meu tio Georges Monteil que, embora distante, sempre esteve presente em minha vida;
- À minha tia Vera Lúcia Gomes pelo auxílio e compreensão em momentos marcantes de minha vida;
- À Helena Gória pela dedicação incondicional à família Monteil;
- Aos Amigos Aguinaldo R. da Silva, Alexandre de S. Pinto, Ana Gabriela Brancalhão, Antonio Rogério Iarossi, Bento A. de Moraes Neto, Charles M. Oliveira, Edson N. Higashi, Fábio Mazzoneto, Marilise R. Inoue, Marina R. Frizzas, Neide Graciano Zério, Peter Kasten Jr., Ranyse B. Querino, Regina C. B. de Moraes, Solange Ap. Vieira e Teresinha A. Giustolin, pelo carinho e incentivo no decorrer do curso;

E a todos que direta e indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ix
SUMMARY	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Criação de parasitóides <i>in vitro</i>	3
2.1.1 Aspectos fisiológicos das relações hospedeiro - parasitóide	4
2.1.2 Aspectos da nutrição de parasitóides	7
2.1.2.1 Proteínas	8
2.1.2.2 Lipídeos	10
2.1.2.3 Carboidratos	11
2.1.3 Criação <i>in vitro</i> de <i>Trichogramma</i>	11
2.2 Considerações sobre o simbionte do gênero <i>Wolbachia</i>	14
2.2.1 Biologia dos simbiossomas do gênero <i>Wolbachia</i>	15
2.2.1.1 Partenogênese telítica.....	16
2.2.1.2 Incompatibilidade citoplasmática (IC).....	17
2.2.2 Implicações do uso de linhagens telíticas de <i>Trichogramma</i> no Controle Biológico	18
2.2.3 Efeitos do simbionte <i>Wolbachia</i> em seus hospedeiros	19

3 DESENVOLVIMENTO DE <i>Trichogramma pretiosum</i> RILEY, 1879 EM MEIOS ARTIFICIAIS.....	22
Resumo	22
Summary	23
3.1 Introdução	24
3.2 Material e Métodos.....	25
3.2.1 Manutenção das linhagens de <i>Trichogramma</i>	25
3.2.2 Metodologia de criação <i>in vitro</i> de <i>Trichogramma</i>	26
3.2.2.1 Confeção dos ovos artificiais, composição e preparo dos meios artificiais	26
3.2.3 Comparação de meios artificiais.....	29
3.2.4 Análises em composição de aminoácidos	30
3.3 Resultados e Discussão	30
3.3.1 Desenvolvimento de <i>Trichogramma pretiosum</i> Riley, 1879 em diferentes meios artificiais.....	30
3.4 Conclusões	41
4 ASSIMILAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO PARASITÓIDE DE OVOS <i>Trichogramma pretiosum</i> RILEY, 1879 (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE).....	42
Resumo	42
Summary	43
4.1 Introdução	43
4.2 Material e Métodos.....	45
4.2.1 Manutenção da linhagem de <i>Trichogramma pretiosum</i> Riley, 1879	45
4.2.2 Metodologia de criação <i>in vitro</i> de <i>Trichogramma</i>	45
4.2.2.1 Confeção dos ovos artificiais	45
4.2.2.1.1 Composição e preparo do meio artificial.....	46
4.2.3 Estudos de assimilação de proteínas.....	48

4.2.4 Análises em composição de aminoácidos totais e livres.....	51
4.3 Resultados e Discussão	52
4.4 Conclusões.....	56
 5 UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE CRIAÇÃO <i>in vitro</i> NA ELIMINAÇÃO DO SIMBIONTE <i>Wolbachia</i> PARA ESTUDOS DO SEU PAPEL NA FECUNDIDADE DE <i>Trichogramma pretiosum</i> Riley, 1879	 57
Resumo	57
Summary	58
5.1 Introdução.....	58
5.2 Material e Métodos.....	60
5.2.1 Manutenção da linhagem de <i>Trichogramma pretiosum</i> Riley, 1879	60
5.2.2 Metodologia de criação <i>in vitro</i> de <i>Trichogramma</i>	60
5.2.2.1 Confeção dos ovos artificiais	60
5.2.2.1.1 Composição e preparo do meio artificial.....	61
5.2.3 Obtenção de linhagens livres do simbiote <i>Wolbachia</i>	62
5.2.4 Capacidade de parasitismo de linhagens com e sem <i>Wolbachia</i>	62
5.2.4.1 Técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) para controle da presença de <i>Wolbachia</i> em <i>Trichogramma</i>	64
5.3 Resultados e Discussão	65
5.3.1 Eliminação e manutenção da ausência do simbiote <i>Wolbachia</i> de linhagens de <i>T. pretiosum</i> Riley, 1879.	65
5.3.2 Fecundidade de linhagens infectadas ou não por <i>Wolbachia</i>	67
5.3.3 Relação entre o tamanho da fêmea criada em meio artificial, a infecção por <i>Wolbachia</i> e a fecundidade de linhagens de <i>T. pretiosum</i> Riley, 1879.	73
5.4 Conclusões.....	74
6. CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

**CRIAÇÃO *in vitro* DE *Trichogramma pretiosum* RILEY, 1879
(HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE): ASPECTOS
NUTRICIONAIS E BIOQUÍMICOS**

Autor: Silvia Monteil Gomes

Orientador: Dr. José Roberto Postali Parra

Co-orientador: Dr. Simon Albert Grenier

RESUMO

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar diferentes meios artificiais para criação e desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, estudar sua capacidade de assimilação de proteínas em meios artificiais, bem como o papel dos simbiontes do gênero *Wolbachia* na biologia destes parasitóides. Meios artificiais elaborados com holotecidos pupais de *Mamestra brassicae* L. foram mais adequados em relação àqueles elaborados com hemolinfa pupal, proporcionando maior emergência e dando origem a pupas de *T. pretiosum* com mais alto teor de proteínas. Meios elaborados com hemolinfa pupal suplementados com as proteínas caseína e soroalbumina bovina em diferentes concentrações também foram avaliados. A caseína foi adicionada à dieta nas concentrações de 1,6 e 3,2%. A emergência de *T. pretiosum*

foi maior quando a concentração desta proteína foi de 1,6%. A adição de 3,2% de caseína inibiu a oviposição do parasitóide e diminuiu a emergência, mas aumentou a produção de adultos normais e produziu parasitóides com maior quantidade de proteínas. A soroalbumina bovina foi adicionada ao meio artificial nas concentrações de 1,75 e 3,5%. A oviposição foi maior em meio artificial suplementado com 1,75% desta proteína, mas a emergência foi maior em meio artificial contendo 3,5%. Grandes quantidades de adultos normais foram obtidas nos meios suplementados com a proteína, em relação ao meio elaborado com hemolinfa pupal. Insetos provenientes de meios contendo soroalbumina bovina apresentaram maior teor de proteínas. Análises da composição em aminoácidos de pupas provenientes de todos os meios artificiais apresentaram semelhanças qualitativas, porém foram observadas diferenças quantitativas. Utilizando o princípio da diluição isotópica, desenvolveu-se uma metodologia através da qual foi possível demonstrar que *T. pretiosum* assimila as proteínas dos meios artificiais, suplementados ou não com as proteínas caseína e soroalbumina bovina nas diferentes concentrações. O papel dos simbioses do gênero *Wolbachia* foi também estudado, graças ao desenvolvimento de uma metodologia de eliminação deste simbiote com apenas um tratamento antibiótico, adicionado ao meio artificial de desenvolvimento do parasitóide. Deste modo foi possível a obtenção de quatro linhagens livres do simbiote que, por possuírem o mesmo genoma da linhagem de origem, permitiram o estudo da influência do simbiote na fecundidade do parasitóide. Fêmeas infectadas por *Wolbachia* apresentaram maior capacidade de parasitismo em relação às fêmeas livres do simbiote. Fêmeas infectadas pelo simbiote, provenientes de dieta artificial, embora de menor tamanho em relação a uma linhagem livre de *Wolbachia*, apresentaram maior fecundidade.

***In vitro* REARING OF *Trichogramma pretiosum* RILEY, 1879
(HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE): NUTRITIONAL
AND BIOCHEMICAL ASPECTS**

Author: Silvia Monteil Gomes

Adviser: Dr. José Roberto Postali Parra

Co-adviser: Dr. Simon Albert Grenier

SUMMARY

The goal of this research was to evaluate different artificial media for *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 rearing and development, to study its protein assimilation ability in artificial media, as well as the role of *Wolbachia* symbionts in the biology of these parasitoids. Artificial media elaborated with pupal holotissues of *Mamestra brassicae* L. were more adequate in relationship with those elaborated with pupal hemolymph, providing higher emergence and originating higher protein content pupae. Media elaborated with pupal hemolymph and supplemented with casein and bovine serum albumin proteins at different concentrations were also evaluated. The casein was added to the diet at concentrations of 1.6 and 3.2%. The *T. pretiosum* emergence was higher when the concentration of that protein was 1.6%. The addition of 3.2% casein inhibited the oviposition of the parasitoid and decreased the emergence, however, increasing the production of normal adults and producing parasitoids with a

higher amount of proteins. The bovine serum albumin was added to the artificial medium at concentrations of 1.75 and 3.5%. The oviposition was higher in the artificial medium supplemented with 1.75% of that protein, however, the emergence was higher in the artificial medium at 3.5%. Large amounts of normal adults were obtained from the media supplemented with that protein in relationship with the one elaborated with pupal hemolymph. The insects deriving from bovine serum albumin media showed higher protein content. Amino acids composition analyses of pupae deriving from every artificial media showed qualitative similarities, although quantitative differences were observed. Through the isotopic dilution principle, one developed a methodology capable of showing that *T. pretiosum* assimilates the artificial media proteins, supplemented or not with casein and bovine serum albumin proteins at different concentrations. The role of genus *Wolbachia* symbionts was also studied, through the development of a methodology of elimination of such symbiont with a single antibiotic treatment, added to the artificial parasitoid development medium. This way four symbiont-free strains were achieved, allowing the study of the symbiont influence on the biological aspects of the parasitoid, since they had the same genome as the original strain. *Wolbachia*-infected females had higher parasitism ability in relationship with symbiont-free females. The females deriving from the symbiont-infected artificial diet, although of lesser size in comparison with a *Wolbachia*-free strain, had higher fecundity.

1 INTRODUÇÃO

Insetos do gênero *Trichogramma* são os parasitóides de ovos mais estudados em todo o mundo, devido ao sucesso de diversos programas de Controle Biológico já relatados com este agente de controle (Li, 1994; Parra, 1997). Para que possam ser utilizados nestes programas, são necessárias técnicas de produção massal para a obtenção de grande número de parasitóides a um custo reduzido. No caso de *Trichogramma*, sua produção requer a criação de um hospedeiro, e normalmente são utilizadas pragas de grãos armazenados tais como *Sitotroga cerealella* (Oliv.), *Anagasta kuehniella* Zeller e *Corcyra cephalonica* (Stainton). Técnicas de criação deste parasitóide nestes hospedeiros vêm sendo desenvolvidas desde o início do século passado (Flanders, 1930; Parra et al., 1989). Atualmente, procuram-se técnicas de criação em dietas artificiais (*in vitro*), onde não é exigida a produção de um outro inseto. Deste modo, são suprimidas várias etapas do processo de criação, simplificando o processo de produção do parasitóide. Apenas a China domina esta técnica de produção em larga escala, permitindo a liberação de insetos em áreas extensas para o controle de diversas pragas (Cônsoli & Parra, 1997a, 1999).

Além de ser utilizada para criação e produção massal de *Trichogramma*, a criação em meio artificial pode facilitar pesquisas básicas em biologia, fisiologia e comportamento (Grenier, 1994, 1997). Para que seja viável a utilização desta técnica de criação, são ainda necessários muitos estudos básicos tais como o aprimoramento de dietas artificiais, bem como o estudo da nutrição destes parasitóides em meios artificiais.

Sem dúvida, o domínio da técnica de criação de *Trichogramma in vitro* trará grandes avanços na produção e utilização para liberação em campo destes parasitóides.

Os estudos propostos neste trabalho objetivam permitir avanços em técnicas de criação *in vitro* para a produção de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, a fim de auxiliar no desenvolvimento de meios artificiais mais eficientes para a multiplicação destes parasitóides e sua utilização no controle de pragas. O assunto foi abordado através do estudo da fisiologia do desenvolvimento de *Trichogramma* em meios artificiais, envolvendo o estudo de aspectos de sua biologia em diferentes meios artificiais, aspectos da assimilação de proteínas pelos parasitóides e do papel dos simbiosiontes do gênero *Wolbachia* na fecundidade dos parasitóides.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Criação de parasitóides *in vitro*.

A técnica de criação *in vitro* de parasitóides tem sido pesquisada para várias espécies de insetos, obtendo-se sucesso parcial ou total em muitos casos (House, 1954; Yazgan & House, 1970; Hoffman et al., 1973; Grenier et al., 1978; Thompson, 1980, 1981; Strand & Vinson, 1985; Bratti & Monti, 1988; Bratti & Nettles Jr., 1988; Cônsoli & Parra, 1994, 1996a, 1997a; Thompson & Hagen, 1999, Fanti & Vinson, 2000). Esta técnica vem sendo largamente estudada em alguns países, principalmente nos EUA (Xie et al., 1986ab), Itália (Bratti, 1990), França (Grenier et al., 1974, 1975, 1978, 1993) e China (Li et al., 1988; Li, 1989), sendo que o Brasil é o único país na América Latina a desenvolver pesquisas na área de produção de inimigos naturais *in vitro* (Cônsoli & Parra, 1997a).

Estudos visando ao crescimento e desenvolvimento de parasitóides em meios artificiais vêm sendo intensamente realizados com várias espécies das Ordens Diptera e Hymenoptera (Thompson & Hagen, 1999). No entanto, são ainda necessários muitos estudos básicos da fisiologia, biologia e nutrição de insetos para que os resultados obtidos possam ser melhorados, visando sua aplicação prática na produção de inimigos naturais para utilização em campo.

Para a grande maioria dos insetos estudados, ainda é necessária a adição de componentes de insetos tais como hemolinfa, homogeneizado de ovos ou holotecidos pupais, o que não elimina a necessidade de criação de outro inseto. Estes componentes são ricos em aminoácidos livres, açúcares, proteínas, lipídeos, hormônios e fatores de crescimento, essenciais para o metabolismo do inseto (Strand & Vinson, 1985; Xie et al.,

1986a; Bratti & Nettles Jr., 1988; Strand et al., 1988; Volkoff et al., 1992; Guerra et al., 1993; Hu et al., 1998).

Consideráveis avanços têm sido obtidos, inclusive com a liberação de parasitóides produzidos em dieta artificial em condições de campo. Um exemplo muito conhecido é o da utilização de espécies de *Trichogramma* no controle de diversas pragas da Ordem Lepidoptera na China, onde este parasitóide vem sendo multiplicado em dietas artificiais em sistemas de criação massais (Dai et al., 1991; Liu et al., 1992, 1995a).

Em pesquisas realizadas no Texas, EUA, Guerra et al. (1993) desenvolveram dieta artificial sem componentes de insetos para a criação de *Catolaccus grandis* (Burks) e *Bracon mellitor* Say, dois ectoparasitóides do bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* Boheman. Posteriormente, Morales-Ramos et al. (1998) demonstraram a possibilidade do uso de *C. grandis* produzido *in vitro* para liberações em campo. Os parasitóides produzidos em dieta artificial foram eficientes na redução da população da praga no campo e apresentaram parâmetros biológicos importantes, tais como capacidade de busca e dispersão, semelhantes àqueles criados *in vivo*.

2.1.1 Aspectos fisiológicos das relações hospedeiro - parasitóide

O conhecimento dos mecanismos de adaptações fisiológicas e metabólicas dos parasitóides em relação aos hospedeiros são de suma importância para o desenvolvimento de dietas artificiais eficientes, já que estes insetos são adaptados para sobreviverem e se desenvolverem em hospedeiros vivos (Thompson, 1986). Apesar do limitado conhecimento da fisiologia do inseto parasitóide e da interação fisiológica durante a associação inseto parasitóide-hospedeiro, sucesso considerável tem sido alcançado na criação de várias espécies em dieta artificial (Grenier et al., 1986). Deste modo, estudos sobre a digestão, respiração e dependência de hormônios do hospedeiro devem ser realizados para uma melhor compreensão das exigências nutricionais e físicas destes insetos (Grenier, 1994).

Com relação à eficiência digestiva, em larvas de himenópteros parasitóides, esta é influenciada pelo seu modo de excreção. Em muitas espécies o mesêntero não se liga ao proctodéu até a fase de pupa, evitando assim a contaminação do meio em que a larva está se desenvolvendo por material fecal, que é eliminado após a pupação. Além disso, os mecanismos de aquisição de nutrientes também variam, podendo serem absorvidos pela cutícula ou por ingestão oral (Thompson, 1986).

Segundo Hu & Vinson (1998) a respiração pode ser um fator crítico para o desenvolvimento *in vitro* da larva, já que pode ser realizada através do tegumento ou por espiráculos. Assim, os primeiros estágios larvais de espécies de himenópteros respiram principalmente por difusão cutânea (Grenier et al., 1975), podendo então serem utilizados meios líquidos para seu desenvolvimento (Grenier, 1994). No entanto, nos estágios terminais, a larva vive em um meio relativamente seco e as trocas gasosas passam a ser realizadas pelas traquéias. Deste modo, uma dieta aquosa pode não ser adequada para um endoparasitóide completar o seu desenvolvimento e dietas semi-gelatinosas parecem ser mais adequadas (Nettles Jr. et al., 1980; Grenier et al., 1994). Assim, em trabalho realizado por Hu & Vinson (1997) o desenvolvimento do endoparasitóide larval *Campoletis sonorensis* (Cresson) um endoparasitóide larval de *Heliothis virescens* (Fabricius), em dietas mais aquosas foi somente até o terceiro ínstar larval. Em trabalho posterior, Hu & Vinson (1998) conseguiram o desenvolvimento deste mesmo parasitóide até a fase de pré-pupa em ambientes mais secos e com maior pressão de O₂. Já para ectoparasitóides, a respiração pode não ser um fator limitante para criação *in vitro*, pois o seu ambiente de desenvolvimento *in vivo* permite uma relativa troca direta de gases pelas traquéias.

Para a dependência de hormônios, estudos com endoparasitóides demonstraram que há uma sincronização do desenvolvimento do hospedeiro e do parasitóide. Endoparasitóides larvais estão continuamente sujeitos à variação hormonal de seus hospedeiros (Beckage, 1985) e raramente têm sido relatados casos de desenvolvimento de dietas artificiais para estes insetos (Hu & Vinson, 1998). Alguns parasitóides não se desenvolvem, ou param seu desenvolvimento até que o hospedeiro tenha alcançado um determinado estágio (Grenier et al., 1986). Por exemplo Beckage & Riddiford (1982)

demonstraram que a última ecdise e a emergência de *Apanteles congregatus* (Say) de larvas de *Manduca sexta* (L.) é regulada por níveis hormonais do hospedeiro.

Trabalho realizado *in vitro* por Hu & Vinson (1997) demonstrou que a adição de 20-hidroxiecdisônio em meio artificial aumentou a porcentagem de ecdise, e diminuiu o tempo de desenvolvimento de larvas de *C. sonorensis*. Nakahara et al. (2000) relataram que este mesmo hormônio foi essencial para a ecdise larval de *Venturia canescens* (Gravenhorst) porém quando adicionado à dieta artificial em concentrações maiores que 1µg/mg, as larvas apresentaram deformações. Níveis insuficientes de ecdisteróides na dieta artificial causaram alta mortalidade larval do ectoparasitóide pupal *Diapetimorpha introita* (Cresson) (Gelman et al., 2000).

Outros fatores, tais como os aspectos físicos do meio também estão relacionados aos mecanismos de adaptações fisiológicas e metabólicas dos parasitóides em relação aos hospedeiros. Entre estes fatores estão o pH e a pressão osmótica, que podem estar intimamente ligados a aspectos fisiológicos. De maneira geral, as dietas empregadas para a criação *in vitro* de parasitóides apresentam pH por volta de 4,5-5,0 (Grenier, 1994). No entanto, Arthur et al. (1972) determinaram o efeito do pH na oviposição de *Itoplectis conquisitor* (Say) (Hymenoptera: Ichneumonidae), utilizando soluções de l-serina e l-arginina e verificaram que a faixa de pH ideal para a oviposição encontrava-se entre 6,5-9,0. Em estudos realizados por Strand & Vinson (1985) a viabilidade ovo-adulto do parasitóide de ovos de *Trichogramma pretiosum* Riley foi elevada quando o pH da dieta foi ajustado entre 6,6 e 6,8. Para esta mesma espécie de parasitóide, Nettles Jr. et al. (1985) obtiveram desenvolvimento em dietas com pH que variaram entre 6,5 e 9,0, embora os melhores resultados tenham sido obtidos em dietas com pH próximo de 7,0. Também Zhong & Zhang (1989) verificaram o efeito do pH no desenvolvimento e crescimento de *T. confusum* Viggiani em meio artificial. Estes autores utilizaram dieta composta de holotecidos pupais de *Antherea pernyi* Guérin-Meneville (30%), gema-de-ovo (30%), solução de leite em pó (10%) e água destilada (30%). Os resultados obtidos em dieta com pH ajustado para 6,70-6,95 foram 30% superiores aos relatados em dieta com pH de 6,40, com 89-92% de parasitismo dos ovos

artificiais, com uma taxa de pupação de 79-80%. Assim, pode-se inferir que as espécies de parasitóides variam quanto à faixa de pH na qual podem se desenvolver.

A pressão osmótica do meio artificial é importante principalmente para endoparasitóides, que podem sofrer hipo ou hipertrofia dos tecidos se estiverem em meios hiper ou hipotônicos, respectivamente (Cônsoli & Parra, 1997b). Valores próximos àquele encontrado na hemolinfa de larvas de Lepidoptera (350 mOsm) parecem ser ideais para o desenvolvimento de parasitóides, já que diversos autores relataram que meios com osmolaridade entre 300 e 400 mOsm foram apropriados para o desenvolvimento de *Phryxe caudata* (Rondani), *Lixophaga diatraeae* (Townsend), *Microplites croceipes* (Cresson), *Cotesia marginiventris* (Cresson), *Telenomus heliothidis* Ashmead e *Pachycrepoideus vindemiae* (Rondani) (Grenier et al., 1974, 1975, 1978; Greany, 1986; Thompson et al., 1983; Strand et al., 1988). No entanto, Grenier et al. (1994) comentam que a incorporação de aminoácidos livres em dietas artificiais pode aumentar a pressão osmótica do meio, e para reduzi-la a níveis mais aceitáveis, podem ser utilizadas proteínas hidrolisadas ou não, desde que sejam solúveis em água (Hu & Vinson, 1997), como suprimento de parte dos aminoácidos necessários ao desenvolvimento do inseto.

2.1.2 Aspectos da nutrição de parasitóides

O estudo das exigências nutricionais de parasitóides é de fundamental importância para que sejam elaborados meios artificiais adequados para seu crescimento e desenvolvimento *in vitro*. Através destes estudos, foi possível o desenvolvimento destes insetos em diferentes meios artificiais. Em numerosas pesquisas, as dietas continham sempre elementos derivados de insetos, tais como o conteúdo do ovo hospedeiro, hemolinfa e holotécidos pupais, provenientes principalmente de insetos da Ordem Lepidoptera.

Parasitóides são insetos carnívoros, que necessitam de dietas com elevado teor de proteínas, além de fontes de energia, como carboidratos e lipídeos (Grenier, 1994,

1997). Estudos da análise do alimento exigido pelas larvas (hospedeiro ou parte dele), do próprio parasitóide ou análises da digestão e metabolismo podem ser muito úteis para a definição de meios artificiais (Grenier et al., 1986). Às vezes, faz-se necessário a combinação destes dois métodos para melhor entendimento da relação nutricional do parasitóide com o hospedeiro, sendo importantes algumas informações básicas sobre a biologia do inseto, a fim de se ter uma idéia precisa de seu alimento (Grenier et al., 1993).

Para endoparasitóides não é fácil realizar a análise do alimento, mas uma melhor determinação do suprimento alimentar pode ser conseguida analisando-se o próprio parasitóide. O acúmulo dos componentes no corpo do parasitóide em crescimento pode levar a uma boa estimativa global de suas necessidades nutricionais (Grenier et al., 1986). Desta maneira, necessidades mínimas poderão ser definidas qualitativa e quantitativamente, podendo ser modificadas, em função do metabolismo do parasitóide, no sentido de uma otimização da dieta. Por exemplo, Grenier & Bonnot (1988) utilizaram um meio para desenvolvimento de *Trichogramma* baseado em análises do ovo do hospedeiro alternativo, *Anagasta kuehniella* Zeller. Barrett & Schmidt (1991) avaliaram as necessidades em aminoácidos e encontraram semelhanças na composição entre adultos de *T. minutum* Riley e o hospedeiro no qual foi criado. Cônsoli & Parra (1996b), compararam a composição da hemolinfa e holotécidos pupais de alguns lepidópteros, utilizadas em dietas artificiais para criação de *T. pretiosum* e *T. galloi* Zucchi e observaram diferenças quantitativas, porém a composição qualitativa se mostrou semelhante.

2.1.2.1 Proteínas

Aminoácidos livres são componentes básicos de muitas dietas artificiais, sendo que alguns parasitóides são capazes de se desenvolver em dietas compostas apenas com este componente (Thompson, 1986). A adição de aminoácidos em dietas artificiais tem mostrado melhorar o crescimento de diversos parasitóides (Greany, 1986), mas podem

ser prejudiciais se sua concentração for muito alta ou desbalanceada em relação à pressão osmótica do meio artificial (Grenier, 1994; Grenier et al., 1994). Hu & Vinson (1997), adicionando lactoalbumina no meio artificial utilizado para *C. sonorensis*, obtiveram um aumento do número de indivíduos que atingiram o segundo ínstar. Alguns dípteros parasitóides necessitam do aminoácido fenilalanina para o escurecimento da cutícula (Grenier et al., 1994).

Muitos parasitóides necessitam dos dez aminoácidos essenciais (arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina) para seu desenvolvimento (Thompson, 1981; Grenier, 1994), sendo os outros sintetizados a partir destes (Parra, 1991). Porém, muitas espécies não conseguem se desenvolver em meios compostos somente destes dez aminoácidos e necessitam de aminoácidos não essenciais para seu desenvolvimento (Grenier et al., 1994; Thompson, 1986). A incorporação de proteínas nas dietas ao invés de aminoácidos, pode evitar efeitos deletérios que podem ocorrer quando são utilizados altos níveis de aminoácidos livres, tais como a alta pressão osmótica, além de contribuir para a consistência física da dieta (Grenier et al., 1986, 1994).

As proteínas mais comumente usadas (hidrolisadas ou não) são a caseína, lactoalbumina, soroalbumina e extrato de soja. Extratos e hidrolisados de diferentes leveduras também são comuns em dietas (Bratti, 1990). Os hidrolisados são muito ativos no aumento da pressão osmótica e hidrolisados enzimáticos são menos ativos que os hidrolisados ácidos (Grenier, 1994).

Nettles Jr. (1986) realizou estudos do efeito da omissão de aminoácidos para a determinação das exigências nutricionais de *Eucelatoria bryani* Sabrosky e comprovou que a asparagina é um aminoácido essencial para o desenvolvimento e crescimento deste taquinídeo em meio artificial. Quando a asparagina foi retirada da dieta, ocorreu mortalidade de 71% das larvas de 2º ínstar e não houve formação de pupas. Mesmo quando substituída por ácido aspártico, a sobrevivência larval foi muito baixa. O autor argumentou que, através da evolução da relação hospedeiro : parasitóide, *E. bryani* sofreu mutações que acarretaram uma redução ou perda total da atividade de enzimas do

tipo asparagina sintetase e de suas peptidases, responsáveis pela transformação das proteínas ou polipeptídeos em aminoácidos.

Em estudo complementar, Nettles Jr. (1987) verificou a necessidade de *E. bryani* quanto a 10 aminoácidos livres. Quando a prolina foi retirada da dieta artificial, houve mortalidade larval de 97%. Os aminoácidos glicina e tirosina foram benéficos ao crescimento deste parasitóide, já que promoveram o aumento do número de pupas e adultos formados.

2.1.2.2 Lipídeos

Além de servirem como fonte de energia, os esteróis são necessários para um grande número de parasitóides. O colesterol é adicionado especialmente em meios artificiais desprovidos de gema de ovo. Os ácidos graxos podem ser apresentados como ácidos graxos livres ou triglicérides, mas em todos os casos, na ausência de gema de ovo é necessária a utilização de agentes emulsificantes, tais como o Tween 20 ou 80, lauril sulfato e lecitina, para que ocorra uma boa dispersão de lipídeos na dieta (Grenier, 1994). De um modo geral, a adição de ácidos graxos nas dietas artificiais aumenta a produção de adultos e a fecundidade (Grenier et al., 1986).

A gema de ovo de galinha é utilizada em muitos meios artificiais, em quantidades que variam entre 10 e 40%. Este componente é difícil de ser substituído por uma mistura de ácidos graxos, colesterol e fosfolipídeos. Além disso, a gema de ovo é uma boa fonte de proteínas, aminoácidos, lipídeos, fosfolipídeos, vitaminas e muitos minerais. Grenier & Bonnot (1988) utilizaram a gema de ovo como única fonte de lipídios em dieta artificial para *T. brassicae* Bezdenko, obtendo altas porcentagens de larvas e adultos. Nakahara et al. (2000) obtiveram bons resultados ao acrescentar lipoforina, uma mistura de lipídios que contém diacilglicerol, colesterol e fosfolipídios em dieta artificial para o endoparasitóide larval *V. canescens*.

2.1.2.3 Carboidratos

Os carboidratos também servem como fonte de energia para parasitóides (Grenier, 1994; Hu & Vinson, 1997). Alguns estudos de nutrição de parasitóides têm sido realizados na tentativa de determinar quais carboidratos são melhor utilizados pelos insetos (Nettles Jr. et al., 1980; Greany, 1986). A glucose é um importante componente em muitas dietas artificiais, servindo como fonte primária de energia. Thompson (1980, 1986) demonstrou que a glucose acrescentada à dieta artificial aumentou o crescimento larval de *Brachymeria intermedia* (Nees). Hu & Vinson (1997), ao adicionar 1% do dissacarídeo trealose em dieta artificial para *C. sonorensis*, conseguiram 100% de eclosão e larvas de primeiro ínstar com maior peso.

Carboidratos podem melhorar o crescimento, sendo a glucose, frutose (monossacarídeos) e sacarose (oligossacarídeo) os mais comuns em dietas artificiais (Grenier, 1994).

O leite de vaca também é um componente muito comum em meios artificiais, em quantidades que variam de 15-20%, sendo fonte de carboidratos, mas também de lipídeos, proteínas, sais minerais e vitaminas. No entanto, as necessidades em vitaminas são muito difíceis de serem estudadas (Grenier et al., 1986)

2.1.3 Criação *in vitro* de *Trichogramma*

A grande importância dos parasitóides do gênero *Trichogramma* em programas de Controle Biológico justifica a busca incessante de obtenção de técnicas de criação *in vitro* eficientes para sua produção em larga escala.

A primeira dieta artificial utilizada para a criação de *Trichogramma* foi composta de plasma de hemolinfa de lagartas de *Helicoverpa zea* Boddie (Hoffman et al., 1975), sendo posteriormente desenvolvidas dietas mais completas, como meios semi-sintéticos ou merídicos (Strand & Vinson, 1985; Grenier & Bonnot, 1988), ou simplesmente dietas que continham compostos como gema de ovo, suspensão de leite

em pó e anticontaminantes (Gao et al., 1982; Nettles Jr. et al., 1985; Xie et al., 1986ab; Dai et al., 1988; Grenier & Bonnot, 1988; Qin & Wu, 1988; Li, 1989).

Vários estudos foram realizados visando a obtenção de polímeros plásticos (silicone-carbamatos, polietileno, polipropileno), permitindo a obtenção de “ovos artificiais” para o acondicionamento da dieta e completo desenvolvimento do parasitóide (Morrison et al., 1983; Li et al., 1988; Grenier & Bonnot, 1988; Li, 1989). Os estudos de utilização de estimulantes de oviposição para obtenção de postura diretamente nos ovos artificiais (Rajendram, 1978ab; Nettles Jr. et al., 1982, 1983, 1985; Wu & Qin, 1982; Xie et al., 1986b; Qin & Wu, 1988; Grenier et al., 1993; Han et al., 1994), associados à utilização de anticontaminantes adequados (Grenier & Liu, 1990), possibilitaram a criação de várias espécies de *Trichogramma*. Intensos estudos da fisiologia, biologia, comportamento e nutrição destes parasitóides foram também imprescindíveis para o crescimento e desenvolvimento completo destes parasitóides em meios artificiais.

No Brasil, Parra & Cônsoli (1992) iniciaram os estudos para criação *in vitro* de *Trichogramma*. Os primeiros resultados foram obtidos com *T. pretiosum*, porém com obtenção de baixa viabilidade e um grande número de adultos deformados. Estudos subseqüentes procuraram aprimorar as técnicas de criação, obtendo resultados promissores inclusive para outra espécie, *T. galloi* (Cônsoli & Parra, 1996a, 1997a, b).

As dietas desenvolvidas apresentam em sua composição componentes provenientes de insetos, tais como hemolinfa, homogeneizado de ovos ou holotécidos pupais. Em muitos casos, essas dietas, devido à dificuldade de obtenção de certos componentes, tornam impraticável a criação do parasitóide em meio artificial (Grenier et al., 1995). O desenvolvimento de dietas holídicas (compostas por soluções de aminoácidos livres, carboidratos, ácidos graxos vitaminas e sais minerais) é fundamental para o sucesso desse método de criação, sendo adequadas para uso em sistemas de criação massal (Nordlund et al., 1997). Para o desenvolvimento desses meios artificiais são necessários estudos sobre a composição química do hospedeiro e do inimigo natural, os mecanismos de digestão dos diferentes componentes do meio de criação e as alterações da composição química do inimigo natural quando criado em diversos substratos (Yazlovetsky, 1992).

Deste modo, o próximo passo para a utilização prática da criação *in vitro* de *Trichogramma*, principalmente nos países ocidentais, é o desenvolvimento de meios artificiais sem componentes de insetos. Vários autores obtiveram o desenvolvimento de espécies de *Trichogramma* nestes meios. Meios artificiais desprovidos de componentes de insetos foram testados por Qin & Wu (1988) para *T. dendrolimi* Matsumura. O meio artificial utilizado foi composto de gema de ovo, extrato de embrião de galinha, leite de vaca e peptona, e permitiu a obtenção de adultos, porém com baixo rendimento (apenas 16%). Posteriormente, Grenier et al. (1995) obtiveram considerável sucesso com duas espécies de *Trichogramma*. Utilizando uma dieta composta de caseína, hidrolisado de levedura, hidrolisado de caseína, gema de ovo, leite de vaca, sais inorgânicos e vitaminas foram obtidas altas porcentagens de emergência e de adultos normais. Xie et al. (1997) testaram diversas dietas sem componentes de insetos para *T. minutum* e *T. brassicae* Bezdenko e obtendo 94% de pupas e 28% de adultos.

Atualmente, busca-se a substituição da hemolinfa utilizada em dietas artificiais por culturas de células de insetos, que são de fácil manutenção em condições de laboratório, apresentam alta qualidade e podem ser produzidas em quantidade, com a utilização de bioreatores (Notarte & Merritt, 2001). Estes mesmos autores substituíram com sucesso a hemolinfa de uma dieta artificial utilizada para criação de *T. australicum* Girault por células de *H. zea* multiplicadas em meio de cultura. Foram obtidas maior emergência e elevada proporção de adultos normais. Além disto, fêmeas provenientes desta dieta foram mais fecundas em relação às fêmeas criadas em dieta elaborada com hemolinfa. O desenvolvimento deste tipo de dieta artificial, poderá revolucionar o modo de produção do parasitóide, permitindo a introdução de sistemas automatizados de produção massal (Nordlund et al., 1997).

A multiplicação de *Trichogramma* em meio artificial por várias gerações sucessivas é também um fator relevante. Na China, Gao et al. (1982) conseguiram criar *T. dendrolimi* em dieta artificial por 35 gerações e Liu et al. (1995b) relataram a criação de *T. minutum* por 5 gerações em meio artificial. No ocidente, Nordlund et al. (1997) criaram esta mesma espécie de *Trichogramma* por dez gerações sucessivas em dieta

artificial com componentes de insetos. No entanto, os adultos obtidos em todas as gerações apresentaram mais deformações em relação aos obtidos *in vivo*.

A utilização da criação *in vitro* em sistemas de produção massal de *Trichogramma* para liberações inundativas de parasitóides produzidos *in vitro*, tem sido dominada exclusivamente pelos chineses, que já desenvolveram técnicas para liofilização do meio artificial (para armazenamento por longos períodos) e sistemas semi-automatizados de produção (Dai et al., 1991; Liu et al., 1992, 1995a). O sucesso na criação desses parasitóides na China está associado à facilidade de obtenção de componentes de insetos hospedeiros, tais como hemolinfa, homogeneizado de ovos ou holotecidos pupais, que são componentes indispensáveis nas dietas oligídicas utilizadas na criação *in vitro* de *Trichogramma* (Xie et al., 1986b; Strand & Vinson, 1985).

Dai et al. (1991) relataram que a produção diária de *Trichogramma in vitro* na China pode atingir 30 a 43 milhões de indivíduos de *T. dendrolimi* e de 17 a 23 milhões de *T. chilonis* Ishii, com um custo 50% menor que em sistemas de criação convencionais. Estes parasitóides foram liberados em 1300 hectares, com parasitismo superior a 80%.

Para visualizar o sucesso da criação *in vitro* destes parasitóides na China, Zhang & Cao (1993) utilizaram pupas de *Trichogramma* provenientes de dieta artificial na criação de ácaros predadores fitoseídeos. Após duas gerações, estes ácaros foram eficientes no controle de *Panonychus citri* (McGregor) em pomares de citros.

2.2 Considerações sobre o simbiote do gênero *Wolbachia*

Wolbachia é uma alfa - proteobactéria gram negativa pertencente à Família Rickettsiaceae, que está presente principalmente nos tecidos reprodutores de seus hospedeiros (ovários e testículos) (Werren, 1997a). A disponibilidade de técnicas moleculares, tais como a reação de polimerase em cadeia (PCR) acelerou rapidamente os estudos com este simbiote extremamente disseminado entre os artrópodos (Stouthamer et al., 1999). Estudos realizados por Werren et al. (1995) indicaram que cerca de 16%

das espécies da Ordem Insecta estariam infectadas por *Wolbachia*. No entanto, estudos recentes, utilizando nova técnica de PCR para detecção deste simbiote, indicaram que 76% das espécies de artrópodos testados estavam infectados, incluindo 12 ordens de insetos (Jeyaprakash & Hoy, 2000). Estes simbioses também estão presentes em crustáceos e ácaros (Rousset et al., 1992; Johanowicz & Hoy, 1996), além de várias espécies de nematóides do grupo das filárias (Bandi et al., 1998). Esta ampla distribuição de *Wolbachia* despertou o interesse da comunidade científica mundial na última década, já que este simbiote pode estar envolvido em processos de rápida especiação (Breeuwer & Werren, 1990; Werren, 1997a; Rokas, 2000), além de auxiliar estudos básicos da reprodução de seus hospedeiros (Stouthamer & Kazmer, 1994). Também preconiza-se utilização prática de *Wolbachia* no Controle Biológico de Pragas, visto que a reprodução telítica poderia aumentar o rendimento de criações massais e permitiria a liberação em campo somente de indivíduos eficientes no controle da praga alvo (Stouthamer, 1993) e até mesmo utilizar estes simbioses como vetores para modificação genética em populações de insetos (Sinkins & O'Neill, 2000).

2.2.1 Biologia dos simbioses do gênero *Wolbachia*

Os efeitos da infestação por *Wolbachia* em seus hospedeiros estão sempre relacionados com a reprodução (Werren, 1997a). Os dois principais incluem a incompatibilidade citoplasmática (Breeuwer & Werren, 1990) e a indução de partenogênese telítica (Stouthamer, 1993). Estes simbioses podem causar ainda efeminação de machos em crustáceos isópodos (Rousset et al., 1992) e morte de machos (“male-killing”) em coccinelídeos (Hurst et al., 1996). Estes simbioses são herdados pela progênie através do citoplasma do ovo (Stouthamer et al., 1994).

2.2.1.1 Partenogênese telítoca

No caso de *Trichogramma* a infestação por *Wolbachia* está relacionada com a partenogênese telítoca, observada em diversas espécies de himenópteros parasitóides (Stouthamer, 1993; Stouthamer & Werren, 1993). Estes insetos são haplo-diplóides, ou seja, os machos têm n cromossomos (haplóides), enquanto as fêmeas são $2n$ (diplóides), e apresentam, em sua maioria, reprodução bissexuada. Deste modo, um ovo não fecundado dá origem a macho e um ovo fecundado dá origem a fêmea e portanto, fêmeas acasaladas apresentam os dois sexos em sua descendência, enquanto fêmeas virgens dão origem somente a machos. No entanto, existem espécies que apresentam partenogênese telítoca, onde uma fêmea virgem dá origem somente a fêmeas, devido a um fenômeno de diploidização, freqüentemente associado à presença de *Wolbachia* (Stouthamer & Kazmer, 1994). Quando infectados com o simbiote, ocorre uma mitose anormal nos ovos não fecundados e há uma falha no momento da anáfase da primeira divisão mitótica e assim, ovos haplóides tornam-se diplóides e se desenvolvem transformando-se em fêmeas telítocas (Stouthamer & Kazmer, 1994).

Estudos realizados por Cabello & Vargas (1985) demonstraram que a criação da espécie telítoca *T. cordubensis* Vargas & Cabello em temperaturas mais elevadas, induziam o aparecimento de machos na descendência. Posteriormente, Stouthamer et al. (1990) obtiveram resultados semelhantes com outras espécies de *Trichogramma*, submetendo-as não só a tratamento térmico, como também a antibióticos (tetraciclina e rifampicina), o que indicou que a telitoquia destas espécies estaria ligada a um microorganismo, provavelmente de natureza microbiana. Trabalhos subsequentes revelaram a associação com *Wolbachia* (Stouthamer et al., 1993).

Pintureau et al. (1999) demonstraram que estes simbiossomas podem se adaptar a altas temperaturas, explicando em parte a sua distribuição entre diversas populações hospedeiras, mesmo em países de clima tropical. Recentemente, Ciociola Jr. et al. (2001), detectaram a presença de *Wolbachia* em uma população brasileira de *T. atopovirilia* Oatman & Platner.

2.2.1.2 Incompatibilidade citoplasmática (IC)

A incompatibilidade citoplasmática (IC) é o efeito mais comumente encontrado na reprodução de artrópodos (Werren, 1997b; Stouthamer et al., 1999). Ela pode ser encontrada de duas formas, denominadas uni e bidirecional. A incompatibilidade citoplasmática unidirecional ocorre em cruzamentos entre machos infectados pelo simbionte e fêmeas não infectadas, resultando na morte do zigoto (em espécies diplóides) ou na produção de machos (em espécies de reprodução haplodiplóide). Todos os outros tipos de cruzamentos são compatíveis (Hoffmann et al., 1990). A incompatibilidade citoplasmática bidirecional ocorre quando um macho e uma fêmea abrigam tipos diferentes de *Wolbachia* e o cruzamento é incompatível (Breeuwer & Werren, 1990). A infecção por *Wolbachia* pode ser múltipla, isto é, diferentes tipos de *Wolbachia* no mesmo hospedeiro, e neste caso populações da mesma espécie que abrigam diferentes tipos de *Wolbachia* podem ser incompatíveis (Werren, 1997a; Dobson et al., 2001).

O mecanismo de ação é desconhecido, mas há evidências de que a expressão da incompatibilidade citoplasmática seja devida a uma inadequada condensação dos cromossomos paternos durante a mitose (Breeuwer & Werren, 1990). Os cromossomos paternos são eliminados, o que implica no aparecimento de embriões haplóides. Assim, em espécies diplóides, estes embriões podem morrer, e em espécies de reprodução haplodiplóide, se desenvolverem como machos (Stouthamer et al., 1999).

A presença de *Wolbachia* causa uma modificação nos espermatozóides e o mesmo tipo de *Wolbachia* deve estar presente no ovo para que esta modificação seja anulada (Werren, 1997b). A densidade de infestação por *Wolbachia* está correlacionada à expressão da incompatibilidade citoplasmática. Breeuwer & Werren (1993) relataram que em indivíduos parcialmente livres do simbionte, através de tratamento antibiótico, a incidência da incompatibilidade citoplasmática decresceu em relação a indivíduos que não foram submetidos ao tratamento.

2.2.2 Implicações do uso de linhagens telítocas de *Trichogramma* no Controle Biológico

A reprodução telítoca em *Trichogramma* pode ser uma vantagem para o Controle Biológico, visto que as fêmeas são as responsáveis pela eliminação de espécies de pragas (Stouthamer & Luck, 1993). Além disso, a utilização de linhagens infectadas por *Wolbachia* pode ser mais adequada para o controle de pragas, já que todos os descendentes produzidos são fêmeas (Stouthamer et al., 1999). A liberação inicial de linhagens telítocas proporciona uma redução rápida da população da praga e favorece o estabelecimento da população do parasitóide em campo. Liberações posteriores de linhagens de reprodução sexuada são recomendadas para restaurar a variabilidade genética da população já estabelecida (Aeschlimann, 1990).

Stouthamer (1993) relacionou algumas vantagens do uso de linhagens telítocas de *Trichogramma*: i) rápido crescimento populacional da população, ii) redução no custo da produção, pois não ocorre desperdício para a produção de machos e iii) fácil estabelecimento no campo, já que populações arrenótocas devem acasalar para que ocorra a produção de fêmeas. Quando a população do parasitóide é baixa, o acasalamento entre machos e fêmeas pode ser dificultado. Fêmeas que apresentam reprodução telítoca continuam a se reproduzir mesmo em baixas populações hospedeiras.

Em estudos realizados em casa-de-vegetação, Silva (1999) e Meer (1999) concluíram que linhagens telítocas de *T. cordubensis* e *T. deion* Pinto & Oatman foram mais eficientes no parasitismo que linhagens de reprodução arrenótoca.

A liberação de linhagens telítocas pode ser uma vantagem simplesmente porque sempre produzem fêmeas e não necessitam de machos para acasalamento para produzir descendentes, enquanto em populações arrenótocas a produção de fêmeas pode cair drasticamente quando a densidade do hospedeiro for baixa (Stouthamer, 1993; Stouthamer & Luck, 1993). Quando a liberação ocorrer com densidade alta de hospedeiros, a escolha entre uma linhagem telítoca ou arrenótoca deve depender da taxa de crescimento da população, adaptação ao ambiente e custos de produção (Stouthamer

et al., 1999; Silva, 1999). Para liberações inundativas, a adaptação ao meio ambiente e a taxa de crescimento têm menor importância e preconiza-se a liberação de indivíduos de reprodução telítica, devido ao menor custo de produção por fêmea (Stouthamer, 1993).

Grenier et al. (1998b) mostraram ser possível a transferência de *Wolbachia* entre duas espécies de *Trichogramma*, visando a obtenção de linhagens telíticas para uso em Controle Biológico. Pupas de *T. dendrolimi* criadas *in vitro* receberam microinjeções de uma suspensão de *Wolbachia* preparada a partir de indivíduos infectados de *T. pretiosum*. Após três gerações da microinjeção, resultados positivos da infecção por *Wolbachia* foram obtidos para *T. dendrolimi*. No entanto, a expressão da telitoquia foi limitada, provavelmente devido a uma baixa densidade do simbiote nas linhagens microinjetadas ou por algum outro fator ligado ao genótipo do hospedeiro, linhagem de *Wolbachia* ou uma interação destes fatores. Posteriormente, Pintureau et al. (2000) observaram uma baixa e decrescente infecção por *Wolbachia* na linhagem de *T. dendrolimi* microinjetada, indicando uma possível eliminação progressiva do simbiote ao curso das gerações, devido a falta de adaptação simbiote-hospedeiro.

2.2.3 Efeitos do simbiote *Wolbachia* em seus hospedeiros

Os efeitos da infecção por *Wolbachia* em seus hospedeiros estão geralmente relacionados à sua reprodução (Johanowicz & Hoy, 1998). No entanto, os estudos realizados mostram resultados divergentes, mesmo em se tratando da mesma espécie de inseto. Por exemplo, Poinot & Merçot (1997) não encontraram efeitos negativos da presença de *Wolbachia* em *Drosophila simulans* Sturtevant, contrariamente aos resultados obtidos para este mesmo inseto por Hoffmann et al. (1990). Estes autores encontraram em laboratório, mas não em campo, uma redução de 18% na fecundidade de fêmeas de *D. simulans* infectadas por *Wolbachia*. Em *Nasonia vitripennis* (Walker) Bordenstein & Werren (2000), após um rigoroso controle do “background” genético dos insetos, não encontraram evidências de efeito negativo do simbiote na fecundidade,

sendo que Stolk & Stouthamer (1996) relataram, para esta mesma espécie de parasitóide, diminuição da fecundidade de fêmeas infectadas.

Em estudos realizados com *Muscidifurax uniraptor* Kogan & Legner e *Encarsia formosa* Gahan, Stouthamer et al. (1994) não encontraram diferenças na longevidade ou fecundidade de linhagens tratadas ou não com antibiótico para nenhuma das duas espécies. Para a primeira espécie de parasitóide Zchori-Fein et al. (2000) também não encontraram efeitos negativos na longevidade, fecundidade, e sobrevivência de linhagens com diferentes densidades de infecção pelo simbiote.

Wang & Schmidt (1996) compararam duas populações de *T. minutum*, uma arrenótoca e outra telítoca, provenientes do mesmo hospedeiro. A população arrenótoca parasitou 1,9 vezes mais ovos de *A. kuehniella* em relação às fêmeas de reprodução telítoca. Os autores concluíram que esta diferença está relacionada ao número de ovos presentes nos ovários das fêmeas, visto que enquanto na população de reprodução arrenótoca este número aumentou de acordo com a idade do parasitóide, em fêmeas telítocas permaneceu estável. Stouthamer & Luck (1993) compararam a fecundidade de linhagens de *T. pretiosum* e *T. deion* infectadas e livres do simbiote através de tratamento antibiótico. Em ambas as espécies, fêmeas infectadas apresentaram fecundidade reduzida em relação às de reprodução arrenótoca. Contrariamente, Girin & Boulétrau (1995) determinaram que em *T. bourarachae* Pintureau & Babault, fêmeas infectadas pelo simbiote produziram quase duas vezes mais descendentes em relação a fêmeas não infectadas.

Em muitos casos citados, os experimentos foram realizados com diferentes linhagens de *Wolbachia* presentes em diversos hospedeiros. Assim, o fato de diferentes linhagens de *Wolbachia* levarem a diferentes efeitos em hospedeiros proximamente relacionados sugere que estes efeitos são devidos mais ao tipo de simbiote do que à espécie hospedeira (Charlat & Merçot, 2000).

Recentemente, Dobson et al. (1999) encontraram *Wolbachia* em outros tecidos de diversas espécies de insetos, além dos tecidos reprodutivos (ovários e testículos), tais como cérebro, músculos torácicos, glândulas salivares, intestino, corpo gorduroso, túbulos de Malpighi, hemolinfa e asas. Estas infecções somáticas podem ser benéficas

aos simbioses, favorecendo assim sua transmissão horizontal. Vavre et al. (1999b) inferiram que parasitóides podem ser mais susceptíveis à transmissão horizontal de *Wolbachia*, visto que podem contrair os simbioses de seus hospedeiros quando se desenvolvem como larvas e consomem o hospedeiro. A transferência de *Wolbachia* de parasitóides para seus hospedeiros é menos provável, pois hospedeiros parasitados não sobrevivem.

Schilthuisen & Stouthamer (1997) compararam através de técnicas moleculares a filogenia de 20 linhagens diferentes de *Trichogramma* e as *Wolbachia* a elas associadas e observaram que espécies diferentes do parasitóide podem abrigar *Wolbachia* semelhantes. Deste modo, os autores sugerem que a transmissão do simbiote entre *Trichogramma* pode ocorrer em casos de parasitismo por mais de uma espécie de parasitóide. Esta hipótese foi confirmada por Huigens et al. (2000) que relataram a transmissão de *Wolbachia* entre indivíduos de *T. kaykai* Pinto & Stouthamer que compartilharam o mesmo hospedeiro durante o desenvolvimento préimaginal. A possibilidade de transmissão vertical dos simbioses adquiridos pelas fêmeas foi confirmada, e embora tenha sido ineficiente na primeira geração, a partir da terceira geração foi de 100%. O processo pelo qual as larvas de *Trichogramma* adquiriram *Wolbachia* é desconhecido, mas os autores apresentam algumas hipóteses. A transmissão pode ocorrer pelo contato entre hemolinfa de larvas através de feridas ocasionadas pelo contato larval dentro do ovo hospedeiro ou então, uma fêmea infectada pode injetar *Wolbachia* no momento da oviposição e as larvas podem adquirir o simbiote por ingestão ou pelas feridas anteriormente mencionadas.

Um novo efeito do simbiote foi relatado por Dedeine et al. (2001) em *Asobara tabida* Nees, um parasitóide de pupas de *Drosophila*. Nestes insetos, a infecção por *Wolbachia* é obrigatória, pois na sua ausência não ocorre a oogênese, indicando uma relação de mutualismo obrigatório, sem o qual não ocorre a reprodução da espécie.

3. DESENVOLVIMENTO DE *Trichogramma pretiosum* RILEY, 1879 EM MEIOS ARTIFICIAIS

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento biológico de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 em diferentes meios artificiais. Foram avaliados o número de larvas por ovo artificial, as porcentagens de emergência e de adultos normais e também foram realizadas análises do conteúdo protéico das pupas provenientes dos meios artificiais. Foi estudado o efeito do componente de inseto (hemolinfa ou holotecdos pupais de *Mamestra brassicae* L.) utilizado na confecção do meio artificial. Também foram avaliados meios elaborados com hemolinfa pupal de *M. brassicae*, enriquecidos com as proteínas caseína e soroalbumina bovina em duas concentrações finais (1,6 e 3,2% para a caseína e 1,75 e 3,5% para a soroalbumina bovina). A utilização de holotecdos foi mais adequada em relação à hemolinfa, já que proporcionou maior emergência, bem como deu origem a pupas com maior conteúdo protéico. A adição de caseína na concentração mais elevada inibiu o parasitismo de *T. pretiosum* no meio artificial, afetando as taxas de emergência do parasitóide, no entanto, a produção de adultos normais foi maior. Na maior concentração de soroalbumina o parasitismo foi menor em relação ao obtido com a concentração de 1,75% da proteína. Além disto, a adição desta proteína proporcionou maiores taxas de emergência e de adultos normais. Independente da proteína adicionada ao meio artificial, a quantidade de proteínas presentes nas pupas originadas aumentou de acordo com o aumento da concentração utilizada. Os resultados das análises da composição de aminoácidos revelou semelhanças

qualitativas, mas houve diferenças quantitativas em pupas provenientes dos diferentes meios artificiais.

PALAVRAS-CHAVE: criação *in vitro*, *Trichogramma*, parasitóide de ovos, análises bioquímicas, Controle Biológico, proteína

Summary

The goal of this work was to evaluate the biological development of *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 in different artificial media. The number of larvae per artificial egg, the emergence and normal adult percentages were evaluated and the protein content analyses of pupae deriving from the artificial media were performed. The effect of the insect component (hemolymph or pupal holotissues of *Mamestra brassicae* L.) used in the elaboration of the artificial medium was studied. One also evaluated the media elaborated with pupal hemolymph of *M. brassicae*, enriched with casein and bovine serum albumin proteins at two final concentrations (1.6 and 3.2% casein and 1.75 and 3.5% bovine serum albumin). The use of holotissues was more adequate than that of the hemolymph, since it provided higher emergence, and gave rise to higher protein content pupae. The addition of casein at higher concentration inhibited the parasitism of *T. pretiosum* in the artificial medium, affecting the emergence rates of the parasitoid, however, the production of normal adults was higher. At the higher serum albumin concentration the parasitism was lower in relationship with that obtained with the addition of 1.75% of that protein. Moreover, the addition of that protein provided higher emergence rates and normal adults. Regardless of the protein added to the artificial medium, the amount of proteins found in the originated pupae increased as the concentration used increased. The results of the amino acid composition analyses showed qualitative similarities, although quantitative differences in pupae deriving from different artificial media occurred.

KEY WORDS: *in vitro* rearing, *Trichogramma*, egg parasitoid, biochemical analysis, Biological Control, protein

3.1 Introdução

Para programas de Controle Biológico Aplicado são necessárias criações massais de insetos, pois são exigidas liberações inundativas. Para que estes insetos sejam produzidos em quantidade suficiente é necessária a criação de outra espécie de inseto, o hospedeiro natural ou alternativo, o que aumenta os custos de produção, podendo inclusive inviabilizar a utilização destes agentes de controle (Grenier, 1994). Para simplificar o sistema de produção, muitos estudos apontam para o desenvolvimento de técnicas que permitam a criação de parasitóides em meios artificiais (criação *in vitro*) (Grenier, 1994). Além desta aplicação prática, o domínio desta técnica permitirá avanços significativos em estudos nas áreas de biologia, fisiologia, comportamento (Grenier et al., 1986, 1994) e até mesmo facilitar o desenvolvimento de populações de inimigos naturais resistentes a inseticidas (Grenier, 1997), para sua utilização em programas de manejo de pragas.

Atualmente, tem sido grande o interesse no desenvolvimento de técnicas de produção de parasitóides *in vitro*, devido às suas aplicações práticas, principalmente a produção destes inimigos naturais em larga escala. Esta técnica de produção vem sendo muito estudada em alguns países, principalmente nos EUA (Xie et al., 1986ab), Itália (Bratti, 1990), França (Grenier et al., 1993) e China (Li, 1989), sendo que o Brasil é o único país na América Latina a desenvolver pesquisas na área de produção de inimigos naturais *in vitro* (Parra & Cònsoli, 1992; Cònsoli & Parra, 1996a, 1997a). No Brasil o primeiro inseto a ser criado *in vitro*, foi o parasitóide de ovos de lepidópteros *Trichogramma pretiosum* Riley, porém com baixa viabilidade e grande número de adultos deformados (Parra & Cònsoli, 1992).

Embora a criação *in vitro* de parasitóides venha sendo objeto de muitos estudos, principalmente nas últimas décadas, ainda são muitas as dificuldades a serem superadas para obtenção do desenvolvimento completo de um parasitóide em dietas artificiais, sendo poucas as espécies criadas em tais meios (Grenier et al., 1986).

Um exemplo de sucesso da utilização da criação *in vitro* no controle de pragas é *Trichogramma dendrolimi* Matsumura e *T. chilonis* Ishii, criados massalmente em dieta artificial e utilizados em liberações inundativas para o controle de lepidópteros pragas na China (Li, 1989). No entanto, as dietas utilizadas apesar de apresentarem grande proporção de componentes de inseto como ingrediente básico, ainda apresentam baixo valor protéico em relação ao encontrado em ovos hospedeiros (Grenier et al., 1995).

Assim, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar diferentes meios artificiais no desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879. Para tanto, foram avaliados aspectos da biologia do parasitóide em meios artificiais elaborados com diferentes componentes de insetos (hemolinfa ou holotécidos de *Mamestra brassicae* L.) e estudou-se a possibilidade de aumentar o conteúdo protéico de meios artificiais através da adição das proteínas caseína e soroalbumina bovina.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Manutenção das linhagens de *Trichogramma*

O trabalho foi desenvolvido no Laboratoire de Biologie Fonctionnelle, Insectes et Interactions, do Institut National des Sciences Appliquées de Lyon (INSA), em Villeurbanne, França, com *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, estudando-se parâmetros biológicos em diferentes meios artificiais.

Para a manutenção do parasitóide, ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (fornecidos pela Biotop®) inviabilizados em lâmpada germicida, eram colados com

goma arábica diluída em água (50%), sobre cartolina branca (8,0 x 12,0 cm). Os cartões, assim obtidos, eram fornecidos aos parasitóides em frascos de vidro (16,0 x 10,0 cm), na proporção de 1 parasitóide : 10 ovos do hospedeiro. O parasitismo era permitido por 24 horas em câmaras climatizadas, reguladas à temperatura de $23 \pm ^\circ\text{C}$, Umidade Relativa de $75 \pm 5\%$ e fotofase de 16 horas

3.2.2 Metodologia de criação *in vitro* de *Trichogramma*

3.2.2.1 Confeção dos ovos artificiais, composição e preparo dos meios artificiais

A metodologia para a criação de *T. pretiosum in vitro* foi baseada na de Grenier & Liu (1990) (Figura 1). Os ovos artificiais consistiam de cúpulas semi-esféricas, confeccionadas em filme de polietileno de 15 μm de espessura. Para a confeção destes ovos plásticos era utilizada uma matriz perfurada, onde os ovos eram moldados manualmente com a introdução de um bastão de vidro no filme plástico esticado sobre a matriz. As cúpulas semi-esféricas eram dispostas segundo uma matriz de 5 x 6, com capacidade para cerca de 5 μl de dieta em cada ovo artificial. O filme plástico contendo os ovos artificiais assim confeccionados era esterilizado sob lâmpada germicida por duas horas de cada lado, para evitar a contaminação do meio artificial por agentes microbianos (fungos e bactérias). Para estimular a postura dos parasitóides no meio artificial, era depositada uma fina camada de álcool polivinil (PVA) na parte convexa de cada ovo artificial (Han et al., 1994). Este filme era então transferido para placas plásticas de 5 cm de diâmetro, com a parte convexa voltada para baixo e as cavidades preenchidas com o meio artificial. Este conjunto era então oferecido ao parasitismo, sendo a parte superior da placa plástica utilizada para fechar o sistema. As placas eram acondicionadas dentro de caixas plásticas contendo uma solução saturada de NaCl, para manter a umidade em torno de 75%, e levadas à temperatura de 23°C com fotofase 16h. Todos estes procedimentos eram conduzidos em condições estéreis, em câmara de fluxo laminar.

Figura 1 – Esquema para criação *in vitro* de *Trichogramma* (adaptado de Grenier & Liu, 1990)

O meio artificial utilizado foi composto de 40% de componentes de insetos (holotecidos totais ou hemolinfa de pupas de *Mamestra brassicae* L.), 20% de gema de ovo de galinha, 20% de leite semi-desnatado, 10% de solução de sais de Neisenheimer e 10% de água destilada. Após a mistura dos ingredientes, o meio artificial foi centrifugado a 2000g por 20 minutos à temperatura de 4°C. O precipitado foi descartado, e o sobrenadante utilizado no sistema de criação. As proteínas caseína e soroalbumina bovina foram incorporadas à solução de sais de Neisenheimer, à água destilada e ao leite utilizados na preparação do meio artificial, de modo a obter meios artificiais com concentrações finais de 1,6 e 3,2% para a caseína e 1,75 e 3,5% para a soroalbumina bovina. Deste modo, foram elaborados 6 meios artificiais com as seguintes composições:

- Básico: 40% de hemolinfa pupal de *M. brassicae*, 20% de gema de ovo de galinha, 20% de leite semi-desnatado, 10% de solução de sais de Neisenheimer e 10% de água destilada;

- Holotecidos: 40% de holotecidos pupais de *M. brassicae*, 20% de gema de ovo de galinha, 20% de leite semi-desnatado, 10% de solução de sais de Neisenheimer e 10% de água destilada;

- Caseína 1,6%: Básico + 1,6% de caseína (concentração final);

- Caseína 3,2%: Básico + 3,2% de caseína (concentração final);

- Soroalbumina 1,75%: Básico + 1,75% de soroalbumina bovina (concentração final);

- Soroalbumina 3,5%: Básico + 3,5 % de soroalbumina bovina (concentração final);

Para a coleta dos componentes de insetos utilizados nas dietas artificiais, pupas de *M. brassicae* em diapausa (para evitar diferenças na composição deste componente devido à utilização de pupas de diferentes idades) foram lavadas em água corrente e em seguida esterilizadas superficialmente em solução aquosa de ácido bórico 3% por 10 minutos. Após este período, as pupas foram submetidas a um tratamento térmico em banho-maria a 60°C por 6 minutos para a inativação das fenoloxidasas (Shapiro & Ignoffo, 1973). Para a coleta de hemolinfa, foi realizada uma incisão na parte anterior das pupas que foram então pressionadas pela parte posterior, sendo a hemolinfa extravasada coletada em um frasco estéril e, a seguir, armazenada a -20°C. Para a coleta de holotecidos, as pupas foram espremidas em uma seringa plástica estéril com capacidade para 20 ml. O produto obtido foi centrifugado a 500g por 5 minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C. Todos os procedimentos de coleta foram realizados em condições estéreis, em capela de fluxo laminar.

3.2.3 Comparação de meios artificiais

Foram estudados parâmetros de desenvolvimento de *T. pretiosum* (linhagem t191) nas dietas artificiais (item 3.2.2.1.). Primeiramente, comparou-se a utilização de holotecido ou hemolinfa pupal de *M. brassicae* como componente derivado de inseto no meio artificial. Outros dois experimentos foram realizados, o primeiro para avaliar o efeito da adição da proteína caseína ao meio artificial, nas concentrações de 1,6 e 3,2%; e o segundo para avaliar o efeito da adição de soroalbumina bovina, nas concentrações finais de 1,75 e 3,5%. Nos três experimentos foram realizadas 5 repetições para cada tratamento.

Os parâmetros avaliados foram o número de larvas por ovo artificial (parasitismo) e as porcentagens de emergência e de adultos normais em cada tratamento. Para avaliar o parasitismo dos ovos artificiais, foram amostrados 60 ovos artificiais de cada tratamento. Após 48 horas do parasitismo as placas plásticas foram congeladas a uma temperatura de -20°C . Após o congelamento, o conteúdo de cada ovo artificial foi colocado sobre uma lâmina de microscopia e, após o descongelamento, o número de larvas por ovo artificial foi contado sob microscópio estereoscópico. Para avaliação das porcentagens de emergência e de adultos normais, 72 horas após o início da emergência, os indivíduos foram mortos por congelamento à temperatura de -20°C . Todo o conteúdo das placas foi colocado cuidadosamente em placa de Petri de 5cm de diâmetro. Foram realizadas 10 amostragens de 30 indivíduos cada, onde foram contados o número de pupas e o número de adultos (normais ou deformados). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. As pupas obtidas nestes ensaios foram analisadas quanto a sua composição em aminoácidos totais.

3.2.4 Análises em composição de aminoácidos.

A composição de aminoácidos foi avaliada nas pupas dos parasitóides provenientes dos diferentes meios artificiais. Para tanto o material foi submetido a hidrólise ácida e as medidas foram realizadas em analisador Beckman 6300 (Grenier et al., 1995).

As pupas de *T. pretiosum* destinadas à hidrólise foram pesadas em balança de alta precisão, em grupos de 20 em balanças calibradas e adequadas para amostragem de pequenas quantidades de material. A hidrólise foi realizada sob nitrogênio, em vapor de HCl a 110°C por 24 horas, utilizando coluna Pico-Tag Station (Waters, St Quentin Les Yvelines, France) contendo 2-mercaptoetanol (4%) para preservação de aminoácidos sulfúricos. Após a hidrólise, foi adicionado ácido glucosamínico como padrão interno. As amostras foram então evaporadas sob vácuo (Speed Vac) e em seguida foram adicionados 100µl de tampão lítio-citrato 0,05 M, pH 2,2.

Uma amostra de 50 µl foi submetida ao analisador de aminoácidos Beckman 6300, no qual os aminoácidos foram detectados através de reação com nihidrina, identificados pelo tempo de retenção e taxa de comprimento de onda, e quantificados por sua absorção a 570 nm (440 nm para o aminoácido prolina).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 em diferentes meios artificiais

O meio artificial confeccionado com holotécidos pupais de *Mamestra brassicae* L. foi mais adequado nutricionalmente em relação ao meio que contém hemolinfa, visto que proporcionou maior porcentagem de emergência de *T. pretiosum*. Embora não tenha havido diferença estatística, pelo menos numericamente houve uma tendência à formação de maior porcentagem de adultos normais (Tabela 1). Isto pode ter ocorrido

devido à presença de outros fatores, além da hemolinfa, que estão presentes nos holotécidos pupais, tais como proteínas, aminoácidos, carboidratos e lipídeos. Cònsoli & Parra (1996b) também obtiveram resultados mais promissores na criação de duas espécies de *Trichogramma* (*T. galloi* Zucchi e *T. pretiosum*) quando utilizaram holotécidos pupais de *Bombyx mori* L. como componente da dieta artificial. Estes autores obtiveram para *T. galloi*, 100% de mortalidade larval na dieta confeccionada a partir da hemolinfa de larvas de *B. mori*, enquanto na dieta contendo holotécidos pupais, os parasitóides se desenvolveram até a fase de pupa. Para *T. pretiosum* ocorreu o completo desenvolvimento na dieta preparada com holotécidos pupais.

Tabela 1. Emergência (%) e indivíduos normais (%) de *Trichogramma pretiosum* criado em meio artificial confeccionado com hemolinfa ou holotécidos pupais de *Mamestra brassicae*. Temperatura $23 \pm 0,5$ °C; Umidade Relativa $75 \pm 5\%$ e fotofase 16 horas.

Meio Artificial	Emergência (%) [*]	Adultos Normais (%) [*]
Holotécidos	$80,67 \pm 1,63$ a	$25,20 \pm 3,62$ a
Hemolinfa	$68,37 \pm 1,55$ b	$19,78 \pm 3,35$ a

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

As análises da composição de aminoácidos totais das pupas provenientes dos dois meios artificiais demonstraram que o meio artificial contendo holotécidos pupais é mais rico levando, como consequência, a uma maior adequação nutricional, visto que pupas desenvolvidas em meio artificial contendo holotécidos pupais apresentaram maior quantidade de proteína ($83,77 \mu\text{g}/\text{mg}$), enquanto pupas de insetos provenientes do meio contendo hemolinfa apresentaram valores menores ($67,1 \mu\text{g}/\text{mg}$) de proteína (Figura 2). Na observação da análise mais detalhada, observou-se que há uma semelhança qualitativa dos aminoácidos encontrados nas pupas de *T. pretiosum* criadas nos dois meios artificiais, porém há diferença quantitativa para todos os aminoácidos analisados (Figura 3).

Figura 2 – Quantidade (µg/mg) total de aminoácidos presentes em pupas de *Trichogramma pretiosum* criadas em meio artificial confeccionado com hemolinfa ou holotécidos pupais de *Mamestra brassicae*.

Figura 3 – Composição e quantidade (µg/mg) em aminoácidos de pupas de *Trichogramma pretiosum* criadas em meio artificial confeccionado com hemolinfa ou holotécidos de *Mamestra brassicae*.

No segundo grupo de dietas testado, observou-se que a adição de caseína ao meio artificial na concentração de 1,6% não afetou a taxa de parasitismo nos ovos artificiais, e quando a concentração desta proteína foi de 3,2% o número de larvas por ovo artificial decresceu (Figura 4). Esta diferença no parasitismo deve estar relacionada a diversos fatores que afetam a postura de *Trichogramma* em meios artificiais, tais como sais (Nettles Jr. et al., 1982, 1983), glucose, hidrolisados de proteínas e aminoácidos livres, pois estas substâncias, dependendo da concentração, podem inibir a oviposição (Nettles Jr. et al., 1985), o que provavelmente ocorreu quando da adição de caseína na concentração mais elevada.

Figura 4 - Parasitismo de *Trichogramma pretiosum* em meio artificial elaborado com hemolinfa de *Mamestra brassicae* (Básico) e com adição de caseína em duas concentrações. Temperatura $23 \pm 0,5$ °C; Umidade Relativa $75 \pm 5\%$ e fotofase 16 horas. (Colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade)

No meio artificial enriquecido com caseína na concentração de 1,6%, ocorreu maior emergência em relação ao meio básico e naquele contendo caseína na concentração de 3,2% (Tabela 2). A menor emergência no meio artificial contendo 3,2% de caseína em relação ao meio com 1,6% desta proteína é explicada pela menor taxa de parasitismo ocorrida no meio contendo 3,2%, visto que o completo desenvolvimento dos parasitóides depende do número de ovos colocados por ovo artificial, já que as larvas de *Trichogramma* não conseguem regular a ingestão de alimento (Grenier et al., 1995) e continuam a se alimentar enquanto houver meio artificial (Strand & Vinson, 1985). Assim, se o número de ovos for pequeno, pode ocorrer a formação de larvas muito grandes, que são incapazes de se transformar em pupas (Strand & Vinson, 1985; Grenier et al., 1998a). Deste modo, o ajuste do número de ovos colocados nos ovos artificiais em relação à quantidade de meio artificial disponível para o desenvolvimento do parasitóide é importante neste tipo de estudo. As técnicas relatadas para a solução deste problema incluem o bombeamento do meio artificial restante logo após o término do desenvolvimento larval (Strand & Vinson, 1985; Cônsoli & Parra, 1997b), bem como a coleta de ovos do parasitóide em ovos artificiais ou de hospedeiros para posterior ajuste da quantidade de meio artificial a ser utilizada (Nordlund et al., 1997). No entanto, estas técnicas também possuem limitações. O bombeamento do meio artificial deve ser feito com muito cuidado, pois as larvas de *Trichogramma* são muito sensíveis e pode ocorrer mortalidade devido à manipulação; já a outra técnica descrita envolve técnicas de transferência dos ovos obtidos para o meio artificial em condições estéreis.

A emergência também pode ser afetada por condições abióticas, principalmente a umidade relativa. Mesmo que esta umidade seja mantida por volta de 75% no local de criação, dentro das placas pode ocorrer variação, de acordo com a quantidade de meio restante nos ovos artificiais, fato este relacionado ao número de *Trichogramma* que aí estejam se desenvolvendo (Grenier et al., 1995). Parra & Cônsoli (1992) e Cônsoli & Parra (1996a) também relataram influência negativa da alta umidade presente dentro dos recipientes, utilizados para criação *in vitro*, na emergência de *T. galloi* e *T. pretiosum*.

O meio enriquecido com 3,2% de caseína produziu maior porcentagem de adultos normais (Tabela 2), em relação aos meios básico e com 1,6% de caseína. As

análises de aminoácidos das pupas desenvolvidas nos meios artificiais mostraram um aumento do teor de proteína de acordo com o aumento da concentração de caseína adicionada ao meio artificial, sendo que pupas provenientes do meio com caseína na concentração de 1,6% apresentaram um teor protéico 8% maior em relação a pupas desenvolvidas no meio básico. Quando a concentração de caseína foi de 3,2% esta diferença foi de 18% (Figura 5). Estes resultados evidenciam a maior adequação nutricional de meios suplementados com a proteína caseína.

Tabela 2. Emergência (%) e indivíduos normais (%) de *Trichogramma pretiosum* criado em meios artificiais confeccionados com hemolinfa de *Mamestra brassicae* (Básico) e enriquecidos de caseína em duas concentrações. Temperatura $23 \pm 0,5$ °C; Umidade Relativa $75 \pm 5\%$; fotofase 16 horas.

Meio Artificial	Emergência (%) [*]	Adultos Normais (%) [*]
Básico	$37,73 \pm 1,41$ c	$37,43 \pm 2,55$ b
Caseína 1,6%	$65,14 \pm 1,56$ a	$33,94 \pm 1,96$ b
Caseína 3,2%	$48,02 \pm 1,78$ b	$52,64 \pm 3,15$ a

^{*} Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

A visualização mais detalhada das análises realizadas nas pupas provenientes dos 3 meios artificiais mostraram uma semelhança qualitativa, porém houve diferenças quantitativas na composição de aminoácidos. Estas diferenças são mais evidentes para os aminoácidos ácido glutâmico, glicina, leucina e arginina, que estão presentes em maior quantidade em pupas provenientes do meio artificial enriquecido com 3,2% de caseína (Figura 6).

Figura 5 - Quantidade (µg/mg) total de aminoácidos presentes em pupas de *Trichogramma pretiosum* criado em meio artificial sem adição de proteína (Básico), e contendo caseína em duas concentrações.

Figura 6 - Composição e quantidade (µg/mg) de aminoácidos de pupas de *Trichogramma pretiosum* criadas em meio artificial elaborado com hemolinfa de *Mamestra brassicae* (Básico) e suplementado com caseína em duas concentrações.

A adição de soroalbumina bovina ao meio artificial afetou o parasitismo. No meio contendo 1,75% desta proteína o número de larvas por ovo artificial foi maior em relação ao meio contendo 3,5%, similarmente ao que ocorreu quando a caseína foi adicionada na concentração mais elevada (Figura 7). Além dos fatores descritos por Nettles Jr. et al. (1982, 1983, 1985), o parasitismo pode estar relacionado à quantidade de aminoácidos livres no meio artificial (Grenier et al., 1998a) e, deste modo, análises em aminoácidos livres dos meios artificiais podem fornecer subsídios para esclarecer quais fatores estariam envolvidos, como demonstraram Grenier et al. (1998a) que obtiveram maior parasitismo de *T. dendrolimi* em meio artificial contendo maior quantidade de aminoácidos livres.

Figura 7 - Parasitismo de *Trichogramma pretiosum* em meio artificial elaborado com hemolinfa de *Mamestra brassicae* (Básico) e com adição de soroalbumina bovina em duas concentrações. Temperatura $23 \pm 0,5$ °C; Umidade Relativa $75 \pm 5\%$; fotofase 16 horas. (Colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade).

A emergência dos parasitóides foi maior nos meios artificiais enriquecidos de soroalbumina bovina. No meio artificial com maior concentração desta proteína a emergência foi de 73%, e no meio contendo 1,75%, tal emergência foi de mais de 50%, resultados significativamente maiores ao obtido para o meio básico de criação (Tabela 3). Neste caso, apesar da oviposição ter sido menor no meio com maior concentração de proteína, o número de larvas por ovo artificial foi 24% maior em relação ao obtido na maior concentração de caseína. Por esta razão, não foi verificado o mesmo efeito negativo do baixo número de larvas por ovo artificial ocorrido quando a caseína foi adicionada na concentração de 3,2%.

A produção de adultos normais também foi maior, embora não tenha diferido estatisticamente para este parâmetro entre o meio contendo 3,5% de soroalbumina bovina e o meio sem adição de proteína (Tabela 3).

Tabela 3. Emergência (%) e indivíduos normais (%) de *Trichogramma pretiosum* criado em meios artificiais confeccionados com hemolinfa de *Mamestra brassicae* (Básico) e enriquecidos de soroalbumina em duas concentrações. Temperatura $23 \pm 0,5$ °C; Umidade Relativa $75 \pm 5\%$; fotofase 16 horas.

Meio Artificial	Emergência (%) [*]	Adultos Normais (%) [*]
Básico	$44,68 \pm 2,39$ c	$54,53 \pm 3,82$ b
Soroalbumina 1,75%	$51,67 \pm 1,02$ b	$70,74 \pm 2,22$ a
Soroalbumina 3,5%	$73,23 \pm 0,78$ a	$64,69 \pm 2,27$ ab

^{*} Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

A soroalbumina bovina foi utilizada com sucesso por Strand & Vinson (1985) como suplemento protéico em meio artificial para *T. pretiosum*. Estes autores demonstraram ainda que a quantidade de hemolinfa utilizada no meio artificial foi um fator importante para a emergência dos parasitóides. Em meio contendo 20% de

hemolinfa a emergência foi de 17%, enquanto em meio elaborado com 30 a 40% de hemolinfa a emergência foi de 74 a 77%. Cônsoli & Parra (1996a, 1997b) obtiveram o desenvolvimento completo de *T. pretiosum* e *T. galloi* utilizando soro fetal bovino em meios artificiais.

Observou-se também um aumento do teor em proteínas de pupas provenientes de meio artificial suplementado com soroalbumina bovina, de acordo com o aumento da concentração de proteína no meio artificial (Figura 8). Este fato sugere uma maior adequação nutricional quando o meio apresenta maior quantidade de proteína em sua composição, à semelhança do que ocorreu com a adição de caseína no meio artificial. O aumento do teor de proteínas das pupas foi ainda maior que os obtidos para a caseína. Pupas provenientes do meio artificial enriquecido com 1,75% de soroalbumina apresentaram 31,5% mais proteínas que aquelas do meio básico, enquanto na concentração de 3,5% esta diferença foi de 42%.

Figura 8 - Quantidade (µg/mg) total de aminoácidos totais de pupas de *Trichogramma pretiosum* criado em meio artificial sem adição de proteína (Básico) e contendo soroalbumina bovina em duas concentrações.

Análises na composição em aminoácidos das pupas corroboram esta hipótese, pois houve aumento quantitativo de todos os aminoácidos avaliados nos meios artificiais enriquecidos com soroalbumina bovina (Figura 9).

Figura 9 - Composição e quantidade ($\mu\text{g/mg}$) de aminoácidos de pupas de *Trichogramma pretiosum* criadas em meio artificial confeccionado com hemolinfa de *Mamestra brassicae* (Básico) e enriquecidos com soroalbumina bovina nas concentrações de 1,75 e 3,5%.

De um modo geral, os resultados obtidos na presente pesquisa para as porcentagens de emergência e de adultos normais estão próximos aos relatados na literatura com meios artificiais elaborados com componentes de insetos (Strand & Vinson, 1985; Cônsoli & Parra, 1996a, 1997b; Grenier et al., 1995, 1998a; Nordlund et al., 1997). Grenier et al. (1995) observaram variação no conteúdo protéico de pupas de *Trichogramma* provenientes de diferentes meios artificiais, sendo que a composição de aminoácidos também variou, à semelhança dos resultados obtidos na presente pesquisa.

A adição de soroalbumina bovina ao meio artificial foi mais adequada em relação a adição de caseína, visto que proporcionou um melhor parasitismo no meio artificial e a obtenção de maiores porcentagens de emergência e de adultos normais. Além disso, o meio artificial contendo soroalbumina bovina permitiu a obtenção de pupas com maior conteúdo protéico em maior proporção (de 31,5 a 42% maior em relação ao meio básico de desenvolvimento), enquanto as pupas provenientes de meio suplementado com caseína apresentaram um aumento do teor de proteínas entre 8 e 18% maior em relação ao meio básico.

3.4 Conclusões

1. Meios artificiais elaborados com holotecidos pupais de *Mamestra brassicae* L. são mais adequados para criação *in vitro* de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 em relação a meios contendo hemolinfa pupal, proporcionando maior emergência e permitindo a obtenção de pupas com maior teor protéico;
2. Há semelhanças qualitativas na composição de aminoácidos de pupas de *T. pretiosum* provenientes de diferentes meios artificiais, mas há diferenças quantitativas;
3. A adição das proteínas caseína (nas concentrações finais de 1,6 e 3,2%) e soroalbumina bovina (nas concentrações finais de 1,75 e 3,5%) ao meio artificial elaborado com hemolinfa pupal de *Mamestra brassicae* L. proporciona um aumento do teor protéico de pupas de *T. pretiosum*.
4. A proteína soroalbumina bovina é mais adequada para enriquecer meios artificiais em relação à caseína.

4 ASSIMILAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO PARASITÓIDE DE OVOS *Trichogramma pretiosum* RILEY, 1879 (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)

Resumo

O objetivo do trabalho foi desenvolver uma metodologia para estudos da assimilação de proteínas pelo parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, visando auxiliar o desenvolvimento de novos meios artificiais ou melhorar os já existentes para sua criação. Para tanto, estes insetos foram criados em meio artificial composto de hemolinfa pupal de *Mamestra brassicae* L., gema de ovo de galinha, leite semi-desnatado, sais de Neisenheimer e água destilada, com ou sem adição de proteínas. As proteínas adicionadas ao meio foram a caseína e a soroalbumina bovina, nas concentrações finais de 1,6 e 3,2% e 1,75 e 3,5%, respectivamente. O método foi baseado na adição de uma mistura de aminoácidos livres marcados (^{14}C) ao meio artificial utilizado para o desenvolvimento do parasitóide. A comparação da atividade específica dos aminoácidos totais das pupas de *T. pretiosum* com a atividade específica dos aminoácidos livres e totais do meio artificial utilizado para sua criação permitiu a determinação da utilização das proteínas existentes no meio artificial pelo parasitóide.

PALAVRAS-CHAVE: Insetos entomófagos, nutrição, criação *in vitro*, proteínas

Summary

This work was performed in order to develop a methodology for studies on protein assimilation by the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, as an aid to define new artificial media or improvement of the existing ones for its rearing. The insects were reared in an artificial medium comprising pupal hemolymph of *Mamestra brassicae* L., chicken egg yolk, semi-skimmed milk, Neisenheimer salt and distilled water, with or without protein addition. The proteins added to the medium were casein and bovine serum albumin at final concentrations of 1.6 and 3.2% and 1.75 and 3.5%, respectively. The method was based on the addition of a mix of marked free amino acids (^{14}C) into the artificial medium used to develop the parasitoid. The comparison between the specific activity of the total amino acids of *T. pretiosum* pupae and the specific activity of free and total amino acids of the rearing artificial medium allowed the determination of the use of the existing proteins in the artificial medium by the parasitoid.

KEY WORDS: Entomophagous insect, nutrition, *in vitro* rearing, protein

4.1 Introdução

O conhecimento das exigências nutricionais de parasitóides é de fundamental importância para que sejam elaborados meios artificiais adequados ao seu desenvolvimento. As necessidades nutricionais qualitativas básicas são semelhantes entre os insetos (Thompson & Hagen, 1999), enquanto suas necessidades quantitativas podem variar bastante, e estão correlacionadas aos seus hábitos alimentares (Dadd, 1985). Os insetos necessitam basicamente de aminoácidos, vitaminas e sais minerais (nutrientes essenciais) e carboidratos, lipídeos e esteróis (nutrientes não essenciais), os quais devem ser adequadamente balanceados (Parra, 1991; House, 1974). Scriber & Slansky (1981) salientam que além destas exigências nutricionais básicas, é muito

importante a proporção de alimento ingerido, digerido, assimilado e convertido em tecidos de crescimento. Além disto, deve-se levar em consideração que 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).

No caso de endoparasitóides o hospedeiro em que vivem são não só a fonte de alimento, mas também o meio em que vivem (Slansky, 1986). Assim, meios artificiais para estes entomófagos, devem oferecer além de condições nutricionais adequadas, características físicas tais como consistência, pH e pressão osmótica compatíveis com seus processos fisiológicos (Cônoli & Parra, 1997a; Grenier, 1997) e seu estágio de desenvolvimento (Grenier, 1994). Deste modo, a elaboração de meios artificiais para crescimento e desenvolvimento *in vitro* destes insetos apresenta um grande desafio. Os primeiros avanços foram obtidos quando estudos realizados com diversas espécies de entomófagos revelaram que estes insetos necessitam de dietas ricas em proteínas e/ou aminoácidos (Thompson, 1976, 1986), além de fontes de energia provenientes de carboidratos e lipídeos (Grenier, 1997).

Nas últimas décadas, grandes avanços vêm sendo obtidos na criação e desenvolvimento de *Trichogramma in vitro*. No entanto, os meios artificiais existentes para a criação deste parasitóide apresentam baixo valor protéico em relação ao encontrado em ovos hospedeiros, apesar de apresentarem grande proporção de componentes de inseto como ingrediente básico (Grenier et al., 1995).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma metodologia para estudos da assimilação de proteínas pelo parasitóide *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, visando auxiliar no desenvolvimento de novos meios artificiais ou melhorar os meios já existentes para sua criação *in vitro*.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Manutenção da linhagem de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879

O trabalho foi desenvolvido no Laboratoire de Biologie Fonctionnelle, Insectes et Interactions, do Institut National des Sciences Appliquées de Lyon (INSA), em Villeurbanne, França. A linhagem telítoca de *T. pretiosum* estudada foi proveniente de Montevidéu, Uruguai e denominada t191.

Para a manutenção da linhagem, ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (fornecidos pela Biotop[®]) inviabilizados em lâmpada germicida eram colados com goma arábica diluída em água (50%), sobre cartolina branca (8,0 x 12,0 cm). Os cartões, assim obtidos, eram fornecidos aos parasitóides em frascos de vidro (16,0 x 10,0 cm), na proporção de 1 parasitóide : 10 ovos do hospedeiro. O parasitismo era permitido por 24 horas em câmaras climatizadas, reguladas à temperatura, reguladas à temperatura de $23 \pm ^\circ\text{C}$, Umidade Relativa de $75 \pm 5\%$ e fotofase de 16 horas

4.2.2 Metodologia de criação *in vitro* de *Trichogramma*

4.2.2.1 Confeção dos ovos artificiais

Os ovos artificiais consistiram de cúpulas semi-esféricas, confeccionadas em filme de polietileno de 15 μm de espessura. Para a confecção destes ovos plásticos foi utilizada uma matriz perfurada, onde os ovos foram moldados manualmente com a introdução de um bastão de vidro no filme plástico esticado sobre a matriz. As cúpulas semi-esféricas foram dispostas segundo uma matriz de 5 x 6, com capacidade para cerca de 5 μl de dieta em cada ovo artificial. O filme plástico contendo os ovos artificiais assim confeccionados foi esterilizado sob lâmpada germicida por duas horas de cada lado, para

evitar a contaminação do meio artificial por agentes microbianos (fungos e bactérias). Na parte convexa de cada ovo artificial foi depositada uma fina camada de polivinil álcool (PVA) para estimular a postura dos parasitóides no meio artificial (Han et al., 1994). Este filme foi então transferido para placas plásticas de 5 cm de diâmetro, com a parte convexa voltada para baixo e as cavidades preenchidas com o meio artificial. Este conjunto foi então oferecido ao parasitismo, sendo a parte superior da placa plástica utilizada para fechar o sistema. As placas foram acondicionadas dentro de caixas plásticas contendo uma solução saturada de NaCl, para manter a umidade em torno de 75%, e levadas à temperatura de 24°C. Todos os procedimentos foram conduzidos em condições estéreis, em câmara de fluxo laminar.

4.2.2.1.1 Composição e preparo do meio artificial

O meio artificial básico utilizado foi composto de 40% de hemolinfa de pupas de *Mamestra brassicae* L., 20% de gema de ovo de galinha, 20% de leite semi-desnatado, 10% de solução de sais de Neisenheimer e 10% de água destilada. Após a mistura dos ingredientes, o meio artificial foi centrifugado a 2000g por 20 minutos à temperatura de 4°C. O precipitado foi descartado, e o sobrenadante utilizado no sistema de criação. Para a obtenção da hemolinfa utilizada nos meios artificiais, pupas de *M. brassicae* em diapausa foram lavadas em água corrente e em seguida esterilizadas superficialmente em solução aquosa de ácido bórico 3% por 10 minutos. Após este período, as pupas foram submetidas a um tratamento térmico em banho maria a 60°C por 6 minutos para a inativação das fenoloxidasas (Shapiro & Ignoffo, 1973). Para a coleta da hemolinfa, foi realizada uma incisão na parte anterior e as pupas foram então pressionadas pela parte posterior, sendo a hemolinfa extravasada coletada em um frasco esterilizado e, a seguir, armazenada a -20°C, para posterior confecção do meio artificial. Todos os

procedimentos referentes ao meio artificial foram realizados em condições estéreis, em capela de fluxo laminar.

Os estudos da assimilação de proteínas foram também realizados em meios artificiais enriquecidos de proteína. As proteínas utilizadas foram a caseína e a soroalbumina bovina, adicionadas na concentração final de 1,6 e 3,2% e de 1,75 e 3,5%, respectivamente (concentrações máximas conseguidas). Assim, foram elaborados 5 meios artificiais, cuja composição foi:

1. Básico: 40% de hemolinfa pupal de *M. brassicae*, 20% de gema de ovo de galinha, 20% de leite semi-desnatado, 10% de solução de sais de Neisenheimer e 10% de água destilada;

2. Básico + 1,6% de caseína (concentração final);

3. Básico + 3,2% de caseína (concentração final);

4. Básico + 1,75% de soroalbumina bovina (concentração final);

5. Básico + 3,5 % de soroalbumina bovina (concentração final);

Para a adição dos aminoácidos radioativos, 500 µl de solução de hidrolisado U-¹⁴C (contendo os aminácidos alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, lisina, fenilalanina, prolina, serina, tirosina e valina) foram colocados dentro de um tubo de microcentrífuga e, em seguida, esta solução foi evaporada sob vácuo (em Speed Vac). Após a completa evaporação da solução, foram colocados 240 µl do meio artificial a ser avaliado dentro do tubo de microcentrífuga, que foi submetido em seguida a uma forte agitação em vórtex. Para cada experimento foram realizadas três repetições, onde dos trinta ovos artificiais, apenas 4 foram preenchidos com o meio artificial contendo os aminoácidos radioativos, sendo os demais preenchidos com o meio artificial não radioativo (Figura 1). O parasitismo foi permitido por 24 horas.

Figura 1 – Esquema da distribuição de meio artificial com e sem aminoácidos radioativos nos recipientes de criação de *Trichogramma pretiosum in vitro*.

4.2.3 Estudos de assimilação de proteínas

O protocolo para o estudo do papel das proteínas e sua utilização (assimilação) foi desenvolvido para estudos com *Trichogramma* utilizando o princípio da diluição isotópica. Este método consiste na utilização de traçadores radioativos, oferecidos no meio artificial através de uma mistura de aminoácidos livres marcados (^{14}C), juntamente com a proteína a ser avaliada quanto à digestibilidade. Pupas dos insetos provenientes de meio artificial contendo aminoácidos marcados foram analisadas em sua composição de aminoácidos totais, e a radioatividade medida com um contador de radioatividade de fluxo (contador Packard). O próprio meio artificial marcado foi analisado quanto à sua composição em aminoácidos totais e livres.

As análises visaram obter informações sobre proteínas e os produtos de digestão, peptídeos e aminoácidos e também sobre a composição dos insetos obtidos. A comparação das atividades específicas de aminoácidos livres e totais do meio artificial com a atividade encontrada nas pupas obtidas *in vitro* permitiu determinar o fluxo de assimilação de cada aminoácido pelos parasitóides.

Diversos experimentos preliminares foram conduzidos para ajustar as condições de estudo tais como a quantidade de aminoácidos radioativos a ser adicionada ao meio que permitisse o desenvolvimento normal de *T. pretiosum*; o nível de radioatividade suficiente para ser detectado pelo contador de radioatividade de fluxo; quantidade de aminoácidos livres presentes no meio artificial; verificação da contaminação externa de pupas por aminoácidos radioativos, através de lavagens sucessivas e posterior contagem de radioatividade na água recolhida; análises do mecônio liberado por adultos de *T. pretiosum* logo após a sua emergência, para verificação da presença de aminoácidos.

A quantidade de aminoácidos livres radioativos (marcados) adicionada à dieta foi de 1% da quantidade normalmente presente no meio.

Todos os procedimentos para as análises de assimilação protéica foram muito precisos, exigindo a utilização de seringas e micropipetas calibradas e balanças de alta precisão, principalmente devido ao diminuto tamanho dos parasitóides.

A atividade específica de cada aminoácido é definida como a atividade radioativa (em cpm/mg) dividida pela concentração do aminoácido (em nmol/mg). Se o parasitóide não assimila as proteínas do meio artificial (isto é, utiliza somente os aminoácidos livres do meio artificial), a atividade específica dos aminoácidos das pupas será igual à atividade específica dos aminoácidos livres do meio artificial. Se os parasitóides assimilam completamente as proteínas presentes no meio artificial, a atividade específica de cada aminoácido das pupas será igual à atividade específica dos aminoácidos totais do meio artificial. Por último, se ocorrer uma assimilação apenas parcial das proteínas do meio artificial, a atividade específica das pupas será intermediária, entre a atividade específica dos aminoácidos livres e totais do meio artificial (Figura 2).

Figura 2 – Esquema do princípio da diluição isotópica.

Após o desenvolvimento, as pupas dos parasitóides provenientes de cada meio artificial marcado foram pesadas, em 3 lotes de vinte, em balança de alta precisão, com sensibilidade para pesar microgramas de material. As pupas foram então submetidas à hidrólise para posterior contagem da radioatividade.

Primeiramente foi avaliada a utilização das proteínas do meio artificial básico utilizado para criação dos parasitóides, confeccionado com hemolinfa de *M. brassicae*. Em uma segunda etapa, avaliou-se a utilização de proteínas em outros 4 meios artificiais, enriquecidos de caseína (nas concentrações de 1,6 e 3,2%) ou soroalbumina (nas concentrações de 1,75 e 3,5%).

4.2.4. Análises em composição de aminoácidos totais e livres.

Tanto o meio artificial como os parasitóides produzidos (em meio artificial marcado ou não com radioatividade) foram analisados em sua composição em aminoácidos totais. Para tanto, o material foi submetido à hidrólise ácida e as medidas foram realizadas em analisador Beckman 6300.

O material destinado à hidrólise foi pesado em balança de alta precisão, utilizando micropipetas calibradas e adequadas para amostragem de pequenas quantidades de material. A hidrólise foi realizada sob nitrogênio, em vapor de HCl a 110°C por 24 horas, utilizando-se coluna Pico-Tag Station (Waters, St Quentin Les Yvelines, France) contendo 2-mercaptoetanol (4%) para preservação de aminoácidos sulfúricos. Após a hidrólise foi adicionado ácido glucosamínico como padrão interno. As amostras foram então evaporadas sob vácuo (Speed Vac) e em seguida foram adicionados 100µl de tampão lítio-citrato 0,05 M, pH 2,2.

O meio artificial foi também avaliado quanto à sua composição em aminoácidos livres. Para tanto, 15 µl do meio artificial foram colocados sobre uma membrana Millipore (ultraface -MC) 10000. O material foi então centrifugado a 10000g por uma hora. Após a evaporação sob vácuo (Speed Vac), foram adicionados 200µl de tampão lítio-citrato 0,05 M, pH 2,2.

Três amostras de 10µl foram contadas para a radioatividade com 4,5 ml de Cintilador Ultima Gold®. Outra amostra de 50 µl foi submetida a analisador de aminoácidos Beckman 6300, no qual os aminoácidos foram detectados através de reação

com nihidrina, identificados pelo tempo de retenção e taxa de comprimento de onda, e quantificados por sua absorção a 570 nm (440 nm para o aminoácido prolina). O analisador foi acoplado a um detector de radioatividade de fluxo (Flowone/ Beta A200; Radiomatic Instruments, Flotec, La Queue les Yvelines, France) o que permitiu a detecção e quantificação dos aminoácidos radioativos.

4.3 Resultados e Discussão

A água recolhida da lavagem externa das pupas de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 provenientes de meio artificial contendo aminoácidos livres radioativos demonstrou a ausência de contaminação externa das pupas, pois não foram encontrados aminoácidos radioativos. Além disso, as análises do mecônio emitido logo após a emergência demonstrou que sua composição é de apenas produto de excreção (NH_3), não contendo aminoácidos. Estes resultados indicaram que os aminoácidos encontrados nas análises das pupas foram incorporados aos tecidos, sendo portanto resultado de catabolismo (degradação de proteínas) e posterior anabolismo (síntese de proteínas) realizado pelas larvas de *T. pretiosum*.

A metodologia desenvolvida permitiu a avaliação da assimilação de proteínas por *T. pretiosum*.

Tanto no meio artificial normal de criação como nos meios artificiais suplementados com as proteínas caseína (a 1,6 e 3,2%) e soroalbumina (a 1,75 e 3,5%) houve completa assimilação das proteínas presentes. Isto se verifica pela semelhante atividade específica entre os aminoácidos totais do meio artificial e das pupas neles desenvolvidas (Figuras 3, 4, 5, 6 e 7). Estes resultados são particularmente válidos para os aminoácidos essenciais que sofrem metabolismo reduzido e, além disso as interconversões entre estes aminoácidos é limitada (Grenier et al., 1986).

Algumas vantagens da utilização desta metodologia são a possibilidade de utilização de quantidade mínima de aminoácidos marcados (1%), que não altera a composição do meio artificial de maneira significativa. Isto foi possível devido ao diminuto tamanho dos parasitóides (com peso entre 20 e 30 μg). Além disso, houve a possibilidade de hidrólise e análise completa de muitos indivíduos.

As proteínas utilizadas foram completamente assimiladas, porém as concentrações utilizadas foram baixas, visto que é muito difícil incorporar as proteínas em uma maior proporção. Esta dificuldade está relacionada a necessidade de utilização de um meio de difícil esterilização. Uma esterilização pelo calor foi descartada, pois provocaria a coagulação do meio artificial e consequentemente sua inadequação ao desenvolvimento de *T. pretiosum*. Além disso, as proteínas já esterilizadas disponíveis no mercado apresentam-se em baixas concentrações. Apesar destas limitações a metodologia desenvolvida foi adequada para a determinação da utilização completa das proteínas do meio artificial. No entanto, para melhores interpretações, devem ser realizados experimentos com outras proteínas de mais difícil digestão ou em concentrações mais elevadas.

A utilização desta metodologia permitirá avanços na elaboração de meios artificiais para criação de *T. pretiosum*, através da determinação de proteínas mais adequadas a serem adicionadas ao meio artificial, permitindo assim a obtenção de meios mais ricos em proteína, que são ingredientes fundamentais em dietas para parasitóides (Grenier, 1994; Thompson & Hagen, 1999).

As proteínas presentes nos meios artificiais foram completamente assimiladas pelos parasitóides, o que corrobora a hipótese de Slansky & Scriber (1985), de que os parasitóides devem ter elevada eficiência de utilização de alimento já que consomem alimentos aparentemente de alta qualidade nutricional, apresentam uma relativa inatividade dentro do hospedeiro e devido a uma possível seleção para uma assimilação eficiente de uma quantidade limitada de alimento

Figura 3 - Atividade específica (cpm/nmol) de aminoácidos livres e totais do meio artificial e de pupas de *Trichogramma pretiosum*, criado em meio artificial elaborado com hemolinfa pupal de *Mamestra brassicae* (Básico). Aminoácidos marcados com asterisco são essenciais.

Figura 4 - Atividade específica (cpm/nmol) de aminoácidos livres e totais do meio artificial e de pupas de *Trichogramma pretiosum*, criado em meio artificial suplementado com caseína a 1,6%. Aminoácidos marcados com asterisco são essenciais.

Figura 5 - Atividade específica (cpm/nmol) de aminoácidos livres e totais do meio artificial e de pupas de *Trichogramma pretiosum*, criado em meio artificial suplementado com caseína a 3,2%. Aminoácidos marcados com asterisco são essenciais.

Figura 6 - Atividade específica (cpm/nmol) de aminoácidos livres e totais do meio artificial e de pupas de *Trichogramma pretiosum*, criado em meio artificial suplementado com soroalbumina a 1,75%. Aminoácidos marcados com asterisco são essenciais.

Figura 7 - Atividade específica (cpm/nmol) de aminoácidos livres e totais do meio artificial e de pupas de *Trichogramma pretiosum*, criado em meio artificial suplementado com soroalbumina a 3,5%. Aminoácidos marcados com asterisco são essenciais.

4.4 Conclusões

1. A metodologia desenvolvida é adequada para estudos da assimilação de proteínas pelo parasitóide *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879;
2. *T. pretiosum* assimila completamente as proteínas do meio artificial, mesmo quando este é enriquecido de caseína ou soroalbumina bovina nas concentrações finais de 1,6 e 3,2% e 1,75 e 3,5%, respectivamente.

5. UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE CRIAÇÃO *in vitro* NA ELIMINAÇÃO DO SIMBIONTE *Wolbachia* PARA ESTUDOS DO SEU PAPEL NA FECUNDIDADE DE *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879.

Resumo

Foi desenvolvida uma metodologia para eliminação do simbiote *Wolbachia* de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, visando estudar o papel destes simbioses na fecundidade dos parasitóides. Nela, o antibiótico tetraciclina foi incorporado ao meio artificial utilizado para desenvolvimento do referido parasitóide de ovos (criação *in vitro*), permitindo que todos os indivíduos ingerissem a mesma quantidade de antibiótico. Obteram-se assim linhagens sem *Wolbachia*, sendo que a ausência do simbiote foi comprovada através de testes de reação de polimerase em cadeia (PCR) e também pela observação da descendência de fêmeas virgens por 25 gerações depois da administração inicial do antibiótico. As linhagens obtidas (4) apresentaram menor fecundidade em relação à linhagem infectada por *Wolbachia*. Fêmeas provenientes de dieta artificial infectadas pelo simbiote embora tenham apresentado menor tamanho em relação a uma linhagem sem o simbiote, apresentaram maior fecundidade.

PALAVRAS-CHAVE: Parasitóide de ovos, endosimbiote, criação *in vitro*.

Summary

A methodology to eliminate symbiont *Wolbachia* of *Trichogramma pretiosum* was developed viewing the study of the role of these symbionts in the fecundity of the parasitoids. Antibiotic tetracycline was incorporated into the artificial medium used for the development of that egg parasitoid (*in vitro* rearing), allowing all individuals to ingest the same amount of the antibiotic. *Wolbachia*-free strains were thus obtained and the absence of the symbiont was verified through polymerase chain reaction tests and also by observing the virgin female offspring for 25 generations following the initial antibiotic dispensing. The strains achieved (4) were less fecund in relationship with the *Wolbachia*-infected strain. Symbiont-infected females deriving from an artificial diet had higher fecundity, although the size was smaller in comparison to a non-symbiont strain.

KEY WORDS: egg parasitoid, *in vitro* rearing, endosymbionts

5.1 Introdução

Wolbachia é uma alfa-proteobactéria simbiote que afeta a sobrevivência e reprodução de muitas espécies de artrópodes e também de nematóides (Rousset et al., 1992; Bandi et al., 1998). Este simbiote é extremamente freqüente nos artrópodes, como demonstraram Jeyaparaksh & Hoy (2000) que, através de uma nova técnica de PCR para detecção de *Wolbachia*, puderam encontrá-lo em 76% das espécies testadas. Os efeitos de *Wolbachia* em seus hospedeiros incluem a incompatibilidade citoplasmática, partenogênese telítica, morte de machos (“male-killing”) e efeminação de machos, que vêm sendo muito estudados na última década (O’Neill et al., 1997; Stouthamer et al., 1999). Entretanto, existem ainda muitas controvérsias com relação aos

efeitos de *Wolbachia* em seus hospedeiros. Para se testar o real efeito de *Wolbachia*, é necessário estabelecer uma comparação de uma linhagem infectada por esta bactéria com a mesma linhagem livre do simbiote. Tratamentos térmicos aplicados em adultos e estágios pré-imaginais são às vezes difíceis de serem realizados já que a temperatura para matar o simbiote está freqüentemente próxima ao limiar térmico de desenvolvimento do hospedeiro, e as *Wolbachia* presentes em diferentes espécies podem ser mais ou menos sensíveis às altas temperaturas (Pintureau et al., 1999; Pintureau & Bolland, 2001). A utilização de antibióticos continua sendo um bom método para eliminar o simbiote, mas sua adição no alimento do adulto (diluído em mel) pode resultar em alta variabilidade da dose ingerida entre os indivíduos e assim poderia induzir a uma baixa população de *Wolbachia* nas gerações seguintes (Pintureau et al., 1999). No caso de espécies de *Trichogramma*, esta metodologia nem sempre é eficiente, sendo que o tratamento deve ser repetido por algumas gerações (Stouthamer et al., 1990). Alguns adultos que não se alimentem da mistura de mel e antibiótico podem escapar do tratamento e, de um modo geral, a termoterapia ou antibioterapia não produz linhagens permanentemente livres do simbiote (Pintureau et al., 1993). Por outro lado, a adição de antibióticos em uma dieta artificial obriga a ingestão uniforme por todas as larvas, levando à rápida eliminação do simbiote e, por consequência, à obtenção de uma linhagem arrenótoca bissexual.

Deste modo, com base nesta hipótese, na presente pesquisa o antibiótico tetraciclina foi adicionado à dieta artificial utilizada para criação *in vitro* de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, visando a eliminação de *Wolbachia* para avaliar seu efeito na fecundidade do parasitóide.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Manutenção da linhagem de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879

O trabalho foi desenvolvido no Laboratoire de Biologie Fonctionnelle, Insectes et Interactions, do Institut National des Sciences Appliquées de Lyon (INSA), em Villeurbanne, França. A linhagem telítica de *T. pretiosum* estudada foi proveniente de Montevidéu, Uruguai e denominada t191.

Para a manutenção da linhagem, ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (fornecidos pela Biotop[®]), inviabilizados em lâmpada germicida, eram colados com goma arábica diluída em água (50%), sobre cartolina branca (8,0 x 12,0 cm). Os cartões, assim obtidos, eram fornecidos aos parasitóides em frascos de vidro (16,0 x 10,0 cm), na proporção de 1 parasitóide : 10 ovos do hospedeiro. Os adultos eram alimentados com uma solução de mel diluído em água na concentração de 30%. O parasitismo era permitido por 24 horas em câmaras climatizadas, reguladas à temperatura, reguladas à temperatura de $23 \pm ^\circ\text{C}$, Umidade Relativa de $75 \pm 5\%$ e fotofase de 16 horas

5.2.2 Metodologia de criação *in vitro* de *Trichogramma*

5.2.2.1 Confeção dos ovos artificiais

Os ovos artificiais consistiram de cúpulas semi-esféricas, confeccionadas em filme de polietileno de 15 μm de espessura. Para a confecção destes ovos plásticos foi utilizada uma matriz perfurada, onde os ovos foram moldados manualmente com a introdução de um bastão de vidro no filme plástico esticado sobre a matriz. As cúpulas semi-esféricas foram dispostas segundo uma matriz de 5 x 6, com capacidade para cerca de 5 μl de dieta em cada ovo artificial. O filme plástico contendo os ovos artificiais assim confeccionados foi esterilizado sob lâmpada germicida por duas horas de cada lado, para evitar a contaminação do meio artificial por microorganismos. Na parte convexa de cada

ovo artificial foi depositada uma fina camada de álcool polivinil (PVA) para estimular a postura dos parasitóides no meio artificial (Han et al., 1994). Este filme foi então transferido para placas plásticas de 5 cm de diâmetro, com a parte convexa voltada para baixo e as cavidades preenchidas com o meio artificial. Este conjunto foi então oferecido ao parasitismo, sendo a parte superior da placa plástica utilizada para fechar o sistema. As placas foram acondicionadas dentro de caixas plásticas contendo uma solução saturada de NaCl, para manter a umidade em torno de 75%, e levadas à temperatura de 24°C. Todos os procedimentos referentes ao meio artificial foram conduzidos em câmara de fluxo laminar.

5.2.2.1.1 Composição e preparo do meio artificial

O meio artificial utilizado foi composto de 40% de hemolinfa de pupas de *Antheraea pernyi* Guérin-Méneville, 20% de gema de ovo de galinha, 20% de leite semi-desnatado, 10% de solução de sais de Neisenheimer e 10% de água destilada. Após a mistura dos ingredientes, o meio artificial foi centrifugado a 2000g por 20 minutos à temperatura de 4°C. O precipitado foi descartado, e o sobrenadante utilizado no sistema de criação. O antibiótico Tetraciclina (Merck Co.), eficiente para a eliminação do simbionte (Stouthamer, 1991) foi incorporado à solução de sais de Neisenheimer e à água destilada utilizadas na preparação do meio artificial. Foram preparados um meio artificial sem antibiótico (testemunha) e 3 meios artificiais contendo concentração final de tetraciclina de 0,002, 0,01 ou 0,02%.

Para a coleta da hemolinfa utilizada nos meios artificiais, pupas de *A. pernyi* em diapausa foram lavadas em água corrente e em seguida esterilizadas superficialmente em solução aquosa de ácido bórico 3% por 10 minutos. Após este período, as pupas foram submetidas a um tratamento térmico em banho-maria a 60°C por 6 minutos para a inativação das fenoloxidasas (Shapiro & Ignoffo, 1973). Para a coleta da hemolinfa, foi realizada uma incisão na parte anterior e as pupas foram então pressionadas pela parte

posterior, sendo a hemolinfa extravasada coletada em um frasco esterilizado e, a seguir, armazenada a -20°C , para posterior confecção dos meios artificiais. Todos os procedimentos referentes ao meio artificial foram realizados em capela de fluxo laminar.

5.2.3 Obtenção de linhagens livres do simbiote *Wolbachia*

Em uma primeira etapa, foram oferecidos ovos do hospedeiro alternativo *A. kuehniella* para fêmeas adultas da linhagem telitóca de *T. pretiosum* (t191) oriundas dos meios artificiais contendo o antibiótico tetraciclina. Este procedimento foi necessário para obtenção de machos, visto que as fêmeas livres do simbiote apresentam reprodução arrenótoca. Em uma segunda etapa, os machos obtidos foram acasalados com fêmeas provenientes dos meios artificiais contendo tetraciclina. Deste modo, foram obtidas 3 linhagens, denominadas t191c-A, t191c-B e t191c-C, de acordo com a concentração de antibiótico presente no meio de desenvolvimento larval, ou seja, 0,002, 0,01 e 0,02%, respectivamente. Após alguns meses esta mesma metodologia foi utilizada para a obtenção de uma quarta linhagem (t191c-D), utilizando-se novamente 0,02% de tetraciclina. As linhagens passaram então a ser mantidas em ovos de *A. kuehniella* e foram testadas através de técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) (Werren et al., 1995), para verificação da eliminação do simbiote e também através de acompanhamento da descendência de fêmeas virgens, por 25 gerações após o tratamento com antibiótico.

5.2.4 Capacidade de parasitismo de linhagens com e sem *Wolbachia*

Foi comparada a capacidade de parasitismo (da emergência à morte da fêmea) de linhagens livres do simbiote (linhagens t191c-A, t191c-B, t191c-C e t191c-D) com a linhagem infectada, (t191) mas com o mesmo genoma, em ovos do hospedeiro alternativo *A. kuehniella*. Para tanto, ovos do hospedeiro alternativo parasitados por

estas linhagem foram isolados em tubos de vidro (7,0 x 1,0 cm). Após a emergência, os parasitóides foram separados em lotes de 25 fêmeas para cada linhagem, sendo as fêmeas das linhagens livres do simbionte acasaladas com machos da mesma linhagem. Foram oferecidos cartões contendo cerca de cem ovos do hospedeiro alternativo, substituídos diariamente e colocados para desenvolvimento nas mesmas condições do parasitismo ($23 \pm 0,5$ °C, UR $75 \pm 5\%$ e fotofase 16 horas). O número de ovos parasitados por dia por fêmea foi avaliado após o escurecimento dos ovos (7 dias após o parasitismo). Para cada tratamento foram realizadas 25 repetições. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Foi também estudada a relação entre o tamanho da fêmea criada em dieta artificial e o efeito de *Wolbachia*, desde que indivíduos provenientes de meio artificial são geralmente maiores que aqueles obtidos de criação *in vivo* (Grenier, 1994; Grenier et al., 1995). A fecundidade está normalmente ligada ao tamanho da fêmea (Kazmer & Luck, 1995; Bai et al., 1992, 1995). Assim, foram realizadas comparações entre fêmeas criadas *in vitro* (geração F₀), nas linhagens t191c-A (livre do simbionte) e a linhagem telítica t191 (infectada), porém possuindo o mesmo genoma. O comprimento da tibia posterior foi utilizado para a estimativa do tamanho do parasitóide, também fortemente correlacionado com a fecundidade (Pavlik, 1993). A fecundidade foi estimada pelo número de ovos de *A. kuehniella* parasitados (escuros) após permitir às fêmeas parasitar por 8 dias em ovos fornecidos *ad libitum*. Ao fim deste período as fêmeas foram mortas em solução de álcool 70% e as pernas posteriores foram montadas em líquido de Faure sobre lâminas para microscopia óptica. O comprimento das tíbias posteriores de cada fêmea foi medido sob microscópio estereoscópico, desde o final da base até o espinho distal. Uma correlação entre estas medidas (média dos dois valores de cada fêmea) e a fecundidade foi testada, levando-se em consideração se a linhagem estava ou não infectada por *Wolbachia* (Análise de Co-variância)

5.2.4.1. Técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) para controle da presença de *Wolbachia* em *Trichogramma*

Devido ao diminuto tamanho dos parasitóides, foi necessária uma técnica eficiente de extração de DNA.

Cerca de mil indivíduos adultos foram macerados dentro de tubos de microcentrífuga (com capacidade para 1,5ml) em 250µl de STE (NaCl 100 mM; Na₂EDTA 25mM, pH 8,0; tris HCl 10mM, pH 8,0). Em seguida, foram adicionados 12,5µl de SDS 10% (diodecil sulfato de sódio) e 3µl de proteinase K (10mg/ml). As amostras foram então incubadas a 55°C por 2 horas, agitando-se a cada 15 minutos. Após este período, foram adicionados 1,5µl de RNase (10mg/ml) e incubou-se por 1 hora a 37°C. A seguir, foram adicionados 250µl de uma solução de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico, e as amostras foram agitadas energicamente por cerca de 30 segundos, e em seguida centrifugadas a 10.000g por 2 minutos. O precipitado foi então descartado e o sobrenadante passou novamente pelo processo de centrifugação. Foram então adicionados 22 a 25µl de acetato de sódio 3M e 550µl de etanol 100%, e as amostras foram levadas a -20°C, por pelo menos uma hora, para precipitação do DNA. Após este período, o material foi centrifugado a 10.000g por 15 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado lavado com etanol 70%, sendo em seguida realizada uma centrifugação a vácuo (em Speed Vac) por 6 minutos, para evaporação do álcool.

Após este procedimento, a quantidade de DNA presente em cada amostra foi quantificada através de migração em gel de agarose a 1%, em relação a uma quantidade conhecida de DNA (padrão = 50ng de DNA). As amostras foram então diluídas em água, para a obtenção de uma concentração final de DNA de 20ng/µl.

Em seguida à padronização da quantidade de DNA das amostras foi realizada a amplificação do DNA de *Wolbachia*, utilizando-se um oligonucleotídeo do gene *ftsZ* (Werren et al., 1995). Dois microlitros do DNA extraído foram colocados em uma mistura constituída de Taq polimerase (enzima que permite a síntese de DNA), dNTP (dioxinucleotídeo trifosfato) e oligonucleotídeo do gene *ftsZ*. O programa de PCR começou com uma fase de 5 minutos a 94°C, durante a qual ocorreu a abertura da cadeia

de DNA, e em seguida foram realizados 35 ciclos (amplificação do DNA) nas seguintes condições: 5 minutos a 94°C; 45 minutos a 51°C e 45 minutos a 72°C. Após este tratamento térmico, foi realizada a migração das amostras em gel de agarose a 1%, para verificação de bandas amplificadas que indicariam a infecção por *Wolbachia*.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Eliminação e manutenção da ausência do simbionte *Wolbachia* de linhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879.

Através da metodologia empregada para eliminação *Wolbachia* foi possível a obtenção de quatro linhagens livres do simbionte, com somente um tratamento antibiótico, possuindo o mesmo genoma de uma linhagem que abriga o simbionte. Na observação da descendência de fêmeas virgens, a linhagem telítoca t191 apresentou somente fêmeas, enquanto as linhagens tratadas com antibiótico apresentaram reprodução arrenótoca, produzindo somente machos, por até 25 gerações após o tratamento inicial com antibiótico. As observações foram realizadas após 2, 3, 5, 9, 13, 15, 17 e 25 gerações (Tabela 1). O sucesso na eliminação do simbionte *Wolbachia* ficou claramente demonstrado pelos testes de PCR. Estes testes, realizados após 4, 7, 9, 10, 12 e 14 gerações após o tratamento inicial com tetraciclina deram resultados negativos para a presença de *Wolbachia* para as linhagens tratadas com tetraciclina t191c-A, t191c-B, t191c-C e t191c-D, enquanto a linhagem t191 apresentou sempre resultados positivos (Tabela 2).

Tabela 1. Descendência de fêmeas virgens de linhagens de *Trichogramma pretiosum* obtidas a partir de meio artificial contendo o antibiótico tetraciclina.

Linhagem	Gerações							
	F ₂	F ₃	F ₅	F ₉	F ₁₃	F ₁₅	F ₁₇	F ₂₅
t191c-A	/	*	*	/	*	*	*	*
t191c-B	/	*	*	/	*	*	*	/
t191c-C	/	*	*	/	*	*	*	*
t191c-D	*	/	*	*	/	/	/	/

*- 100% de machos; / - testes não realizados.

Tabela 2. Detecção da presença de *Wolbachia* por testes de reação de polimerase em cadeia (PCR) em linhagens de *Trichogramma pretiosum* obtidas a partir de meio artificial contendo o antibiótico tetraciclina.

Linhagem	Gerações					
	F4	F7	F9	F10	F12	F14
t191	+	+	+	+	+	+
t191c-A	-	-	-	-	-	-
t191c-B	/	-	/	/	-	-
t191c-C	-	-	-	-	-	-
t191c-D	-	-	/	/	/	/

+ = presença; - = ausência; / = testes não realizados

Independente da concentração de tetraciclina utilizada (de 0,002 a 0,02%) a eliminação do simbionte foi obtida e confirmada por testes de PCR por várias gerações após o tratamento. Experimentos preliminares mostraram que concentrações mais elevadas do antibiótico tetraciclina (0,1 a 0,5%) causaram alta mortalidade dos estágios pré-imaginais de *T. pretiosum*, inviabilizando a obtenção de indivíduos adultos.

A obtenção de linhagens permanentemente livres do simbiote é pela primeira vez relatada na literatura, visto que os trabalhos apresentados até hoje relataram a tentativa de eliminação do simbiote através da alimentação de adultos de parasitóides (Stouthamer, 1991; Stouthamer et al., 1990; Silva, 1999). No entanto, tal metodologia se mostra ineficiente na eliminação completa da infecção por *Wolbachia*, visto que após poucas gerações, as linhagens obtidas se tornam novamente telítocas, indicando o retorno do simbiote à população (Stouthamer et al., 1990; Pintureau et al., 1993). Além disso, antibióticos podem causar efeitos negativos em adultos de *Trichogramma*, como relatado por Stouthamer et al. (1990) que observaram menor longevidade e fecundidade de *T. pretiosum* que se alimentaram com uma mistura de mel e tetraciclina.

Portanto, com o desenvolvimento da metodologia do presente trabalho, não é necessário repetir o tratamento com antibiótico por várias gerações, o que também possibilita estudos do papel do simbiote sem a interferência negativa que o antibiótico pode causar aos insetos tratados, visto que os experimentos podem ser conduzidos após várias gerações da administração inicial do antibiótico.

Além disso, os efeitos de *Wolbachia* na fecundidade podem ser originados ainda no estágio larval e, neste caso, o impacto causado pelos simbioses não seria alterado através de sua eliminação no estágio adulto (Stouthamer et al., 1994). A importância deste efeito pré-imaginal pode ser determinada pela presente pesquisa, pois com a metodologia desenvolvida, o antibiótico é administrado desde os primeiros estágios de desenvolvimento do parasitóide.

5.3.2 Fecundidade de linhagens infectadas ou não por *Wolbachia*

A capacidade total de parasitismo da linhagem de *T. pretiosum* infectada pelo simbiote *Wolbachia* (t191) foi significativamente maior do que aquela observada nas quatro linhagens isentas do simbiote (t191c-A, t191c-B, t191c-C e t191c-D), embora apresentem o mesmo genoma (Figura 1).

Figura 1 – Número de ovos de *Anagasta kuehniella* parasitados por linhagens de *Trichogramma pretiosum* infectadas (t191) ou não (t191c-A, t191c-B, t191c-C e t191c-D) pelo simbiote *Wolbachia*.

No entanto, quando foram considerados períodos menores de tempo, os resultados variaram (Tabela 3 e Figura 2). Se o período de tempo considerado for da emergência até o terceiro dia de parasitismo, observa-se que a linhagem tratada com antibiótico t191c-C apresentou parasitismo significativamente maior em relação às demais linhagens. Porém após cinco dias, não se verificou mais a diferença no parasitismo entre as linhagens. A partir de dez dias de parasitismo, a linhagem infectada pelo simbiote *Wolbachia* começou a se destacar, havendo diferença significativa a partir do 15º dia (Tabela 3).

Tabela 3. Parasitismo acumulado em relação ao tempo após a emergência para linhagens de *Trichogramma pretiosum* infectada (t191) ou não (t191c-A, t191c-B, t191c-C e t191c-D) pelo simbiote *Wolbachia*. Temperatura $23 \pm 0,5$ °C; Umidade Relativa $75 \pm 5\%$ e fotofase 16 horas.

Tempo (dias)	Linhagem*				
	t191	t191c-A	t191c-B	t191c-C	t191c-D
1	21,13 a	17,57 a	16,55 a	23,85 a	19,52 a
1 a 3	36,30 b	35,35 b	34,12 b	43,00 a	34,04 b
1 a 5	53,79 a	50,30 a	45,94 a	55,70 a	49,87 a
1 a 10	98,67 a	84,20 ab	74,59 b	82,80 ab	78,44 b
1 a 15	137,04 a	105,55 b	93,41 b	94,20 b	89,43 b
1 à morte da fêmea	160,58 a	115,30 b	100,77 b	98,90 b	111,30 b

* Médias seguidas da mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Este resultado pode explicar em parte os diferentes resultados referentes aos efeitos de *Wolbachia* na fecundidade de parasitóides encontrados na literatura. Um teste de fecundidade por períodos de tempo mais curtos (1 ou 5 dias) pode levar a interpretações errôneas. Assim, Silva (1999) encontrou diferença na fecundidade total de linhagens infectadas e livres do simbiote de *T. deion* Pinto & Oatman e *T. cordubensis* Vargas & Cabello, mas quando o período de tempo considerado foi de até 5 dias de parasitismo, esta diferença não foi observada.

Figura 2 – Parasitismo acumulado de linhagens de *Trichogramma pretiosum* infectadas (t191) ou não (t191c-A, t191c-B, t191c-C e t191c-D) por *Wolbachia*. Temperatura $23 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa $75 \pm 5\%$ e fotofase 16 horas.

Os efeitos já relatados da infecção por *Wolbachia* mostram resultados divergentes, mesmo em se tratando de artrópodes pertencentes à mesma espécie. Por exemplo, para *Drosophila simulans* Sturtevant Poinot & Merçot (1997) não encontraram efeitos da presença de *Wolbachia*, enquanto Hoffmann et al. (1990), encontraram efeitos negativos. Em *Nasonia vitripennis* Walker, Stolk & Stouthamer (1996) descreveram um efeito positivo da presença de *Wolbachia* na fecundidade do parasitóide, enquanto Bordenstein & Werren (2000) não encontraram evidências do efeito do simbionte na fecundidade do parasitóide.

Os resultados obtidos com *Trichogramma* spp. também são controversos. Girin & Boulétrau (1995) e Vavre et al. (1999a) relataram um aumento da fecundidade de fêmeas de *T. bourarachae* Pintureau & Babault quando infectadas por *Wolbachia*. Também Silva (1999) encontrou um efeito positivo do simbionte em *T. oleae* (Olivier). No entanto, efeitos negativos da presença deste simbionte na fecundidade de fêmeas

foram descritos para *T. deion* e *T. pretiosum* (Stouthamer & Luck, 1993), e também em *T. cordubensis* e *T. kaykai* Pinto & Stouthamer (Silva, 1999; Silva et al., 2000).

No entanto, a fecundidade é o resultado de um processo fisiológico complexo. Vários fatores bióticos e abióticos podem afetar a produção de ovos, seja diretamente através de seu impacto na performance do adulto ou indiretamente através de seu impacto na performance larval (Slansky & Scriber, 1985). Os resultados discrepantes obtidos pelos diferentes autores podem ser explicados pela influência destes fatores, e também pelas diferentes metodologias utilizadas para avaliar a fecundidade. Além disso, há evidências de que o efeito de *Wolbachia* seja correlacionado a diferentes graus de associação simbiote-hospedeiro, bem como à densidade de *Wolbachia* presente nas linhagens e espécies de insetos analisadas pelos diferentes pesquisadores. Assim, se a associação entre os dois organismos for recente, pode resultar em efeitos negativos no hospedeiro (Zchori-Fein et al., 2000). Pintureau et al. (1998) relataram que em *T. evanescens* Westwood a infestação por *Wolbachia* é menor que em *T. pretiosum*, e a fecundidade total é similar em linhagens tratadas e infectadas pelo simbiote. Em *T. pretiosum*, com uma infestação maior, ocorre um maior grau de interação hospedeiro/simbiote e, além disso, há maior eficiência de transmissão de *Wolbachia* aos descendentes em relação a *T. evanescens* (Pintureau et al., 1998), o que também explica uma adaptação maior entre hospedeiro e simbiote para *T. pretiosum*. Supõe-se que a eficiência de transmissão seja mais elevada em populações fixas (onde todos os indivíduos apresentam *Wolbachia*) em relação a populações mistas (compostas de uma mistura de indivíduos infectados e não infectados pelo simbiote) (Silva, 1999).

O maior parasitismo observado para a linhagem infectada por *Wolbachia* é uma característica importante para o Controle Biológico. A utilização de linhagens telítocas pode ser mais adequada para o controle de pragas, já que todos os descendentes produzidos são fêmeas (Stouthamer et al., 1999). Inicialmente, poderiam ser utilizadas populações telítocas, o que levaria a uma rápida redução da população da praga alvo, e favoreceria o estabelecimento da população do parasitóide e, posteriormente a liberação de linhagens de reprodução sexuada poderia restabelecer a variabilidade genética desta população (Aeschlimann, 1990). Além disso, linhagens telítocas apresentam um rápido

crescimento populacional, fácil estabelecimento em campo e custo de produção reduzido, pois não ocorre desperdício com a produção de machos (Stouthamer, 1993).

Quando a densidade da praga no campo for baixa, a liberação de uma linhagem de reprodução arrenótoca não é recomendada, visto que a produção de fêmeas pode cair drasticamente (Stouthamer, 1993; Stouthamer & Luck, 1993). Quando a liberação ocorrer com densidade alta de hospedeiros, a escolha entre uma linhagem telítoca ou arrenótoca deve depender da taxa de crescimento da população, adaptação ao ambiente e custos de produção (Stouthamer et al., 1999; Silva, 1999). Para liberações inundativas, a adaptação ao meio ambiente e a taxa de crescimento têm menor importância e preconiza-se a liberação de indivíduos de reprodução telítoca, devido ao menor custo de produção por fêmea (Stouthamer, 1993).

Indícios de melhor eficiência de linhagens de reprodução telítoca no Controle Biológico foram obtidos por Silva (1999) e Meer (1999) que, em experimentos realizados em casa-de-vegetação constataram que linhagens telítocas de *T. cordubensis* e *T. deion* Pinto & Oatman foram mais eficientes no parasitismo em relação a linhagens de reprodução arrenótoca.

A presença do simbiote *Wolbachia* não afetou a longevidade das fêmeas, não ocorrendo diferença significativa entre os valores. A linhagem infectada viveu em média $20,5 \pm 1,4$ dias e as linhagens livres do simbiote apresentaram longevidade média de $16,8 \pm 1,4$, $17,1 \pm 2,1$, $13,4 \pm 1,6$ e $19,0 \pm 1,2$ dias respectivamente para as linhagens t191c-A, t191c-B, t191c-C e t191c-D. Deste modo, as diferenças na fecundidade observadas entre as linhagens não podem estar relacionadas a este fator. Os resultados encontrados na literatura para a longevidade de *Trichogramma* são variáveis. Por exemplo, Gomes & Parra (1998) obtiveram longevidade média de 7,32 dias para *T. pretiosum* proveniente de ovos de *A. kuehniella* mantidos na temperatura de 25 °C. No entanto, nestas mesmas condições, Sá & Parra (1994) observaram longevidade de 15,77 dias para a mesma espécie de parasitóide. Lewis et al. (1976) obtiveram resultados semelhantes aos da presente pesquisa para *T. pretiosum*, registrando valores médios de longevidade de 19,9 dias. Meer (1999) e Silva (1999) também não encontram diferenças de longevidade em três populações de *T. kaykai* e uma de *T. deion* infectadas ou não por

Wolbachia, mas a longevidade de *T. cordubensis* e *T. oleae* foi menor quando infectados pelo simbiote.

5.3.3 Relação entre o tamanho da fêmea criada em meio artificial, a infecção por *Wolbachia* e a fecundidade de linhagens de *T. pretiosum*.

A fecundidade de *T. pretiosum* está correlacionada com o tamanho da fêmea (para t191 $r = 0,53$ com $n = 27$; para t191c-A, $r = 0,64$ com $n = 14$). Pela análise de co-variância verificou-se que as curvas de regressão não são significativamente diferentes ($p=0,87$), mas o efeito de *Wolbachia* é significativo $p = 0,0001$) (Figura 3).

Diversos autores encontraram uma relação positiva entre o tamanho do parasitóide produzido e a fecundidade. Por exemplo, Hohmann et al. (1988) e Bai et al. (1992) observaram forte relação positiva entre o tamanho da fêmea de várias espécies de *Trichogramma* e a fecundidade, ou seja, quanto maior o tamanho da fêmea, maior a fecundidade. Greenberg et al. (1998) relataram que fêmeas de *T. minutum* Riley criadas *in vitro* apresentaram maior tamanho e maior parasitismo em relação a fêmeas menores, provenientes de ovos de *Helicoverpa zea* (Boddie) e *S. cerealella* (Olivier). O tamanho de *Trichogramma* spp. desenvolvido *in vitro* está relacionado com o número de ovos colocados por ovo artificial. Uma variação neste número leva a obtenção de adultos de diversos tamanhos (Grenier et al., 1995).

Fêmeas da linhagem tratada com antibiótico (t191c-A) e portanto livres do simbiote *Wolbachia*, apresentaram o comprimento da tibia significativamente maior em relação às fêmeas da linhagem infectada (t191), sendo de $148,7 \pm 4,1$ e $133,9 \pm 2,0 \mu\text{m}$, respectivamente. No entanto, fêmeas da linhagem infectada por *Wolbachia* foram mais fecundas. Deste modo, fica evidenciado o papel do simbiote na fecundidade, visto que, apesar de fêmeas infectadas pelo simbiote serem menores, apresentaram fecundidade maior em relação a fêmeas maiores, porém não infectadas por *Wolbachia*.

Figura 3 – Relação entre a fecundidade e o tamanho da tíbia de linhagens de *Trichogramma pretiosum*, provenientes de meio artificial, infectadas (t191) ou não (t191c-A) pelo simbiote *Wolbachia*.

5.4 Conclusões

1. A adição do antibiótico tetraciclina ao meio artificial de desenvolvimento de *T. pretiosum* é a técnica mais adequada para obtenção de linhagens permanentemente livres do simbiote *Wolbachia*;
2. Fêmeas de *T. pretiosum* infectadas pelo simbiote *Wolbachia* são mais fecundas em relação a fêmeas livres do simbiote, obtidas através de tratamento com antibiótico.
3. Fêmeas de *T. pretiosum* criadas *in vitro* e infectadas por *Wolbachia* embora tenham apresentado menor tamanho em relação a fêmeas sem o simbiote, apresentaram maior fecundidade.

6. CONCLUSÕES

1. Meios artificiais elaborados com holotécidos pupais de *Mamestra brassicae* L. são mais adequados para criação *in vitro* de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 em relação a meios contendo hemolinfa pupal, proporcionando maior emergência e permitindo a obtenção de pupas com maior teor protéico;
2. Há semelhanças qualitativas na composição de aminoácidos de pupas de *T. pretiosum* provenientes de diferentes meios artificiais, mas há diferenças quantitativas;
3. A adição das proteínas caseína (nas concentrações finais de 1,6 e 3,2%) e soroalbumina bovina (nas concentrações finais de 1,75 e 3,5%) ao meio artificial elaborado com hemolinfa pupal de *Mamestra brassicae* L. proporciona um aumento do teor protéico de pupas de *T. pretiosum*.
4. A proteína soroalbumina bovina é mais adequada para enriquecer meios artificiais em relação à caseína.
5. A metodologia baseada no princípio da diluição isotópica é adequada para estudos da assimilação de proteínas pelo parasitóide *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879;
6. *T. pretiosum* assimila completamente as proteínas do meio artificial, mesmo quando este é enriquecido de caseína ou soroalbumina bovina nas concentrações finais de 1,6 e 3,2% e 1,75 e 3,5%, respectivamente.
7. A adição do antibiótico tetraciclina ao meio artificial de desenvolvimento de *T. pretiosum* é a técnica mais adequada para obtenção de linhagens permanentemente livres do simbionte *Wolbachia*;

8. Fêmeas de *T. pretiosum* infectadas pelo simbiote *Wolbachia* são mais fecundas em relação a fêmeas livres do simbiote, obtidas através de tratamento com antibiótico.
9. Fêmeas de *T. pretiosum* criadas *in vitro* e infectadas por *Wolbachia* embora tenham apresentado menor tamanho em relação a fêmeas sem o simbiote, apresentaram maior fecundidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AESCHLIMANN, J.P. Simultaneous occurrence of thelitoxy and bisexuality in hymenopteran species, and its implications for the biological control of pests. **Entomophaga**, v.35, p. 3-5, 1990.
- ARTHUR, A.P.; HEGDEKAR, B.M.; BATSCH, W.W. A chemically defined, synthetic medium that induces oviposition in the parasite *Itoplectis conquisitor* (Hymenoptera: Ichneumonidae). **The Canadian Entomologist**, v.104, n.11, p.1251-1258, 1972.
- BAI, B.; COBANOGU, S.; SMITH, S.M. Assessment of *Trichogramma* species for biological control of forest lepidopteran defoliators. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 75, p. 135-143, 1995.
- BAI, B.; LUCK, R.F.; FORSTER, L.; STEPHENS, B.; JANSSEN, J.A.M. The effect of host size on quality attributes of the egg parasitoid, *Trichogramma pretiosum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 64, p.37-48, 1992.
- BANDI, C.; ANDERSON, T.J.C.; GENCHI, C.; BLAXTER, M.L. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.265, p. 2407-2413, 1998.
- BARRETT, M.; SCHMIDT, J.M. A comparison between the amino acid composition of an egg parasitoid wasp and some of its hosts. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 59, p. 29-41, 1991.

- BECKAGE, N. E. Endocrine interactions between endoparasitic insects and their hosts. **Annual Review of Entomology**, v.30, p. 371-413, 1985.
- BECKAGE, N.E.; RIDDIFORD, L.M. Growth and development of the endoparasitic wasp *Apanteles congregatus*: dependence on host nutritional status and parasite load. **Journal of Insect Physiology**, v. 28, n.3, p. 329-334, 1982.
- BORDENSTEIN, S. R.; WERREN, J. H. Do *Wolbachia* influence fecundity in *Nasonia vitripennis*? **Heredity**, v. 84, p.54-62, 2000.
- BRATTI, A. Tecniche di allevamento “*in vitro*” per gli stadi di insetti entomofagi parasitoidi. **Bolletino dell Istituto di Entomologia “Guido Grandi” della Università di Bologna**, v.44, p.169-220, 1990.
- BRATTI, A.; MONTI, M. Allevamento *in vitro* delle larve di *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Dipt., Tachinidae) su omogeneizzato di crisalidi di *Galleria mellonella* L. (Lep., Galleridae). **Bolletino dell Istituto di Entomologia “Guido Grandi” della Università di Bologna**, v.43, p.115-126, 1988.
- BRATTI, A.; NETTLES Jr., W.C. *In vitro* rearing of *Palexorista laxa* (Curran) (Diptera: Tachinidae) on haemolymph-based diets. **Bolletino dell Istituto di Entomologia “Guido Grandi” della Università di Bologna**, v.43, p.25-30, 1988.
- BREEUWER, J.A.J.; WERREN, J.H. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. **Nature**, v. 346, p.558-560, 1990.
- BREEUWER, J.A.J.; WERREN, J.H. Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis*. **Genetics**, v. 135, p. 565-574, 1993.
- CABELLO, T.; VARGAS, P. Temperature as a factor influencing the form of reproduction of *Trichogramma cordubensis* Vargas & Cabello (Hym., Trichogrammatidae). **Zeitschrift fur Angewandte Entomologie**, v.100, p.434-441, 1985.

- CAMPADELLI, G.; DINDO, M.L. Recenti progressi nello studio delle diete artificiali per el allevamento di insetti entomofagi parassiti. **Bolletino dell Istituto di Entomologia "Guido Grandi" della Università di Bologna**, v.42, p.101-108, 1987.
- CHARLAT, S.; MERÇOT, H. *Wolbachia* trends. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 15, n.11, p. 438-440, 2000.
- CIOCIOLA Jr., A.I.; ALMEIDA, R.P.; ZUCCHI, R.A.; STOUTHAMER, R. Detecção de *Wolbachia* em uma população telítica de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae) via PCR com o *primer* específico *wsp*. **Neotropical Entomology**, v.30, n.3, p.489-491, 2001.
- CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P. Parasitism capacity of *Trichogramma galloi* Zucchi and *T. pretiosum* Riley reared *in vitro* and *in vivo*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *TRICHOGRAMMA* AND OTHER EGG PARASITES, 4., Cairo, 1984. Paris: INRA, 1994. p. 149-154. (Les Colloques de l'INRA, 73).
- 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, p.828-834, 1996a.
- CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P. Comparison of hemolymph and holotissues of different species of insects as diets components for *in vitro* rearing of *Trichogramma galloi* Zucchi and *T. pretiosum* Riley. **Biological Control**, v.6, p.401- 406. 1996b.
- 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. (Ed.), **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997a., 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, n. 3, p. 172-176, 1997b.

- CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P. *In vitro* rearing of parasitoids: constraints and perspectives. **Trends in Entomology**, v.2, p.19-32, 1999.
- DADD, R.H. Nutrition: organisms. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Eds). **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. London: Pergamon Press, 1985. v. 4, p.313-390.
- DAI, K.; ZHANG, L.W.; MA, Z.J.; ZHONG, Q.X.; CAO, A.H.; XU, K.J.; LI, Q.; GAO, Y.G. Research and utilization of artificial host egg for propagation of parasitoid *Trichogramma*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *TRICHOGRAMMA* AND OTHER EGG PARASITES, 2., Guangzhou, 1986. Paris: INRA, 1988. p. 305-309. (Les Colloques de l'INRA, 43).
- DAI, K.; MA, Z.J.; ZHANG, L.W.; CAO, A.H.; ZHAN, Q.X.; XU, K.J.; PAN, D.S.; ZHANG, J.L. Research on technology of industrial production of the artificial host egg of *Trichogramma*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *TRICHOGRAMMA* AND OTHER EGG PARASITES, 3, San Antonio, 1990. Paris: INRA, 1991. p. 137-139. (Les Colloques de l'INRA, 56).
- DEDEINE, F.; VAVRE, F.; FLEURY, F.; LOPPIN, B; HOCHBERG, M.E.; BOULÉTRAU, M. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.11, p.6247-6252, 2001.
- DOBSON, S.L.; MARSLAND, E.J.; RATTANADECHAKUL, W. *Wolbachia*-induced Cytoplasmic incompatibility in single and superinfected *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v.38, n.3, p. 382-387, 2001.
- DOBSON, S.L.; BOURTZIS, K.;BRAIG, H.R.; JONES, B.F.; ZHOU, W.; ROUSSET, F.; O'NEILL, S. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.29, p. 153-160, 1999.

- FANTI, P.; VINSON, S.B. *In vitro* rearing of *Muscidifurax zaraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae) on artificial diets with and devoid of insect material. **Biological Control**, v.18, p. 49-54, 2000.
- FLANDERS, S.E. Mass production of egg parasites of the genus *Trichogramma*. **Hilgardia**, v. 4, p. 465-501, 1930.
- GAO, Y.G.; DAI, K.J.; LIU, S.S. Studies on the artificial host egg for *Trichogramma*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *TRICHOGRAMMA* AND OTHER EGG PARASITES, 1., Antibes, 1982. Paris: INRA, 1982. p. 181. (Les Colloques de l'INRA, 9).
- GELMAN, D.B.; CARPENTER, J.E.; GREANY, P.D. Ecdysteroid levels/profiles of the parasitoid wasp *Diapetimorpha introita*, reared on its host, *Spodoptera frugiperda* and on an artificial diet. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n.4, p.457-465, 2000.
- GIRIN, C.; BOULÉTREAU, M. Microorganism associated variation in host infestation efficiency in a parasitoid wasp, *Trichogramma bourarachae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Experientia**, v. 51, p. 398-401, 1995.
- GOMES, S.M.; PARRA, J.R.P. The parasitization as a tool for factitious host selection for *Trichogramma galloi* Zucchi and *T. pretiosum* Riley. **Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Landund Forstwirtschaft**, v. 356, p.13-23, 1998.
- GREANY, P. *In vitro* culture of hemipterous larval endoparasitoids. **Journal of Insect Physiology**, v.32, n.4, p.409-419, 1986.
- GREENBERG, S.M.; NORDLUND, D.A.; WU, Z. Influence of rearing host on adult size and ovipositional behavior of mass produced female *Trichogramma minutum* Riley and *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Biological Control**, v.11, p.43-48, 1998.
- GRENIER, S. Rearing of *Trichogramma* and other egg parasitoids on artificial diets. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S.A. (Ed.), **Biological control with egg parasitoids**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 73- 92.

- GRENIER, S. Desenvolvimento e produção *in vitro* de *Trichogramma*. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Ed.) ***Trichogramma e o controle biológico aplicado***. Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 235-258.
- GRENIER, S.; BONNOT, G. Development of *Trichogramma dendrolimi* and *T. maidis* (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*) in artificial media and artificial host eggs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *TRICHOGRAMMA* AND OTHER EGG PARASITES, 2., Guangzhou, 1986. Paris: INRA, 1988. p. 319-326. (Les Colloques de l'INRA, 43).
- GRENIER, S.; LIU, W.H. Antifungals: mold control and safe levels in artificial media for *Trichogramma* (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*). **Entomophaga**, v.35, n.2, p.283-291, 1990.
- GRENIER, S.; BONNOT, G.; DELOBEL, B. Définition et mise au point de milieux artificiels pour l'élevage *in vitro* de *Phryxe caudata* Rond. (Diptera: Tachinidae). I. Survie du parasitoïde sur milieux dont la composition est basée sur celle de l'hémolymphe de l'hôte. **Annales de Zoologie Écologie Animale**, v.6, n.4, p.511-520, 1974.
- GRENIER, S.; BONNOT, G.; DELOBEL, B. Définition et mise au point de milieux artificiels pour l'élevage *in vitro* de *Phryxe caudata* Rond. (Diptera: Tachinidae). II. Croissance et mues larvaires du parasitoïde em milieux définis. **Annales de Zoologie Écologie Animale**, v.7, n.1, p.13-25, 1975.
- GRENIER, S.; DELOBEL, B.; BONNOT, G. Physiological considerations of importance to the success of *in vitro* culture: an overview. **Journal of Insect Physiology**, v. 32, n.4, p.403-408, 1986.
- GRENIER, S.; VEITH, V.; RENOU, M. Some factors stimulating oviposition by the oophagous parasitoid *Trichogramma brassicae* Bezd. (Hym.: *Trichogrammatidae*) in artificial host eggs. **Journal of Applied Entomology**, v.115, n.1, p. 66-76, 1993.

- GRENIER, S.; GREANY, P.; COHEN, A.C. Potential for mass release of insect parasitoids and predators through development of artificial culture techniques. In: ROSEN, D.; BENNET, F.D.; CAPINERA, J.L. (Ed.) **Pest management in the subtropics: biological control – a Florida perspective**. Andover: Intercept. Pub., 1994. cap. 10, p.181-205.
- GRENIER, S.; BONNOT, G.; DELOBEL, B; LA VIOLETTE, P. Développement en milieu artificiel du parasitoïde *Lixophaga diatraeae* (Townsend) (Diptera: Tachinidae). Obtention de l'imago à partir de l'oeuf. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**. Serie D, v. 287. p. 535-538, 1978.
- GRENIER, S.; YANG, H.; GUILLAUD, J.; CHAPELLE, L. Comparative development and biochemical analyses of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) grown in artificial media with hemolymph or devoid of insect components. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 111B, p. 83-90, 1995.
- GRENIER, S.; HAN, S.C.; CHAPELLE, L.; LIU, W.H.; GUILLAUD, J. *In vitro* development of *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in long-term, stored, freeze-dried artificial media. **Biocontrol Science and Technology**, v.8, p. 589-596, 1998a.
- GRENIER, S.; PINTUREAU, B.; HEDDI, A.; LASSABLIERE, F.; JAGER, C.; LOUIS, C.; KHATCHADOURIAN, C. Successful horizontal transfer of *Wolbachia* symbionts between *Trichogramma* wasps. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v.265, p. 1441-1445, 1998b.
- GUERRA, A.A.; ROBACKER, K.M.; MARTINEZ, S. *In vitro* rearing of *Bracon mellitor* and *Catolaccus grandis* with artificial diets devoid of insect components. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.68, n.3, p.303-307, 1993.
- HAN, S.C.; CHEN, Q.; LI, L. A study of the oviposition synergists for *in vitro* rearing *Trichogramma* spp. **Entomologia Sinica**, v.1, n.4, p. 333-338, 1994.

- HOFFMAN, J.D.; IGNOFFO, C.M.; LONG, S.H. *In vitro* cultivation of an endoparasitic wasp, *Pteromalus puparum*. **Annals of the Entomological Society of America**, v.66, n.3, p.633-634, 1973.
- HOFFMAN, J.D.; IGNOFFO, C.M.; DICKERSON, W.A. *In vitro* rearing of the endoparasitic wasp, *Trichogramma pretiosum*. **Annals of the Entomological Society of America**, v.68, n.2, p.335-336, 1975.
- HOFFMANN, A. A.; TURELLI, M.; HARSHMAN, L. G. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. **Genetics** v.126, p. 933-948, 1990.
- HOHMANN, C.L.; LUCK, R.F.; OATMAN, E.R. A comparison of longevity and fecundity of adult *Trichogramma platneri* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) reared from eggs of the cabbage looper and the angoumois grain moth, with and without access to honey. **Journal of Economic Entomology**, v.81, n.54, p. 1307-1312, 1988.
- HOUSE, H.L. Nutricional studies with *Pseudosarcophaga affinis* (Fall.), a dipterous parasite of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.). I. A chemically defined medium and aseptic-culture technique. **Canadian Journal of Zoology**, v.32, n.5, p.331-341, 1954.
- HOUSE, H.L. Nutrition. In: ROCKESTEIN, M. (Ed). **The physiology of insecta**. New York: Academic Press, 1974, v. 5, p.1-60.
- HU, J.S.; VINSON, S.B. *In vitro* rearing of *Campoletis sonorensis*, a larval endoparasitoid of *Heliothis virescens* from egg to third instar in an artificial medium devoid of insect sources. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.85, n.2, p.263-273, 1997.
- HU, J.S.; VINSON, S.B. The *in vitro* development from egg to prepupa of *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) in an artificial medium: importance of physical factors. **Journal of Insect Physiology**, v. 44, p. 455-461, 1998.

- HU, J.S; GELMAN, D.B.; BELL, R.A.; LOEB, M.J. *In vitro* rearing of *Edovum pluttleri*, an egg parasitoid of the Colorado potato beetle – development from egg through the pupal stage. **BioControl**, v. 43, p.1-16, 1998.
- HUIGENS, M.E.; LUCK, R.F.; KLAASSEN, R.H.G; MAAS, M.F.P.M; TIMMERMANS, M.J.T.N; STOUTHAMER, R. Infectious parthenogenesis. **Nature**, v.405, p.178-179, 2000.
- HURST, G.D.D.; HAMMARTON, T.C.; OBRYCHI, J.J.; TAMSIN, M.O.; MAJERUS, L.E. Male-killing bacterium in a fifth ladybird beetle, *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). **Heredity**, v. 77, p.177-185, 1996.
- JEYAPRAKASH, A.; HOY, M.A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. **Insect Molecular Biology**, v.9, p.393-405, 2000.
- JOHANOWICZ, D.L.; HOY, M.A. *Wolbachia* in a predator-prey system: 16S ribosomal DNA analysis of two phytoseids (Acari: Phytoseiidae) and their prey (Acari: Tetranychidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 89, p.435-441, 1996.
- JOHANOWICZ, D.L.; HOY, M.A. The manipulation of arthropod reproduction by *Wolbachia* endosymbionts. **Florida Entomologist**, v. 81, n.3, p.310-317, 1998.
- KAZMER, D.J; LUCK, R.F. Field tests of the size-fitness hypothesis in the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum*. **Ecology**, v.2, p. 412-425, 1995.
- LEWIS, W.J.; GROSS Jr., H.R.; PERKINS, W.D.; KNIPLING, E.F.; VOEGELÉ, J. Production and performance of *Trichogramma* reared on eggs of *Heliothis zea* and other hosts. **Environmental Entomology**, v.5, n.3, p.449-452, 1976.
- LI, L.Y. Mass production of *Trichogramma* spp. and *Anastatus japonicus* Ashmead with artificial diets in China. In.: FFTC-NARC INTERNATIONAL SEMINAR ON “THE USE OF PARASITIDS AND PREDATORS TO CONTROL AGRICULTURAL PESTS”, Tsukuba. 1989. **Proceedings**. Japan: Food and Fertilizer Technological Center, 1989. p.1-5.

- LI, L.Y. Worldwide use of *Trichogramma* for biological control in different crops: a survey. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S.A. (Ed.), **Biological control with egg parasitoids**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 37-53.
- LI, L.Y.; LIU, W.H.; CHEN, C.S.; HAN, S.T.; SHIN, J.C.; DU, H.S.; FENG, S.Y. *In vitro* rearing of *Trichogramma* spp. and *Anastatus* sp. in artificial eggs and the methods of mass production. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *TRICHOGRAMMA* AND OTHER EGG PARASITES, 2., Guangzhou, 1986. Paris: INRA, 1988. p. 339-352. (Les Colloques de l'INRA, 43).
- LIU, W.; WEN, S.Y.; CHEN, Q.; LI, L.Y. Lyophilized diets for *in vitro* rearing *Trichogramma dendrolimi* and *Bracon greeni*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 19. Beijing, 1992. **Proceedings**. Beijing 1992. p.321.
- LIU, J.F.; LIU, Z.C.; WANG, C.X.; YANG, W.H.; LI, D.S. Mechanized production of artificial host egg for the mass-rearing of parasitic wasps. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *TRICHOGRAMMA* AND OTHER EGG PARASITES, 4., Cairo, 1994. Paris: INRA, 1995a. p. 163-164. (Les Colloques de l'INRA, 73).
- LIU, J.F.; LIU, Z.C.; WANG, C.X.; YANG, W.H.; LI, D.S. Study on rearing of *Trichogramma minutum* on artificial host eggs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *TRICHOGRAMMA* AND OTHER EGG PARASITES, 4., Cairo, 1994. Paris: INRA, 1995b. p. 161-162. (Les Colloques de l'INRA, 73).
- MEER, M.M.M. van. Phylogeny and host interactions of thelytoky inducing *Wolbachia* in Hymenoptera. Wageningen, 1999. 118p. Thesis (Ph.D). Wageningen Agricultural University.
- MERÇOT, H. Incompatibilités cytoplasmiques liées à la présence des *Wolbachia*. **InfoZoo**, v. 12, p. 14-20, 1996.

- MORALES-RAMOS, J.A.; ROJAS, M. G.; R.J. COLEMAN; KING, E.G. Potential use of *in vitro*-reared *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae) for biological control of the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) **Journal of Economic Entomology**, v.91, n. 1, p. 101-109, 1998.
- MORRISON, R.K.; NETTLES Jr., W.R.; BALL, D.; VINSON, S.B. Successful oviposition by *Trichogramma pretiosum* through a synthetic membrane. **The Southwestern Entomologist**, v.8, n.4, p.248-251, 1983.
- NAKAHARA, Y; HIRAOKA, T.; IWABUSHI, K. Growth-promoting effects of ecdysteroids and juvenile hormone on *in vitro* development of the larval endoparasitoid, *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae). **Journal of Insect Physiology**, v.46, n.4, p.467-476, 2000.
- NETTLES Jr., W.R. Effects of soy flour, bovine serum albumin, and three amino acid mixtures on growth and development of *Eucelatoria bryani* (Diptera: Tachinidae) reared on artificial diets. **Environmental Entomology**, v.15, n.6, p.1111 – 1115, 1986.
- NETTLES Jr., W.R. Amino acid requirements for growth and development of the tachinid *Eucelatoria bryani*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 86A, n.2, p.349-354, 1987.
- NETTLES Jr., W.R; WILSON, C.M.; ZISER, S.W. A diet and methods for *in vitro* rearing the tachinid, *Eucelatoria* sp. **Annals of the Entomological Society of America**, v.73, n.2, p. 180-184, 1980.
- NETTLES Jr., W.R.; MORRISON, R.K.; XIE, Z.N.; BALL, D.; SHENKIR, C.A.; VINSON, S.B. Synergistic action of potassium chloride and magnesium sulfate on parasitoid wasp oviposition. **Science**, v.218, p.164-166, 1982.
- NETTLES Jr., W.R.; MORRISON, R.K.; XIE, Z.N.; BALL, D.; SHENKIR, C.A.; VINSON, S.B. Effect of cations, anions and salt concentrations on oviposition by *Trichogramma pretiosum* in wax eggs. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.33, n.3, p. 283-289, 1983.

- NETTLES Jr., W.R.; MORRISON, R.K.; XIE, Z.N.; BALL, D.; SHENKIR, C.A.; VINSON, S.B. Effect of artificial diet media, glucose, protein hydrolizates and other factors on oviposition in wax eggs by *Trichogramma pretiosum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.38, n.1, p. 121-129, 1985.
- 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* reared adults. **Biological Control**, v.9, p. 201-207, 1997.
- NOTARTE, A.; MERRITT, D.J. Successful *in vitro* rearing of *Trichogramma australicum* (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*) on artificial diet containing cultured insect cells. **Bulletin of Entomological Research**, v. 91, p. 227-229, 2001.
- O'NEILL, S. L.; HOFFMANN, A. A.; WERREN, J. H. **Influential passengers: Inherited microorganisms and arthropod reproduction**. Oxford: Oxford University Press, 1997. 232p.
- PARRA, J.R.P. Consumo e utilização de alimentos por insetos. In: PANIZZU, A.R.; PARRA, J.R.P. (Ed.) **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 1991. cap.2, p. 9-65.
- PARRA, J.R.P. Técnicas de criação de *Anagasta kuehniella*, hospedeiro alternativo para produção de *Trichogramma*. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Ed.) **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 121-150.
- 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.; LOPES, J.R.S.; SERRA, J.H.P.; SALES Jr., O. Metodologia de criação de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) para produção massal de *Trichogramma* spp. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 18, n.2, p. 403-415, 1989.

- PAVLIK, J. The size of the female and quality assessment of mass-reared *Trichogramma* spp. **Entomologia Experimentalis et Applicata** v. 66, p. 171-177, 1993.
- PINTUREAU, B.; BOLLAND, P. A *Trichogramma* species showing a better adaptation to high temperature than its symbionts. **Biocontrol Science and Technology**, v.11, p.15-22, 2001.
- PINTUREAU, B.; LOUIS, C.; CHAPELLE, L. Symbiose entre microorganismes et Trichogrammes (Hym. *Trichogrammatidae*): intérêt pour la lutte biologique. **Bulletin de la Société Zoologique de France**. v.118, p.159-167, 1993.
- PINTUREAU, B.; GRENIER, S.; LASSABLIÈRE, F. Efficiency of the *Wolbachia* vertical transmission in *Trichogramma*. **Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Landund Forstwirtschaft**, v.356, p.93-96, 1998.
- PINTUREAU, B.; CHAPELLE, L.; DELOBEL, B. Effects of repeated thermic and antibiotic treatments on a *Trichogramma* (Hym., *Trichogrammatidae*) symbiont. **Journal of Applied Entomology**,. v.123, p. 473-483, 1999.
- PINTUREAU. B.; GRENIER, S.; BOLÉAT, B; LASSABLIÈRE, F.; HEDDI, A.; KHATCHADOURIAN, C. Dynamics of *Wolbachia* populations in tranfected lines of *Trichogramma*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 76, p.20-25, 2000.
- POINSOT, D.; MERÇOT, H. *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans*: does the female host bear a physiological cost? **Evolution** v.51, p. 180-186, 1997.
- QIN, J.; WU, Z.X. Studies on cultivation of *Trichogramma in vitro*: ovipositional behaviour and larval nutritional requirements of *T. dendrolimi*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *TRICHOGRAMMA* AND OTHER EGG PARASITES, 2., Guangzhou, 1986. Paris: INRA, 1988. p. 379-387. (Les Colloques de l'INRA, 43).
- RAJENDRAM, G. F. Oviposition behavior of *Trichogramma californicum* on artificial substrats, **Annals of the Entomological Society of America**, v. 71, n.1, p. 92-94, 1978a.

- RAJENDRAM, G. F. Some factors affecting oviposition of *Trichogramma californicum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in artificial media. **The Canadian Entomologist**, v.110, n.4, p.345-352, 1978b.
- RIGAUD, T.; JUCHAULT, P. Genetic control of the vertical transmission of a cytoplasmic sex factor in *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea: Oniscidea). **Heredity**, v. 68, p.47-52, 1992.
- ROKAS, A. *Wolbachia* as a speciation agent. **Trends in Ecology and Evolution**, v.15, p. 44-45, 2000.
- ROUSSET, F.; BOUCHON, D.; PINTUREAU, B.; JUCHAULT, P.; SOLIGNAC, M. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.250, p. 91-98, 1992.
- ROUSSET, F.; BRAIG, H.R.; O'NEILL, S. A stable triple *Wolbachia* infection in *Drosophila* with nearly additive incompatibility effects. **Heredity**, v. 82, p. 620-627, 1999.
- ROUSSET, F.; RAYMOND, M. Cytoplasmic incompatibility in insects: why sterilize females?. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 6, n.2, p. 54-57, 1991.
- SÁ, L.A.N; PARRA, J.R.P.P. Biology and parasitism of *Trichogramma pretiosum* Riley (Hym., Trichogrammatidae) on *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lep., Pyralidae) and *Heliothis zea* (Boddie) (Lep., Noctuidae) eggs. **Journal of Applied Entomology**, v.118, n.1, p. 38-43, 1994.
- SCHILTHUIZEN, M.; STOUTHAMER, R. Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in *Trichogramma* wasps. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.264, p. 361-366, 1997.
- SCRIBER, J.M.; SLANSKY, F. The nutritional ecology of immature insects. **Annual Review of Entomology**, v.26, p.183-211. 1981.

- SHAPIRO, M.; IGNOFFO, C.M. Growth of *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) cells adapted to various culture media. **Annals of the Entomological Society of America**, v.66, n.2, p. 270-273, 1973.
- SILVA, I. M. M. S. Identification and evaluation of *Trichogramma* parasitoids for biological pest control, Wageningen, 1999. 151p. Thesis (PhD). Wageningen Agricultural University.
- SILVA, I. M. M. S.; VAN MEER, M. M. M.; ROSKAM, M. M.; HOOGENBOOM, A.; GORT, G.; STOUTHAMER, R. Biological control potential of *Wolbachia*-infected versus uninfected wasps: laboratory and greenhouse evaluation of *Trichogramma cordubensis* and *T. deion* strains. **Biocontrol Science and Technology**, v.10, p.223-238, 2000.
- SINKINS, S.P.; O'NEILL, S.L. *Wolbachia* as a vehicle to modify insect populations. In: HANDLER, A.M.; JAMES, A.A. (Ed.) **Insect transgenesis: methods and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p.271-287.
- SLANSKY, F. Nutritional ecology of endoparasitic insects and their hosts: an overview. **Journal of Insect Physiology**, v. 32, n.4, p. 255-261, 1986.
- SLANSKY, F.; SCRIBER, J. M. Food consumption and utilization. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v.4, p.97-163.
- STOLK, C.; STOUTHAMER, R. Influence of a cytoplasmic incompatibility-inducing *Wolbachia* on the fitness of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. **Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society**, v.7, p. 33-37, 1996.
- STOUTHAMER, R. Effectiveness of several antibiotics in reverting thelytoky to arrhenotoky in *Trichogramma* spp. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *TRICHOGRAMMA* AND OTHER EGG PARASITOIDS, 3. San Antonio, 1990. Paris: INRA, 1991. p. 119- 122. (Les Colloques de l'INRA, 56).

- STOUTHAMER, R. The use of sexual versus assexual wasps in biological control. **Entomophaga**, v.38, n. 1, p. 1-6, 1993.
- STOUTHAMER, R.; LUCK, R. F. Influence of microbe-associated parthenogenesis on the fecundity of *Trichogramma deion* and *T. pretiosum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.67, p.183-192, 1993.
- STOUTHAMER, R.; KAZMER, D. J. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. **Heredity**, v. 73, p.317-327, 1994.
- STOUTHAMER, R.; WERREN, J.H. Microbes associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 61, p. 6-9, 1993.
- STOUTHAMER, R.; LUCK, R.F.; HAMILTON, W.D. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/ *Trichogrammatidae*) to revert to sex. **Proceedings of Natural Academy of Science**, v. 87, p. 2424-2427, 1990.
- STOUTHAMER, R; LUKO, S.; MAK, F. Influence of parthenogenesis *Wolbachia* on host fitness. **Norwegian Journal of Agricultural Sciences**, v. 14, suppl. 16, p.117-122, 1994.
- STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J.A.J; HURST, G.D.D. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 71-102, 1999.
- STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J.A.J; LUCK, R.F. WERREN, J.H. Molecular identification of microorganisms associated with partenogenesis. **Nature**, v. 361, p.66-68, 1993.
- STRAND, M.R.; VINSON, S.B. *In vitro* culture of *Trichogramma pretiosum* on an artificial medium. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.39, n.2, p. 203-209, 1985.

- STRAND, M.R.; VINSON, S.B.; NETTLES Jr. W.C.; XIE, Z.N. *In vitro* culture of the egg parasitoid *Telenomus heliothidis*: the role of teratocytes and medium consumption in development. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.46, n.1, p. 71-78, 1988.
- THOMPSON, S.N. The amino acid requirements for larval development of the hymenopterous parasitoid *Exeristes roborator* Fabricius (Hymenoptera: Ichneumonidae). **Comparative Insect Biochemistry and Physiology**, v.53A, p.211-213, 1976.
- THOMPSON, S.N. Artificial culture techniques for rearing larvae of the chalcidoid parasite, *Brachymeria intermedia*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.27, n.2, p. 133-143, 1980.
- THOMPSON, S.N. Essential aminoacid requirements of four species of parasitic hymenoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.69A, p. 173-174, 1981.
- THOMPSON, S.N. Nutrition and *in vitro* culture of insect parasitoids. **Annual Review of Entomology**, v.31, p.197-219, 1986.
- THOMPSON, S.N.; HAGEN, K.S. Nutrition of entomophagous insects and other arthropods. In: BELLOWS, T.S.; FISCHER, T.W. (Ed.) **Handbook of biological control**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 594-652.
- THOMPSON, S.N.; BEDNAR, L.; NADEL, H. Artificial culture of the insect parasite *Pachycrepoideus vindemiae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.33, n.2, p. 121-122, 1983.
- VAVRE, F.; GIRIN, C.; BOULÉTREAU, M. Phylogenetic status of a fecundity-enhancing *Wolbachia* that does not induce thelytoky in *Trichogramma*. **Insect Molecular Biology** v.8, p.67-72, 1999a.
- VAVRE, F.; FLEURY, F.; LEPETIT, D.; FOUILLET, P.; BOULETRAU, M. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n.12, p. 1711-1723, 1999b.

- VOLKOFF, N.; VINSON, S.B.; WU, ZX; NETTLES, W.C. *In vitro* rearing of *Trissolcus basalis* (Hym., Scelionidae) an egg parasitoid of *Nezara viridula* (Hem., Pentatomidae). **Entomophaga**, v. 37, p. 141-148, 1992.
- WANG, Z.; SMITH, S.M. Phenotypic differences between thelytokous and arrhenotokous *Trichogramma minutum* from *Zeiraphera canadensis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 78, p. 315-323, 1996.
- WERREN, J.H. Biology of *Wolbachia*. **Annual Review of Entomology**, v. 42, p. 587-609, 1997a.
- WERREN, J.H. *Wolbachia* run amok. **Proceedings of the National Academy of USA**, v. 94, p. 11154-11155, 1997b.
- WERREN, J.H.; WINDSOR, D.; GUO, L. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.262, p.197-204, 1995.
- WU, Z.X.; QIN, J. Ovipositional response of *Trichogramma dendrolimi* to the chemical contents of artificial eggs. **Acta Entomologica Sinica**, v. 25, n.4, p.363-372, 1982.
- XIE, Z.N.; NETTLES Jr., W.C.; MORRISON, R.K.; IRIE, K.; VINSON, S.B. Three methods for the *in vitro* culture of *Trichogramma pretiosum* Riley. **Journal of Entomological Science**, v. 21, n.2, p. 133-138, 1986a.
- XIE, Z.N.; NETTLES Jr., W.C.; MORRISON, R.K.; IRIE, K.; VINSON, S.B. Effect of ovipositional stimulants and diets on the growth and development of *Trichogramma pretiosum* *in vitro*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.42, n.1, p. 119-124, 1986b.
- 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, n.2, p. 107-110, 1997.

- YAZGAN, S.; HOUSE, H.L. An hymenopterous insect, the parasitoid *Itoplectis conquisitor* reared axenically on a chemically-defined synthetic diet. **The Canadian Entomologist**, v. 102, n.10, p. 1304-1306, 1970.
- YAZLOVETSKY, I.G. Development of artificial diets for entomophagous insects by understanding their nutrition and digestion, p.41-62. In: ANDERSON, T.E.; LEPPA, N.C. (Ed.) **Advances in insect rearing for research & pest management**. San Francisco: Westview Press. 1992. p.41-62.
- ZCHORI-FEIN, E.; GOTTLIEB, Y.; COLL, M. *Wolbachia* density and host fitness components in *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 75, p. 267-272, 2000.
- ZHANG, L.W.; CAO, A.H. A study on the rearing of *Amblyseius nicholsi* (Acari: Phytoseidae) on artificially produced *Trichogramma* pupae. **Chinese Journal of Biological Control**, v.9, n.1, p.9-11, 1993.
- ZHONG, L. S.; ZHANG. J.L. Influence of diet pH on the development and efficacy of reproduction of *Trichogramma confusum* (Hym.: Trichogrammatidae) in artificial rearings. **Chinese Journal of Biological Control**, v.5, n.3, p.101-103, 1989.