**CONTROLE DE QUALIDADE DE *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879
(HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE) EM
CRIAÇÕES DE LABORATÓRIO**

LUSINÉRIO PREZOTTI

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **José Roberto Postali Parra**

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

Janeiro – 2001

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

Prezotti, Lusinério

Controle de qualidade de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera : Trichogrammatidae) em criações de laboratório / Lusinério Prezotti. - - Piracicaba, 2001.
81 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Controle biológico 2. Controle de qualidade 3. Criação massal 4. Inseto-parasitoíde
5. Tricogramatídeo I. Título

CDD 595.79

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

A DEUS,
fonte de força e perseverança,
AGRADEÇO

À minha esposa, Joelma Carla, e
aos meus filhos, Marina e Henrique,
por me amarem, compreenderem e serem meu estímulo
a nunca desanimar frente às dificuldades,

DEDICO

Aos meus pais, Henrique e Aparecida,
meus exemplos de vida,
e
às minhas irmãs e cunhado,
Luciana, Lusinete e Walter,
pelo carinho e incentivo,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP, pela oportunidade de realização do curso;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos que viabilizou minha participação no curso de Pós- Graduação;

Ao Dr. José Roberto Postali Parra, professor titular do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, da ESALQ/USP, pela orientação, apoio e valiosos ensinamentos;

Ao Dr. Roland Vencovsky, professor titular aposentado do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pela disponibilidade e interesse na co-orientação da tese;

Ao Dr. Ivan Cruz, Chefe Adjunto de Pesquisa e Pesquisador responsável pelo Laboratório de Criação de Insetos da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas - MG, pelo apoio, ao disponibilizar instalações e equipamentos para a realização de parte dos experimentos da tese e pela amizade;

À Dr^a. Francisca Nemauro P. Haji, pesquisadora responsável pelo Setor de Entomologia da Embrapa Semi-árido, em Petrolina - PE, pela amizade e incentivo à realização do curso de doutorado;

Ao Dr. Roberto A. Zucchi, professor responsável pelo laboratório de Taxonomia de Insetos da ESALQ/USP, e à doutoranda Ranise Barbosa Quirino, do mesmo setor, pela confirmação específica das populações de *Trichogramma*;

Ao Dr. Carlos Tadeu dos Santos Dias, professor do Departamento de Ciências Exatas da ESALQ/USP, e ao Engenheiro Agrônomo Alexandre S.G. Coelho, doutorando do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pela orientação na análise estatística;

Aos professores do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, pelos ensinamentos recebidos;

À Neide Graziano Zério, técnica de laboratório do setor de Biologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, pela amizade e colaboração durante a realização dos trabalhos;

Ao Biólogo Heraldo Negri de Oliveira, técnico de laboratório do setor de Biologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, pelo apoio na manutenção das criações em laboratório e pelas fotos;

À Bióloga Patrícia Milano, mestranda do curso de Entomologia da ESALQ/USP, e à Engenheira Agrônoma Milena Simonetti, pela amizade e valioso apoio na condução e avaliação dos experimentos;

A todos os funcionários e bolsistas do Laboratório de Criação de Insetos (LACRI) da Embrapa Milho e Sorgo, pela amizade e apoio na condução dos experimentos, em especial aos laboratoristas Geraldo Magela da Fonseca e Izaías Tadeu Barbosa Duarte e ao estagiário Fernando da Silva Ribeiro, pelo constante e alegre convívio;

A Marccone César Mendonça Chagas, Pesquisador da EMBRAPA/EMPARN e colega de pós-graduação, pelos comentários precisos, valiosas opiniões e amizade;

Aos Colegas professores da Universidade Vale do Rio Doce (UNIVALÉ), pela amizade e incentivo;

A todos os colegas e amigos do curso de Pós-graduação em Entomologia da ESALQ/USP, que de uma forma ou de outra colaboraram para a realização deste trabalho; em especial a Eduardo Barbosa Bezerra e Maurício Sérgio Zacarias;

Aos funcionários do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todas as pessoas que fazem parte do meu convívio, que por um simples pensamento ou desejo bom, me ajudaram a finalizar com êxito essa tese.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Controle de qualidade em criações de inimigos naturais.....	4
2.2 Modificações sofridas por populações de laboratórios.....	6
2.3 Aspectos genéticos envolvendo criações de laboratório.....	8
2.4 Controle de qualidade em criações de <i>Trichogramma</i> spp.....	13
3 EFEITO DO TAMANHO DA POPULAÇÃO FUNDADORA SOBRE A QUALIDADE DE POPULAÇÕES SEXUADAS DE <i>Trichogramma</i> <i>pretiosum</i> , EM LABORATÓRIO.....	17
RESUMO.....	17
SUMMARY.....	18
3.1 INTRODUÇÃO.....	19
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.2.1 Origem e manutenção dos parasitóides.....	21
3.2.2 Início das colônias e monitoramento da qualidade.....	22
3.2.3 Análise estatística dos dados.....	24
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25

4	CONTROLE DE QUALIDADE DE POPULAÇÕES TELÍTOCAS E SEXUADAS DE <i>Trichogramma pretiosum</i> , EM LABORATÓRIO.....	35
	RESUMO.....	35
	SUMMARY.....	36
4.1	INTRODUÇÃO.....	37
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.2.1	Origem e manutenção dos parasitóides.....	39
4.2.2	Seleção das populações e monitoramento da qualidade.....	40
4.2.3	Análise estatística dos dados.....	43
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5	TESTE DE VÔO COMO CRITÉRIO DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE <i>Trichogramma pretiosum</i> : ADAPTAÇÃO DE METODOLOGIA.....	52
	RESUMO.....	52
	SUMMARY.....	53
5.1	INTRODUÇÃO.....	54
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
5.2.1	Obtenção e manutenção dos parasitóides.....	56
5.2.2	Descrição dos modelos para testes de vôo.....	56
5.2.3	Comparação de modelos para testes de vôo.....	59
5.2.4	Controle de qualidade de populações de <i>T. pretiosum</i> , através do teste de vôo.....	59
5.2.5	Análise estatística dos dados.....	61
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.3.1	Comparação de modelos para testes de vôo.....	61
5.3.2	Controle de qualidade de populações de <i>T. pretiosum</i> , através do teste de vôo.....	64
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
7	CONCLUSÕES.....	71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Importância relativa dos componentes de qualidade em relação ao objetivo da produção e uso de <i>Trichogramma</i> (Bigler, 1994).....	14
2 Controle de qualidade para produção e uso de <i>Trichogramma</i> criado massalmente (Laing & Bigler, 1991).....	15
3 A - Fêmea de <i>Trichogramma pretiosum</i> parasitando ovos de <i>Anagasta kuehniella</i> ; B - Ovos de <i>A. kuehniella</i> parasitados (pretos). (Fotos por Heraldo Negri de Oliveira).....	24
4 Regressão entre o número médio de ovos parasitados e o coeficiente médio de endocruzamento (F), em três populações sexuadas de <i>Trichogramma pretiosum</i> (N_e de 1,5; 7,5 e 15 indivíduos fundadores), após 25 gerações de cruzamentos consanguíneos. Temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h.....	30
5 A - <i>Trichogramma</i> com asas normais; B - <i>Trichogramma</i> com asas atrofiadas (Desenho por Patrícia Milano).....	43
6 Monitoramento do parasitismo de cinco populações partenogenéticas telitocas de <i>Trichogramma pretiosum</i> , ao longo de 23 gerações de criação em laboratório. Temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h.	47

- 7 Valores médios do número efetivo (N_e), do número total (N) e do coeficiente de endogamia (F) de cinco populações sexuadas de *Trichogramma pretiosum* (iniciadas com 1 casal fundador), durante 25 gerações de criação em laboratório. Temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h..... 49
- 8 Unidade-teste para avaliação da atividade de vôo de *Trichogramma* spp. (modelo adaptado de Dutton e Bigler, 1995). **A** - Modelo montado; **B** - Componentes do modelo: **a** - plástico de polietileno preto; **b** - disco de isopor; **c** - elástico; **d** - tubo de PVC; **e** - placa de Petri; **C** - Anel de cola (barreira ao caminhamento). (Fotos por Heraldo Negri de Oliveira)..... 58
- 9 Unidades-teste para avaliação da atividade de vôo de *Trichogramma* em laboratório: **A** – Modelo original de Dutton & Bigler (1995), com indicação (setas) dos locais onde foram realizadas adaptações: **a** - pintura interna preta em substituição à folha plástica preta, **b** - anel de cola pincelado a 3,5 cm do fundo, ao invés de 2,5 cm, **c** - vedação do fundo com plástico preto e isopor em substituição à tampa plástica; **B** – Modelo ESALQ..... 60

LISTA DE TABELAS

Página

- 1 Análise da variância dos dados do monitoramento da qualidade de três populações sexuadas de *Trichogramma pretiosum* (iniciadas com 1; 5 e 10 casais fundadores), durante 25 gerações de laboratório. Temperatura $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, Umidade Relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h..... 27
- 2 Monitoramento do número total (N), do número efetivo (N_e) e do coeficiente de endocruzamento (F) de três populações sexuadas de *Trichogramma pretiosum* (iniciadas com 1; 5 e 10 casais fundadores), durante 25 gerações de laboratório. Temperatura $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h..... 28
- 3 Valores médios de cinco variáveis biológicas, obtidos no monitoramento da qualidade de três populações sexuadas de *Trichogramma pretiosum* (iniciadas com 1; 5 e 10 casais fundadores), durante 25 gerações de laboratório. Temperatura $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h..... 29
- 4 Valores médios de cinco variáveis biológicas, obtidos no monitoramento da qualidade de duas populações de *Trichogramma pretiosum* (telítoca e sexuada), durante várias gerações de criação em laboratório. Temperatura $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h..... 46

- 5 Comparação da eficiência de dois modelos para avaliação da atividade de vôo de *Trichogramma pretiosum*, em laboratório, com base na porcentagem de indivíduos capturados em diferentes locais das unidades-teste e na porcentagem de indivíduos deformados. Temperatura $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 24 h..... 63
- 6 Utilização do modelo ESALQ para o monitoramento da atividade de vôo de três populações de *Trichogramma pretiosum*, ao longo de várias gerações de laboratório, utilizando-se como critério de avaliação a porcentagem de indivíduos capturados em diferentes locais das unidades-teste e a porcentagem de indivíduos deformados. Temperatura $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 24 h..... 66

CONTROLE DE QUALIDADE DE *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE) EM CRIAÇÕES DE LABORATÓRIO

Autor: Lusinério Prezotti

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Postali Parra

RESUMO

O objetivo do trabalho foi realizar o controle de qualidade de populações de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, com base em avaliações biológicas, genéticas e comportamentais (porcentagem de indivíduos aptos a voar), considerando-se aspectos relacionados, principalmente, ao tamanho da população fundadora e ao tipo de reprodução do parasitóide. Os parasitóides foram obtidos em coletas de campo, sobre ovos de *Helicoverpa zea* (Bod., 1850), em milho, e mantidos em laboratório em ovos do hospedeiro alternativo *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879). Foram selecionados machos e fêmeas virgens, oriundos de locais diferentes, utilizando-os em cruzamentos controlados para iniciar as populações de laboratório. As populações foram submetidas a avaliações de qualidade, monitorando-se, em intervalos de duas a quatro gerações: o número de ovos parasitados, porcentagem de emergência, razão sexual, deformação, atividade de vôo e longevidade de adultos, número efetivo de indivíduos e coeficiente de endocruzamento. Concluiu-se que o endocruzamento não foi limitante para criações massais de *T. pretiosum*, sendo possível o início de criações de laboratório, com apenas um casal, mantendo-as por, pelo menos, 25 gerações, sem comprometer sua qualidade. Populações sexuadas de *T. pretiosum* apresentaram significativa superioridade,

em relação ao parasitismo e à habilidade para suportar adversidades no processo de criação, quando comparadas às populações telítocas. Independente da população inicial, ao longo das avaliações realizadas, a longevidade e o parasitismo foram variáveis adequadas para a detecção de perdas de qualidade em criações de laboratório; enquanto a porcentagem de emergência, a razão sexual e a porcentagem de deformação de adultos, não deram uma indicação precisa da qualidade dos parasitóides criados. O teste de vôo foi um método altamente eficiente na determinação da qualidade de populações de *T. pretiosum*, e o modelo ESALQ, proposto na presente pesquisa, permitiu uma melhor separação de "voadores" e "não-voadores" do parasitóide, podendo ser indicado como substituto do modelo padrão, recomendado pela IOBC. Portanto, em programas de controle de qualidade de *T. pretiosum*, o monitoramento das populações de laboratório pode ser simplificado, com avaliações direcionadas apenas às variáveis longevidade, parasitismo e atividade de vôo, neste caso, utilizando-se o modelo ESALQ.

QUALITY CONTROL OF *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE) IN LABORATORY REARINGS

Author: Lusinério Prezotti

Adviser: Prof. Dr. José Roberto Postali Parra

SUMMARY

The goal of this research was to accomplish the quality control of populations of *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, on the basis of biological, genetic and behavioural evaluations, considering related aspects, mainly, to the size of the founder population and the type of reproduction of the parasitoids. The parasitoids were acquired through field collectings, on eggs of *Helicoverpa zea* (Bod., 1850), in corn, and kept in laboratory in eggs of the factitious host *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879). Virgin males and females, collected in different places, were selected and used in controlled crossings to start the laboratory populations. The populations were submitted to quality evaluations, monitoring, in breaks of two to four generations: the number of parasitized eggs, emergence rate, sex ratio, deformation, flight activity, longevity of adults, effective number of individuals and the coefficient of inbreeding. It was concluded that the inbreeding is not a limiting factor for *T. pretiosum* mass rearing, being possible to start rearings by using only one couple, and keeping them for, at least, 25 generations, without affecting its quality. Sexual populations of *T. pretiosum* show significant superiority, related to the parasitism and the ability to support adversities in the rearing process, when compared to thelytokous populations. Independent from the starting

population, the longevity and the parasitism were adequate variables to detect the quality losses in the laboratory rearings; while the emergence rate, the sex ratio and the percentage of adults deformation, did not show an accuracy indication of the quality of the bred parasitoids. The flight test was a highly efficient method in the determination of the quality of *T. pretiosum* populations, and the ESALQ model, proposed in the current research, provided a better separation of flyers and non-flyers parasitoids, being able to be indicated as a substitute of the standard model, recommended by the IOBC. In the quality control programs of *T. pretiosum*, the monitoring of the laboratory populations can be simplified, with directed evaluations only to the longevity, parasitism and flight activity variables, in this case, using the ESALQ model.

1. INTRODUÇÃO

Em programas de Controle Biológico Aplicado, nos quais são produzidos milhões de parasitóides e/ou predadores em laboratório, a qualidade do inimigo natural é fundamental para que haja sucesso no campo. Isto é tão verdadeiro que, segundo Clarke & McKenzie (1992), o objetivo de um laboratório de criação massal é a produção de um grande número de inimigos naturais, de alta qualidade, para subseqüentes liberações em programas de controle biológico.

Leppla & Ashley (1989) definiram o controle de qualidade como sendo o monitoramento e controle sofisticado do complexo processo de produção para programas de criação massal que assegurem uma qualidade razoavelmente consistente do produto e garantam que tal produto alcance a performance desejada no campo. Desta forma, o objetivo do controle de qualidade é, verificar, ao longo das gerações, se a qualidade da colônia está sendo mantida (Lenteren, 1991).

A preocupação com a qualidade de inimigos naturais criados em laboratório é relativamente recente e tem aumentado bastante nos últimos anos, principalmente em função da expansão do uso do controle biológico e da exigência, por vários países, de normas rígidas, que garantam a eficiência desse método de controle, para permitir o seu uso na agricultura (Bigler, 1992). Dentre os inimigos naturais em que há maior preocupação com o controle de qualidade, em criações massais, estão aqueles do gênero *Trichogramma*, em função de sua ampla utilização mundial. Os insetos deste gênero são microhimenópteros exclusivamente parasitóides de ovos, apresentando ampla distribuição geográfica e um grande número de hospedeiros. Existem aproximadamente 180 espécies de *Trichogramma*, em todo o mundo (Pinto, 1998), mas apenas cerca de 18 espécies são atualmente criadas massalmente, em cerca de 16 países, sendo utilizadas

para liberações inundativas em 18 milhões de ha (Parra, 1997). Grande parte dos estudos realizados com esse parasitóide tem sido direcionados ao desenvolvimento de técnicas de monitoramento da qualidade, com o objetivo de detectar com precisão e rapidez a diminuição na qualidade desses insetos. Em vários países da Europa, já existem normas padronizadas para avaliação da qualidade de *Trichogramma*, e de outros inimigos naturais, que envolvem desde observações de parâmetros biológicos (parasitismo, longevidade, razão sexual, etc.) até aspectos comportamentais como preferência hospedeira e propensão ao vôo. A adequação e padronização dessas técnicas nos diferentes países que utilizam o controle biológico são fundamentais para o intercâmbio de informações e otimização das tecnologias de produção.

Entretanto, para que a qualidade dos inimigos naturais seja preservada, ao longo das gerações, em criações massais, é essencial que haja cuidados no estabelecimento da colônia, principalmente com relação ao tamanho da população fundadora e ao tipo de reprodução do inimigo natural criado, pois essas características irão definir o sucesso da criação.

Populações partenogenéticas telítocas tendem a apresentar menor variabilidade genética, se comparadas com populações sexuadas, o que as torna mais vulneráveis durante o processo de criação, exigindo, portanto, maior rigor no monitoramento da qualidade. Por outro lado, populações sexuadas (arrenótocas), se iniciadas com pequeno número de fundadores, podem apresentar problemas devido ao endocruzamento, ou seja, o aumento da taxa de homozigotos em função de cruzamentos consangüíneos. O endocruzamento normalmente é tido como prejudicial em criações de insetos; entretanto, alguns autores têm questionado a ocorrência desse efeito negativo em inimigos naturais (Crozier, 1977; Roush, 1989; 1990; Chapman & Stewart, 1996), e evidências contrárias têm sido reveladas para parasitóides (Legner, 1979; Biemont & Bouletreau, 1980; Rousse et al., 1988), incluindo *Trichogramma* (Sorati et al., 1996; Liu & Smith, 1997).

Apesar da importância desses estudos para programas de criação massal de *Trichogramma*, são raros os trabalhos que procuram elucidar, sob o ponto de vista genético, os efeitos da colonização em laboratório sobre esse parasitóide.

Desta forma, o objetivo do trabalho foi realizar o controle de qualidade de populações de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, com base em avaliações biológicas, genéticas e comportamentais (porcentagem de indivíduos aptos a voar), considerando-se aspectos relacionados, principalmente, ao tamanho da população fundadora e ao tipo de reprodução do parasitóide.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Controle de Qualidade em Criações de Inimigos Naturais

Os três principais elementos interrelacionados do controle de qualidade em criações massais são o controle da produção, do processo e do produto (Leppla & Ashley, 1989). O controle da produção é a garantia de que a criação do inseto e as operações associadas estão sendo executadas, sendo a performance dessas operações de criação controladas diretamente pelo monitoramento dos procedimentos, equipamentos e ambiente. O controle do processo é a regulação desses procedimentos de criação pelo monitoramento do produto inacabado, comparando-os com especificações estabelecidas e padronizadas. O controle do produto é a garantia de que os insetos adultos estão apropriados para o tratamento, manuseio e transferência para utilização. A distribuição e o acompanhamento da eficiência no controle das populações alvo, são as operações finais (Leppla & Fisher, 1989).

Segundo Lenteren (1991), o controle de qualidade em programas de criação massal de insetos entomófagos pode ser abordado de duas maneiras:

- Avalia-se a eficiência do inseto em exercer sua função e se os resultados não são satisfatórios, localiza-se a causa e melhora-se o método de criação; ou
- Listam-se quais as mudanças que podem ser esperadas quando uma criação massal é iniciada; avaliam-se essas mudanças e se as mesmas forem indesejáveis, melhora-se o método de criação.

De acordo com o autor, a desvantagem do primeiro método é que ocorrem mudanças que não podem ser corrigidas porque o material já está tão modificado que a causa e

seus efeitos não podem mais ser localizados. Por sua vez, o segundo método pode exigir a avaliação de um elevado número de componentes.

Os principais componentes de qualidade, segundo Bigler (1992), consistem de complexas propriedades fisiológicas e ecológicas que não são todas de mesma importância e dependem do uso e do programa de liberação. A importância relativa de cada atributo deve ser avaliada para cada programa particular de controle e quaisquer tipos de generalizações podem conduzir a erros de interpretação. O conhecimento completo das propriedades ecológicas, fisiológicas e biológicas de cada relação específica praga-inimigo natural, é necessário antes da avaliação dos principais componentes. Em geral, a maioria dos laboratórios de criação massal monitoram a qualidade dos insetos utilizando parâmetros biológicos, como fecundidade, viabilidade de ovos, peso de larvas e pupas, emergência, razão sexual, mortalidade, longevidade, habilidade de voo e competitividade de cópula (Clarke & McKensie, 1992).

A avaliação da qualidade, segundo Clarke & McKenzie (1992), tem duas principais funções: identificar problemas de produção e indicar problemas de deterioração da linhagem.

Frequentes discussões focalizam a manutenção da qualidade das populações criadas massalmente, idêntica àquela das populações coletadas no campo. Isto, de acordo com Lenteren (1992_a), não é somente uma ilusão, mas também um propósito desnecessário e caro. Segundo esse autor, o objetivo do controle de qualidade é determinar se um inimigo natural continua em condições de controlar apropriadamente uma praga. Neste sentido, não se deve idealizar uma qualidade máxima ou ótima, mas uma qualidade aceitável.

Noldus (1989) considera que a qualidade total abrange uma série de características relativas à espécie a ser controlada, à cultura, ao clima e a estratégia de liberação a ser aplicada. Para esse autor, em programas de controle biológico através de liberação inundativa e inoculativa estacional, as características desejáveis para um inimigo natural incluem: adaptabilidade a extremos climáticos e a vários habitats, eficiência de busca, especificidade hospedeira, discriminação do hospedeiro, utilização do hospedeiro (habilidade de matar o hospedeiro e/ou utilizá-lo para reprodução),

capacidade reprodutiva e ausência de efeitos colaterais negativos. Cada uma dessas características pode ser afetada pelo processo de criação massal, incluindo o armazenamento e outros aspectos da produção, os quais podem, conseqüentemente, conduzir a uma alteração na performance em campo.

Algumas das características mais importante que determinam a necessidade de controle de qualidade são: a estrutura genética da população, a dieta utilizada na criação, as condições físicas do laboratório de criação e o programa de liberação (Bigler, 1989).

2.2. Modificações Sofridas por Populações de Laboratório

Segundo Lenteren (1991) grande parte dos obstáculos encontrados em programas de produção massal poderiam ser evitados com a criação dos inimigos naturais sob condições tão naturais quanto possível. Na maioria dos programas comerciais de criação massal, a planta hospedeira utilizada é diferente daquela cultura na qual o controle biológico será aplicado e ocasionalmente as espécies de hospedeiro/presa são diferentes das espécies pragas a serem controladas (Lenteren & Woets, 1988). Outro fato relevante, segundo Lenteren & Woets (1988), é a utilização, normalmente, de apenas uma espécie de presa/hospedeiro na criação massal, e se esta apresenta deficiência em um ou mais nutrientes, pode levar a carências específicas ou qualidade sub-ótima do inimigo natural.

Entretanto, mesmo em criações sob condições próximas às naturais, alguns obstáculos que podem influenciar na qualidade dos inimigos naturais ainda persistem (Lenteren, 1991), a saber:

1. a mudança comportamental como resultado da criação em condições artificiais ou em hospedeiros ou meios artificiais. Os inimigos naturais podem mudar suas reações com relação às pistas do hospedeiro ou da planta hospedeira, como resultado de um condicionamento pré-imaginal ou imaginal;
2. a falta de técnicas que evitem uma pressão de seleção, conduzindo a uma deterioração genética dos organismos produzidos massalmente. Em função dessa deterioração, os inimigos naturais podem perder sua eficiência;

3. a infecção por patógenos, conduzindo a uma alta mortalidade, desenvolvimento prolongado, adultos diminutos, ampla flutuação na qualidade dos insetos e efeito patológico direto.

A criação do inimigo natural por muitas gerações sob condições uniformes e em hospedeiros inadequados, pode comprometer a tolerância às condições naturais extremas e ocasionar a perda da preferência pelo hospedeiro alvo (Smith, 1996). Cònsoli & Parra (1995) observaram que condições térmicas flutuantes foram mais adequadas para o parasitismo de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988, do que condições de temperatura constante, mesmo quando incluíram temperaturas abaixo da mínima ótima (20 °C). No entanto, embora as criações sob condições flutuantes de temperatura sejam recomendadas, essas são difíceis de implementar em condições de criação comercial. A perda da preferência pelo hospedeiro alvo, é uma área controvertida pois esse efeito tem sido demonstrado para algumas espécies mas não para outras (ex. *Trichogramma*) (Smith, 1996).

Bartlett (1985) fez referência a 18 fatores que podem afetar a qualidade do inseto trazido do campo para o laboratório. Da mesma forma, Lenteren (1991), com base em diferentes autores, listou alguns desses principais fatores:

1. Populações de laboratório são mantidas em condições ambientais constantes com fatores abióticos estáveis (luz, temperatura, vento, umidade) e fatores bióticos constantes (alimento, ausência de predação e parasitismo), não existindo seleção para superar situações inesperadas de estresses. O resultado é uma mudança no critério que determina a adaptabilidade, e uma modificação de todo o sistema genético.
2. Não existe competição interespecífica em populações de laboratório resultando numa possível modificação na variabilidade genética.
3. As condições de laboratório são adequadas para uma média ou, às vezes, para os genótipos mais fracos. Não é possível escolha de ambiente, já que todos os indivíduos são confinados numa mesma condição. O resultado é um possível decréscimo na variabilidade genética.
4. O comportamento dependente da densidade (ex.: eficiência de busca) pode ser afetado em situações de laboratório.

5. O processo de seleção para cópula pode ser modificado porque fêmeas não copuladas ou previamente copuladas terão meios restritos de escape.
6. Características de dispersão, especificamente comportamento de vôo dos adultos e dispersão larval, podem ser bastante restringidos em condições de laboratório.

2.3. Aspectos Genéticos Envolvendo Criações de Laboratório

Um dos maiores obstáculos do controle de qualidade é a detecção da perda da variabilidade genética em insetos criados massalmente.

Com base no efeito fenotípico, a variabilidade genética pode ser classificada em duas categorias: externa e interna. A variabilidade externa inclui mutações morfológicas, tanto dominantes quanto recessivas, e um agrupamento de variantes comportamentais, fisiológicas e ecológicas. A variabilidade interna compreende diferenças genéticas em nível celular e molecular, exigindo normalmente métodos especiais de análise (Bartlett, 1984_b).

Existem duas classes de processos que podem resultar em deterioração genética: os processos aleatórios e os não-aleatórios ou adaptativos. Desses, a deriva genética (ou efeito fundador), o cruzamento consanguíneo e a seleção, parecem ser os mecanismos de deterioração mais relevantes para colônias criadas em laboratório (Mackauer, 1972). Segundo Wajnberg (1991), esses diferentes mecanismos não podem ser evitados; no máximo eles podem ser reduzidos.

O processo de seleção atua continuamente durante o estabelecimento e manutenção de uma colônia. Nos primeiros estágios do estabelecimento, a seleção direcional filtra os insetos que não conseguem se ajustar às grandes mudanças. Essa ação contribui para a deterioração genética e explica a alta mortalidade dos materiais recém introduzidos. Também pode ser responsável, em parte, por algumas das reduções de tamanho que ocorrem, de tempos em tempos, em colônias criadas massalmente, sem explicação aparente (Bartlett, 1984_b).

Vários autores têm sugerido medidas para minimizar problemas de deterioração genética, mas, segundo Bartlett (1984_a), as causas dessa deterioração não são tão facilmente identificadas; exigem estudos genéticos detalhados e são difíceis de medir. Esse autor acredita que um elemento não levado em conta nessa problemática é que as mudanças genéticas que ocorrem, quando uma colônia de insetos é iniciada, são mudanças naturais que ocorrem quando qualquer organismo vai de um lugar para outro. Esse processo tem sido muito estudado sob a denominação de “eventos evolucionários” e envolve conceitos como colonização, seleção, deriva genética, número efetivo da população, migração e teoria da domesticação.

A deriva genética é o mais importante dos processos aleatórios que influenciam na frequência gênica de uma colônia de laboratório. Mesmo taxas de mutações de 10^{-5} - 10^{-6} , não modificam o conteúdo genético de uma população o suficiente para evitar os efeitos da deriva genética (Joslyn, 1984). Em populações grandes, a redução da variabilidade devido à deriva é menor do que em populações pequenas (Wajnberg, 1991). O tamanho numérico e a origem geográfica do grupo inicial estão correlacionados com a reserva genética e conseqüentemente com a reserva de habilidades para responder a eventos aleatórios e à seleção. Desta forma, o potencial evolutivo da população de laboratório é essencialmente determinado quando a criação estoque é isolada no campo (Mackauer, 1976). Parte da população selvagem (onde a migração gênica pode ocorrer e a diversidade ambiental é grande) é levada para dentro do laboratório, torna-se uma população “fechada” e todas as mudanças genéticas passam a ser feitas a partir da limitada variabilidade genética da população fundadora (efeito fundador) (Bartlett, 1984_b). O efeito fundador é um exemplo extremo de deriva genética (Wright, 1977). Por causa desse efeito, que é uma forma de erro de amostragem, somente parte da porção genética selvagem é realmente incorporada no material do laboratório (Joslyn, 1984). O tamanho da população fundadora afetará diretamente a “quantidade” de variação que irá ocorrer daquela limitada fração genética nativa (Bartlett 1985).

O tamanho da colônia inicial varia entre menos de dez a vários milhões de indivíduos, dependendo da facilidade da coleta, do tamanho do organismo e da

disponibilidade física para armazenamento e recepção do material. Não existe uma solução simples ou generalizada sobre qual seria o tamanho ótimo da amostra inicial, mas de acordo com Mackauer (1976), uma colônia com aproximadamente 500 indivíduos, coletados no campo em uma área convenientemente grande, deve incluir um nível de diversidade genética que caracterize a população parental de maneira adequada para a maioria dos programas de controle biológico. Já Bartlett (1985) menciona um número mínimo de mil indivíduos. Entretanto, em discussões envolvendo a deriva genética e o endocruzamento, torna-se mais adequada a adoção do conceito de “tamanho efetivo da população”, representado na literatura genética como “ N_e ” (Roush, 1990). O tamanho efetivo da população representa, do ponto de vista da amostragem estatística, o “número genético” de indivíduos numa população idealizada, onde a reprodução ocorre ao acaso e igual número de descendentes, por indivíduo, é produzido (Crow & Kimura, 1970). O N_e é afetado pela razão sexual da população e pela variação no tamanho da prole (Roush, 1989). Se um indivíduo produz maior número de descendentes do que outros, ocorre uma desproporcionalidade na geração seguinte levando a uma redução da diversidade genética da população (Roush, 1990). Segundo Falconer (1960), para uma população diplóide, o N_e pode ser calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$N_e = 4 N_m N_f / (N_m + N_f)$$

Em que:

N_m = número de machos;

N_f = número de fêmeas.

Para populações haplo-diplóides, como vespas parasíticas de reprodução arrenótoca, Lí (1955) propõe a seguinte fórmula:

$$N_e = 9 N_m N_f / (4 N_m + 2 N_f).$$

O N_e é normalmente menor do que o número real de indivíduos com potencial para reprodução na população (N). Como regra geral, N_e é 48-95% de N (Crow & Kimura, 1970), em condições naturais.

A estrutura genotípica da população também pode ser afetada pelo seu sistema de acasalamento. A ocorrência de acasalamentos entre parentes ou cruzamentos consanguíneos implica na produção de progênie mais homozigótica, em relação ao que se esperaria com acasalamentos ao acaso (“panmixia”), e esses indivíduos homozigóticos geralmente exibem características inadequadas (Bartlett, 1984_b). O endocruzamento pode ser medido através de um coeficiente, representado por “ F ”, o qual quantifica a perda de heterozigotos (Roush, 1990). O coeficiente de endocruzamento está diretamente relacionado com o tamanho da população (Bartlett, 1984_b), sendo qualquer alteração em F , numa dada geração, calculada por: $F = 1 / (2 N_e)$ (Falconer, 1960). Wright (1922), citado por Falconer (1960) propôs uma fórmula de recorrência para o monitoramento do endocruzamento ao longo das gerações, na qual:

$$F_t = 1/(2 N_e) + [1 - 1/(2 N_e)] F_{t-1}$$

sendo:

F_t = coeficiente de endocruzamento na geração t ;

N_e = número efetivo de indivíduos; e

F_{t-1} = coeficiente de endocruzamento na geração $t-1$.

De acordo com Joslyn (1984), para manter uma heterogeneidade satisfatória, uma colônia não deve declinar abaixo do número de insetos fundadores. Segundo esse autor, a manutenção de uma alto N_e reduz o efeito da deriva aleatória e dos cruzamentos consanguíneos e ajuda a compensar a deterioração genética.

Alguns predadores e a maioria dos parasitóides utilizados em criações massais, com propósito de controle biológico, demonstram uma baixa depressão devida ao endocruzamento, quando comparados à maior parte dos outros animais (Roush, 1990). Vários desses agentes de biocontrole, especialmente os parasitóides, parecem apresentar

uma rotina de cruzamentos consanguíneos na natureza, ou devido à baixa densidade populacional ou pelo seu comportamento normal de acasalamento (Roush, 1989). De acordo com Crozier (1977), esse endocruzamento periódico pode levar à exposição e eliminação seletiva de alelos recessivos letais e semi-letais, particularmente em himenópteros de reprodução arrenótoca (haplo-diplóides), onde todas as características (exceto aquelas expressas somente nas fêmeas) são expostas a cada geração nos machos haplóides. Chapman & Stewart (1996) constataram um coeficiente de endocruzamento de 0,757 em uma população natural de *Ancistrocerus antilope* (Panzer) (Hym.: Vespidae), o que corresponde a um sistema de acasalamento com 91,3% dos cruzamentos ocorrendo entre irmãos. Legner (1979) acasalou fêmeas virgens com seus filhos (produzindo um coeficiente de endocruzamento de 50%) em duas espécies do parasitóide *Muscidifurax* (Hym.: Pteromalidae) e em seguida avaliou a taxa intrínseca de crescimento (*rm*) dessas linhagens em comparação com linhagens em que não ocorreu o cruzamento consanguíneo. O autor encontrou reduções no *rm* de menos de 4%. Resultados similares têm sido demonstrados para outros Hymenoptera Parasitica como *Cothonaspis bouldardi* (Eucoilidae) (Biemont & Bouletreau, 1980) e *Dinarmus vagabundus*, Timberlake (Pteromalidae) (Rousse et al., 1988). Sorati et al. (1996) estudaram os efeitos do endocruzamento sobre *Trichogramma* sp. (espécie relacionada *brassicae*), com base em medidas de fecundidade, tamanho do corpo, largura da cabeça e comprimento da tibia posterior, e concluíram que essa espécie não está sujeita a depressão por consanguinidade. Da mesma forma, Liu & Smith (1997) avaliaram as conseqüências genéticas da criação massal de *Trichogramma minutum*, Riley, por seis gerações sucessivas de cruzamentos consanguíneos e observaram que o endocruzamento propiciou um aumento na variabilidade genética de alguns atributos biológicos além de melhorar os componentes de adaptação às condições ambientais.

2.4. Controle de Qualidade em Criações de *Trichogramma*

A produção de *Trichogramma* com alta qualidade depende do uso apropriado de instalações adequadas, equipamentos e de uma meticulosa performance das operações de criação (Bigler, 1994). Uma representação esquemática da possível divisão da qualidade total de *Trichogramma* em componentes principais de qualidade foi feita por Bigler (1994) (Figura 1), que relatou que tal divisão é necessária para selecionar aqueles componentes considerados mais importantes para a performance no campo ou aqueles que reconhecidamente são mais susceptíveis a alterações.

A divisão do controle de qualidade em três subdivisões primárias (controle da produção, do processo e do produto), proposta por Leppla & Fisher (1989), também foi adotada por Laing & Bigler (1991) e utilizada para a implementação do controle de qualidade em programas de criação massal de *Trichogramma* (Figura 2). De acordo com esses autores, o uso inicial do controle de qualidade deve ocorrer durante a seleção da população fundadora. Nesse estágio, o processo deve ser rigorosamente delineado, podendo-se aplicar vários testes de qualidade. Numa seqüência aproximada de dificuldade, os testes indicados para a seleção da população fundadora são: determinação da porcentagem de emergência, razão sexual, fecundidade, longevidade, duração da emergência, taxa de desenvolvimento, locomoção, aceitação do hospedeiro (natural e alternativo), adequação ao hospedeiro (natural e alternativo), tolerância à temperatura (limites térmicos), resposta funcional, capacidade de quiescência e diapausa e performance em semi-campo e campo.

Figura 1. Importância relativa dos componentes de qualidade em relação ao objetivo da produção e uso de *Trichogramma* (Bigler, 1994).

(●, ●, ● = na sequência de menor para maior importância).

Figura 2. Controle de qualidade para produção e uso de *Trichogramma* criado massalmente (Laing & Bigler, 1991).

A seleção de uma espécie de *Trichogramma* para uso em liberação inundativa contra uma praga em particular, deve ser baseada em experimentos de laboratório, semi-campo e campo, utilizando-se várias espécies e linhagens potenciais (Hassan, 1993). A preferência hospedeira, comportamento de busca e tolerância às condições ambientais são os mais importantes critérios de seleção (Hassan, 1989). O comportamento de busca

deve ser testado na presença da planta hospedeira, em experimentos de campo e semi-campo, enquanto que a preferência hospedeira e a adequação ao hospedeiro podem ser testados, com sucesso, em laboratório, oferecendo-se às fêmeas a chance de escolha entre ovos do hospedeiro alvo e de um hospedeiro alternativo padrão (Hassan, 1993). Esse método também pode ser utilizado como indicador de qualidade durante o processo de produção massal de *Trichogramma*, pois permite monitorar mudanças na preferência hospedeira (Hassan & Guo, 1991).

Após o término do processo de seleção, uma ou mais linhagens/espécies de *Trichogramma* passam a ser utilizadas no programa de criação massal. Durante o processo de criação, o monitoramento da qualidade pode ser menos intensivo e mais focalizado em atributos que possibilitem avaliações rápidas (Smith, 1996). Os testes indicados para uso durante a fase de produção massal são: determinação da porcentagem de emergência, razão sexual, fecundidade, longevidade, locomoção, aceitação do hospedeiro (natural) e identificação das espécies/linhagens (Bigler, 1994).

3. EFEITO DO TAMANHO DA POPULAÇÃO FUNDADORA SOBRE A QUALIDADE DE POPULAÇÕES SEXUADAS DE *Trichogramma pretiosum*, RILEY, 1879, EM LABORATÓRIO

RESUMO

O objetivo da pesquisa foi monitorar a qualidade de três populações sexuadas de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, em criações iniciadas com diferentes números de parasitóides (fundadores), a fim de definir, com base biológica e genética, o número ótimo para se iniciar uma criação massal desta espécie. Os parasitóides foram obtidos em coletas de campo, sobre ovos de *Helicoverpa zea* (Bod., 1850), em milho, e mantidos em laboratório em ovos do hospedeiro alternativo, *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879). Foram selecionados machos e fêmeas virgens, oriundos de locais diferentes, utilizando-os em cruzamentos controlados para iniciar as populações de laboratório. Iniciaram-se criações com um, cinco e dez casais fundadores, sendo cada uma delas constituída de cinco repetições. As populações foram mantidas em sistema de cruzamentos consangüíneos durante 25 gerações, monitorando-se, a cada geração, o número efetivo de indivíduos e o coeficiente de endocruzamento. As populações foram submetidas a avaliações de qualidade, com base também em variáveis biológicas, monitorando-se o número de ovos parasitados, porcentagem de emergência, razão sexual, longevidade e deformação de adultos. Concluiu-se que é possível iniciarem-se criações de *T. pretiosum* com apenas um casal, sem que alterações significativas sejam observadas nas suas características biológicas, possibilitando a manutenção da colônia, por, pelo menos, 25 gerações, sem comprometer sua qualidade. O endocruzamento não foi limitante para

criações massais de *T. pretiosum*; entretanto, é recomendável, como medida preventiva, que o tamanho efetivo da população fundadora seja igual ou superior a 15 indivíduos.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico, controle de qualidade, consanguinidade, endocruzamento, criação massal, Trichogrammatidae.

EFFECT OF THE SIZE OF THE FOUNDER POPULATION ON THE QUALITY OF SEXUAL POPULATIONS OF *Trichogramma pretiosum*, IN LABORATORY

SUMMARY

The goal of this research was to monitor the quality of three sexual populations of *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, in starting rearings with different numbers of parasitoids (founders), in order to define, with biological and genetic basis, the excellent number to start a mass rearing of this species. The parasitoids were acquired in field collects, on eggs of *Helicoverpa zea* (Bod., 1850), in corn, and kept in laboratory in eggs of the factitious host *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879). Virgin males and females, collected in different places, were selected and used in controlled crossings to start the laboratory populations. Rearing units using one, five and ten founder couples were started, being each one of them constituted of five replications. The populations were kept in a system of consanguineous crossings during 25 generations, monitoring, to each generation, the effective number of individuals and the coefficient of inbreeding. The populations were submitted to quality evaluations, also based on biological variables, monitoring the number of parasitized eggs, emergence rate, sex ratio, longevity and deformation of adults. It was concluded that is possible to start *T. pretiosum* rearings, by using only one couple, without observing significant alterations in its biological features, making possible the maintenance of the colony, for, at least, 25 generations, without affecting its quality. The inbreeding is not a limiting factor for mass rearing of *T.*

pretiosum; however, it is advisable, as a preventing measure, that the effective size of the founder population be the same or superior to 15 individuals.

KEY WORDS: Biological control, quality control, consanguinity, inbreeding, mass rearing, Trichogrammatidae.

3.1. INTRODUÇÃO

A criação massal de inimigos naturais em laboratório pode ter um efeito significativo sobre a estrutura genética de uma população, a qual poderá afetar o sucesso da criação e a eficácia de programas de controle biológico em condições de campo (Bigler, 1994). Dentre os mecanismos de degeneração mais relevantes para colônias de insetos em laboratório, estão a deriva genética, os cruzamentos consanguíneos e a seleção (Mackauer, 1972).

A deriva genética é o mais importante dos processos aleatórios que influenciam a frequência gênica de uma colônia de laboratório (Joslyn, 1984). Em grandes populações, a redução da variabilidade devido à deriva genética é menor do que em populações menores, e, desta forma, Wajnberg (1991) atenta para o fato de que cada geração de laboratório não deve ser iniciada com um pequeno número de indivíduos. Não existe, entretanto, uma solução simples ou generalizada sobre qual seria o tamanho ótimo da amostra inicial, podendo esta variar de menos de dez a vários milhões de indivíduos, em função de fatores como: facilidade da coleta, tamanho do organismo e disponibilidade física para armazenamento e recepção do material (Mackauer, 1976; Bartlett, 1985). Esse tamanho inicial irá definir o potencial evolutivo da criação de laboratório, já que a amostra coletada no campo torna-se uma população “fechada” e todas as mudanças genéticas passam a ocorrer a partir da limitada variabilidade genética dessa população fundadora (Bartlett, 1984b). Nesse sentido, o tamanho da população fundadora deve ser entendido como “tamanho efetivo” (N_e) (Roush, 1990), que do ponto de vista da

amostragem, representa o “número genético” de indivíduos numa população idealizada, na qual a reprodução ocorre ao acaso e igual número de descendentes, por indivíduo, é produzido (Crow & Kimura, 1970). O parâmetro N_e é afetado pelo número de genitores, (a cada geração) pelo grau de parentesco entre eles, pela razão sexual e pela variação no tamanho da prole (Roush, 1989), sendo normalmente menor do que o número real de indivíduos com potencial para reprodução na população (N) (Crow & Kimura, 1970).

A estrutura genotípica da população de laboratório também pode ser afetada pela ocorrência de cruzamentos consanguíneos, o que implica na produção de progênie mais homozigótica do que se esperaria com acasalamentos ao acaso (“panmixia”). O coeficiente de endocruzamento está diretamente relacionado ao tamanho da população (Bartlett, 1984_b), sendo que, segundo Joslyn (1984), para manter uma heterogeneidade satisfatória, uma colônia não deve ser menor que a população inicial (número de insetos fundadores). Indivíduos homozigóticos geralmente exibem características prejudiciais (Bartlett, 1984_b); entretanto, alguns predadores e a maioria dos parasitóides utilizados em criações massais, para controle biológico, demonstram uma alta resistência ao endocruzamento, quando comparados à maior parte dos outros animais (Roush, 1990; Chapman & Stewart, 1996; Legner, 1979; Biemont & Bouletreau, 1980; Rousse et al., 1988). Vários desses agentes de biocontrole, especialmente os parasitóides, parecem apresentar uma rotina de cruzamentos consanguíneos na natureza, ou devido à baixa densidade populacional ou pelo seu comportamento normal de acasalamento (Roush, 1989). Sorati et al. (1996) estudaram os efeitos do endocruzamento sobre *Trichogramma* sp. (espécie relacionada a *brassicae*), com base em medidas de fecundidade, tamanho do corpo, largura da cabeça e comprimento da tibia posterior, e concluíram que essa espécie não sofre alterações devido à consanguinidade. Da mesma forma, Liu & Smith (1997) avaliaram as conseqüências genéticas da criação massal de *Trichogramma minutum*, Riley, por seis gerações sucessivas de cruzamentos consanguíneos e observaram que o endocruzamento propiciou um aumento na variação genética de alguns atributos biológicos além de melhorar os componentes de adaptação às condições ambientais.

O objetivo desse trabalho foi avaliar, ao longo das gerações, a qualidade de três populações sexuadas de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, em criações iniciadas

com diferentes números efetivos de indivíduos (fundadores), a fim de caracterizar os efeitos do endocruzamento sobre esse parasitóide, e definir, com base biológica e genética, o número ótimo para se iniciar uma criação massal desta espécie.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Criação de Insetos da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas – MG, sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($60 \pm 10\%$) e fotoperíodo (14 L: 10 E).

3.2.1. Origem e manutenção dos parasitóides

As linhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 foram obtidas em coletas de campo sobre ovos de *Helicoverpa zea* (Bod., 1850) (Lep.: Noctuidae), em milho. As coletas foram realizadas nas áreas experimentais da Embrapa Milho e Sorgo, e em plantios comerciais do município de Sete Lagoas (Latitude $19^{\circ} 28' \text{ S}$ e longitude $44^{\circ} 15' \text{ O}$), sendo escolhidas áreas distantes entre si (proximidade mínima de quatro Km), como tentativa de evitar a obtenção de indivíduos aparentados. As pontas das espigas contendo estilo-estigmas eram coletadas e levadas ao laboratório, onde fazia-se a triagem dos ovos de *H. zea*, acondicionando-os em microplacas para teste serológico Elisa ($12,5 \times 8,0 \text{ cm}$), contendo 96 células de $7,0 \text{ mm}$ de diâmetro e $10,0 \text{ mm}$ de altura, de base cônica, tampados com filme plástico de PVC (Magipack®). Os ovos que se tornaram escuros (característica do parasitismo por *Trichogramma*) foram individualizados em cápsulas gelatinosas transparentes (tipo usado para fármacos) até a emergência dos adultos. Os parasitóides emergidos foram separados, com base nas antenas (Bowen & Stern, 1966), selecionando-se machos e fêmeas virgens (oriundos de locais diferentes), e utilizando-os em cruzamentos “controlados” para iniciar as populações de laboratório.

As criações foram mantidas em laboratório em tubos de vidro ($9,0 \times 2,5 \text{ cm}$), tampados com filme plástico PVC (Magipack®), utilizando-se como hospedeiro

alternativo, ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lep.: Pyralidae). Esse hospedeiro foi obtido da criação existente no Laboratório de Criação de Insetos do CNPMS-EMBRAPA, mantida em dieta à base de farinha de trigo integral (48,5 %), farinha de milho (48,5 %), e levedura de cerveja (3%). Foram utilizados ovos com idade máxima de 24 h, submetidos a um processo de inviabilização através da exposição dos mesmos à radiação ultra-violeta, por um período de 30 minutos e a uma distância de 15 cm da fonte de luz (Stein & Parra, 1987). Estes eram colados, por meio de uma solução de goma arábica (50%), em pedaços de cartolina azul (7,0 x 0,8 cm), e oferecidos aos parasitóides adultos, acrescentando-se na parede interna do tubo de criação, algumas gotas de mel puro, como alimento para os mesmos (Parra, 1997).

3.2.2. Início das colônias e monitoramento da qualidade

Visando relacionar o número de casais fundadores, com a qualidade das populações de laboratório, ao longo das gerações, foram iniciadas criações com um, cinco e dez casais fundadores, sendo cada uma delas constituída de cinco repetições, ou seja, cinco populações iniciadas com um casal, cinco com cinco casais e cinco com dez casais. Em função do grande número de avaliações realizadas para cada população, não foi possível trabalhar com um número maior de repetições. As populações foram mantidas em sistema de cruzamentos consanguíneos durante 25 gerações, o que equivale a aproximadamente oito meses de criação em laboratório. Foi permitido às populações aumentarem em número até alcançarem um tamanho efetivo superior a 1000 indivíduos, e a partir de então, foram evitados “estrangulamentos” ("bottle neck") nos tamanhos efetivos das populações, mantendo-os sempre superiores a esse número, ou quando inferiores, nunca menor do que 700 indivíduos. Esse controle do tamanho efetivo da população era realizado por estimativa, em função do número de ovos parasitados existentes nas cartelas de manutenção das populações (segundo metodologia de Lopes, 1988). O número efetivo, a cada geração, foi calculado com base na fórmula proposta por Li (1955), para populações haplodiplóides:

$$N_e = 9 N_m N_f / (4 N_m + 2 N_f)$$

em que:

N_e = número efetivo de indivíduos;

N_m = número de machos;

N_f = número de fêmeas.

O número de machos e fêmeas foi estimado, a cada geração, por meio de amostragens. O coeficiente de endocruzamento foi monitorado, utilizando-se a fórmula de recorrência proposta por Wright (1922), citada por Falconer (1960):

$$F_t = 1/(2 N_e) + [1 - 1/(2 N_e)] F_{t-1}$$

em que:

F_t = coeficiente de endocruzamento na geração t;

N_e = número efetivo de indivíduos;

F_{t-1} = coeficiente de endocruzamento na geração t-1.

Durante o período do experimento, a qualidade das populações foi avaliada sete vezes, com base em variáveis biológicas, monitorando-se as seguintes características: número de ovos parasitados: cartelas contendo, em média, 200 ovos, eram oferecidas a 20 fêmeas de, no máximo, 10 horas de idade, individualizadas em tubos de vidro (7,5 x 1,0 cm) e alimentadas com uma gota de mel puro. Estas permaneciam parasitando por 48 h (Figura 3A), período em que ocorre a maior taxa de parasitismo (Cônsoi & Parra, 1996) e, em seguida, as cartelas eram retiradas e acondicionadas em novos tubos. Eram considerados parasitados os ovos que se tornavam escuros (Figura 3B), procedendo-se à contagem do parasitismo no sexto dia após o início do experimento.

porcentagem de emergência: essa variável biológica foi estimada com base no número de ovos que apresentavam orifício de emergência em relação ao número total de ovos parasitados.

Figura 3. A - Fêmea de *Trichogramma pretiosum* parasitando ovos de *Anagasta kuehniella*; B - Ovos de *A. kuehniella* parasitados (pretos). (Fotos por Heraldo Negri de Oliveira).

razão sexual: os adultos, após 72 h da emergência, eram mortos por congelamento e separados por sexo com base nas antenas. A razão sexual foi determinada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{r.s.} = \text{fêmea} / (\text{macho} + \text{fêmea})$$

longevidade de fêmeas: as fêmeas, após terem sido utilizadas no teste de parasitismo, continuaram sendo alimentadas com mel e monitoradas, diariamente, até a +ta morte.

deformações: paralelamente ao processo de separação dos sexos, os adultos eram examinados no sentido de se detectarem deformações morfológicas. As observações foram dirigidas principalmente para as asas, pois é o local onde normalmente ocorrem deformações em *Trichogramma*, quando mantido em condições inadequadas (Cônoli & Parra, 1997).

3.2.3. Análise estatística dos dados

As médias e a análise de variância foram calculadas utilizando-se o programa SAS. A homogeneidade de variâncias foi testada pelo método de Brown e Forsythe e o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados. Em função de não se ajustarem a uma distribuição normal ($Pr < W = 0,0392$), os dados da variável

“porcentagem de emergência” foram transformados em $\text{ARCSEN } \sqrt{x}$. Os valores da variável “porcentagem de deformação” também não seguiram uma distribuição normal ($\text{Pr} < W = 0,0001$); entretanto, nenhum tipo de transformação possibilitou a normalização dos mesmos. Os níveis de significância (probabilidades) obtidos na análise de variância, para esta variável, são aproximados, e, portanto, não foi possível realizar a comparação de médias. Para as demais variáveis, a comparação das médias, ao longo das gerações, foi realizada utilizando-se o teste de Tukey ($\text{Pr} \geq 0,05$). Os valores médios do número de ovos parasitados (variável y), para cada tamanho de população estudado, foram submetidos, juntamente com o coeficiente de endocruzamento (variável x), a uma análise de regressão seguindo o método de GOMES (1981).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante 25 gerações de laboratório, apenas os valores do número de ovos parasitados diferiram estatisticamente ($\text{Pr} > F = 0,045$), em função das diferenças nos tamanhos das populações fundadoras de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Tabela 1). Observou-se uma correlação negativa entre a taxa de parasitismo e o valor do coeficiente de endocruzamento (F). O número médio de ovos parasitados diminuiu de 38,7, nas populações iniciadas com dez casais ($F = 0,033$), para 33,3 nas populações iniciadas com apenas um casal ($F = 0,333$), o que representa uma queda de 14% na taxa de parasitismo (Figura 4). Para as demais variáveis biológicas, não houve diferenças significativas entre os valores médios obtidos nos três tamanhos de população estudados ao longo das 25 gerações (Tabela 1).

O valor de F no início da colonização das populações estudadas foi de 0,3333; 0,0667 e 0,0333 para os tamanhos efetivos de 1,5; 7,5 e 15, respectivamente (Tabela 2). Após o estabelecimento da colônia em laboratório, o aumento desses valores foi mínimo, ao longo das gerações, principalmente em função do aumento significativo no valor do N_e . O N_e médio (média harmônica), durante as 25 gerações monitoradas, foi de aproximadamente 36,2; 162,1 e 300,5; para as populações iniciadas com 1, 5 e 10 casais,

respectivamente (Tabela 2). Isto significa, considerando como exemplo populações iniciadas com 1 casal, que a manutenção de um número médio de 1768 indivíduos, ao longo de 25 gerações de laboratório, resulta no mesmo coeficiente de endocruzamento ($F = 0,3519$) que se observaria com a manutenção de um número efetivo de 36,2 indivíduos, o que correspondente, no caso de *Trichogramma*, a aproximadamente 19 machos e 28 fêmeas.

A interação significativa do tamanho inicial das populações e das gerações monitoradas (Tabela 1), revelou que, no decorrer da criação de laboratório, as alterações devidas ao avanço das gerações não foram as mesmas nas três populações. Entretanto, pôde-se observar que essa diferença entre as gerações, não segue um padrão regular, ou seja, não existe uma correlação entre o aumento no número de gerações de laboratório, com um aumento ou diminuição nos valores das variáveis biológicas estudadas (Tabela 3). Os valores oscilaram ao longo das gerações, não havendo correspondência entre as variáveis dentro de cada população e mesmo entre populações, ou seja, a geração onde se observaram, por exemplo, os maiores valores de parasitismo, nem sempre corresponderam àquela em que ocorreram os maiores valores de longevidade, numa mesma população. Da mesma forma, a geração onde foram observadas as maiores taxas de parasitismo e longevidade, para a população iniciada com um casal, não correspondeu àquela observada para as populações iniciadas com cinco e dez casais. Esta oscilação nos valores das variáveis biológicas é freqüente em criações de laboratório, e demonstra a importância do monitoramento constante, para se detectarem reduções significativas que possam vir a comprometer a qualidade da colônia.

A qualidade das populações estudadas, com base no parasitismo, emergência, razão sexual e longevidade, manteve-se em índices bastante satisfatórios, no decorrer das 25 gerações (Tabela 3). Mesmo na população iniciada com apenas um casal, que conforme descrito anteriormente, resulta num alto coeficiente de endocruzamento ($F = 0,35$), o número de ovos parasitados (em 48 h) manteve-se sempre superior a 30 (média = 33,31), a emergência superior a 96% (média = 97,06), a razão sexual ficou acima de 0,60 (média = 0,70) e a longevidade superior a 9,7 dias (média = 10,9). Esses valores indicam uma população com qualidade ótima se comparados aos maiores índices

recomendados como padrão de qualidade pela IOBC, para *Trichogramma brassicae* Bezd., *T. cacoeciae* Marchal e *T. dendrolimi* Matsumura (teste com o hospedeiro alternativo *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879): parasitismo $\geq$ a 25 ovos em 48 h; emergência $\geq$ a 80%; razão sexual $\geq$ 0,5; longevidade $\geq$ a sete dias) (Lenteren, 1994); e demonstraram que apesar de o índice médio de parasitismo ter sido inferior em relação às demais populações, do ponto de vista prático a qualidade da colônia não foi comprometida.

Tabela 1. Análise da variância dos dados do monitoramento da qualidade de três populações sexuadas de *Trichogramma pretiosum* (iniciadas com 1; 5 e 10 casais fundadores), durante 25 gerações de laboratório. Temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h.

F V	GL	NOV		EMG ^(a)		RSX		LNG		DEF ^(c)	
		QM	Pr > F	QM	Pr > F	QM	Pr > F	QM	Pr > F	QM	Pr > F
Tamanho	2	247,7	0,045	0,003	0,266	0,007	0,493	0,34	0,827	9,73	0,405
Resíduo (A)	12	60,8	0,0001	0,002	0,427	0,009	0,005	1,76	0,002	9,96	0,0002
Gerações	6	32,0	0,008	0,010	0,0006	0,009	0,028	4,49	0,0001	5,83	0,047
Tam. x Ger.	11	73,9	0,0001	0,013	0,0001	0,007	0,034	3,22	0,0001	6,05	0,016
Ger./Tam. 1	6	47,3	0,0005	0,004	0,127	0,008	0,035	2,67	0,001 ^(b)	5,67	0,053
Ger./Tam. 5	6	85,4	0,0001	0,012	0,0001	0,012	0,005	5,12	0,0001	10,85	0,001
Ger./Tam. 10	5	41,7	0,002	0,021	0,0001	0,002	0,759	3,01	0,0005	0,46	0,969
Resíduo (B)	68	10,1		0,002		0,003		0,59		2,57	
Médias Gerais		36,0		97,28		0,69		10,98		1,17	
CV (A)		21,6		3,4		13,8		12,1		-	
CV (B)		8,8		3,3		8,5		7,0		-	

NOV = N° de ovos parasitados; EMG = Emergência (%); RSX = Razão sexual; LNG = Longevidade (dias); DEF = Deformação (%).

^(a) Dados transformados em $\text{ARCSEN } \sqrt{X}$.

^(b) GL = 5.

^(c) Probabilidades aproximadas, devido aos dados não se ajustarem a uma distribuição normal.

Tabela 2. Monitoramento do número total (N), do número efetivo (N_e) e do coeficiente de endocruzamento (F) de três populações sexuadas de *Trichogramma pretiosum* (iniciadas com 1; 5 e 10 casais fundadores), durante 25 gerações de laboratório. Temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h.

Geração	População Fundadora								
	1 casal			5 casais			10 casais		
	N	N_e	F	N	N_e	F	N	N_e	F
P	2	1,5	0,3333	10	7,5	0,0667	20	15,0	0,0333
1	44	32,6	0,3450	110	84,8	0,0725	317	224,0	0,0357
2	293	214,1	0,3466	1186	891,5	0,0730	1533	1143,2	0,0361
3	1347	1022,2	0,3470	2204	1662,0	0,0733	1814	1282,3	0,0365
4	1989	1495,2	0,3472	2504	1805,9	0,0735	2074	1468,1	0,0369
5	2245	1690,5	0,3474	2559	1972,8	0,0738	2355	1786,2	0,0371
6	1922	1449,7	0,3476	2684	2025,2	0,0740	2115	1568,8	0,0375
7	2153	1630,9	0,3479	2496	1918,3	0,0743	1987	1506,8	0,0378
8	1999	1530,4	0,3481	2339	1794,6	0,0745	2221	1684,6	0,0381
9	2140	1636,0	0,3483	2575	1896,7	0,0748	2055	1558,5	0,0384
10	1957	1483,2	0,3485	2287	1752,2	0,0750	2091	1585,7	0,0387
11	1862	1418,4	0,3487	1933	1475,8	0,0754	2160	1638,2	0,0390
12	1894	1451,6	0,3490	1993	1505,7	0,0757	2206	1597,0	0,0393
13	2049	1549,9	0,3492	1806	1384,4	0,0761	2118	1605,8	0,0396
14	2003	1526,8	0,3494	1902	1457,5	0,0764	2079	1576,9	0,0399
15	1906	1442,9	0,3496	2196	1661,8	0,0767	2281	1729,8	0,0402
16	1959	1491,3	0,3499	2118	1631,0	0,0769	2245	1632,7	0,0405
17	1965	1512,0	0,3501	1857	1420,9	0,0773	2458	1863,8	0,0407
18	1925	1463,6	0,3503	2337	1792,4	0,0775	2043	1549,1	0,0410
19	1930	1463,8	0,3506	2287	1745,7	0,0778	2615	1982,9	0,0413
20	2005	1532,3	0,3508	2091	1596,4	0,0781	2469	1766,0	0,0416
21	2015	1525,0	0,3510	1883	1419,9	0,0784	2110	1600,2	0,0419
22	2529	1918,8	0,3512	2047	1569,1	0,0787	2243	1700,6	0,0421
23	2049	1566,4	0,3514	2048	1522,4	0,0790	2145	1626,5	0,0424
24	1741	1274,0	0,3517	1926	1461,9	0,0793	1629	1235,6	0,0428
25	2052	1499,8	0,3519	1944	1465,3	0,0797	1819	1327,2	0,0432
$\bar{X}$	1768	36,2*		1974	162,1*		1969	300,5*	

* Média Harmônica

Tabela 3. Valores médios de cinco variáveis biológicas, obtidos no monitoramento da qualidade de três populações sexuadas de *Trichogramma pretiosum* (iniciadas com 1; 5 e 10 casais fundadores), durante 25 gerações de laboratório. Temperatura $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h.

População Fundadora	Geração	Variáveis Monitoradas				
		Nº de ovos parasitados	Emergência (%)	Razão sexual	Longevidade (dias)	Deformação (%) ^(a)
1 casal	3	30,68 b	98,01 a	0,63 b	-	0,11
	6	30,11 b	96,05 a	0,70 ab	10,74 ab	2,52
	9	33,92 ab	96,16 a	0,69 ab	10,75 ab	3,39
	12	31,80 ab	96,43 a	0,72 ab	11,02 ab	1,83
	16	37,24 a	98,41 a	0,76 a	11,76 a	2,08
	21	37,69 a	97,35 a	0,72 ab	11,46 a	1,26
	25	31,75 ab	97,04 a	0,67 ab	09,66 b	1,07
Média		33,31	97,06	0,70	10,90	1,75
5 casais	3	36,49 b	96,55 bc	0,57 b	11,68 ab	0,42
	6	36,77 b	99,32 a	0,71 a	11,02 bc	0,30
	9	38,51 ab	96,84 bc	0,70 a	09,57 c	0,49
	12	43,24 a	98,50 ab	0,71 a	12,37 a	0,41
	16	29,76 c	95,57 c	0,65 ab	11,79 ab	4,38
	21	37,13 ab	97,74 abc	0,70 a	10,82 bc	1,21
	25	33,82 bc	97,05 bc	0,66 ab	09,94 c	0,54
Média		36,53	97,23	0,67	11,03	1,11
10 casais	3	39,43 abc	98,15 a	0,72 a	12,22 a	0,41
	6	34,30 c	97,74 a	0,67 a	11,43 ab	0,57
	9	-	-	-	-	-
	12	36,29 bc	98,89 a	0,70 a	10,44 b	0,20
	16	42,27 a	98,82 a	0,69 a	10,42 b	0,36
	21	39,35 abc	99,11 a	0,70 a	10,22 b	0,80
	25	40,37 ab	92,88 b	0,67 a	11,30 ab	1,02
Média		38,67	97,60	0,69	11,00	0,56

^(a) Médias não comparadas estatisticamente devido aos dados não se ajustarem a uma distribuição normal.

- Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$), considerando análises separadas para cada população.
- Os hífen representam dados perdidos, e não foram considerados no cálculo das médias.

Figura 4. Regressão entre o número médio de ovos parasitados e o coeficiente médio de endocruzamento (F), em três populações sexuadas de *Trichogramma pretiosum* (N_e de 1,5; 7,5 e 15 indivíduos fundadores), após 25 gerações de cruzamentos consanguíneos. Temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h.

Segundo Terzian & Biémont (1988), a depressão endogâmica é um fenômeno observado na maioria dos organismos vivos, sendo amplamente aceito que a mesma é resultado da expressão de alelos recessivos letais ou deletérios, provocada principalmente pelo “efeito fundador”, ou seja, pela homozigose em populações pequenas. Os resultados desse trabalho sugerem que *T. pretiosum* Riley, 1879, é pouco afetado pelo endocruzamento, coincidindo com as observações de Sorati et al. (1996) e Liu & Smith (1997) para *Trichogramma* sp. (espécie relacionada *brassicae*) e *Trichogramma minutum*, Riley, respectivamente. A principal hipótese para explicar esse fenômeno, segundo Roush (1989), é a de que o comportamento de acasalamento e a

baixa densidade populacional favoreceram ao longo dos anos de evolução, uma rotina de cruzamentos consanguíneos na natureza, e esse endocruzamento periódico, de acordo com Crozier (1977), pode ter levado à exposição e eliminação seletiva de alelos recessivos letais e semi-letais, principalmente por se tratar de himenópteros de reprodução arrenótoca (haplo-diplóides), onde todas as características (exceto aquelas expressas somente nas fêmeas) são expostas a cada geração nos machos haplóides. Dessa forma, as populações selvagens de *T. pretiosum* devem possuir uma reduzida carga genética, o que é muito favorável do ponto de vista do controle biológico aplicado, já que este envolve a criação desses inimigos naturais em grande escala. A dificuldade em se coletar grande número de indivíduos no campo, para iniciar uma criação, sempre encarada como uma preocupação devido ao problema da deriva genética (induzida pelo “efeito fundador”), não é um agravante para a espécie *T. pretiosum*. A deriva genética é uma preocupação nos programas de controle biológico clássico, já que durante os processos de coleta, transporte, quarentena e criação dos inimigos naturais, a população dos mesmos é reduzida, muitas vezes restringindo-se a poucos indivíduos, o que pode comprometer a qualidade da colônia e limitar o seu potencial genético (Unruh et al., 1983). No caso de *T. pretiosum*, ficou demonstrado nesse estudo que este problema não deve existir, já que populações iniciadas com apenas um casal apresentaram pouca variação nos resultados relativos aos aspectos biológicos monitorados, demonstrando excelente qualidade, mesmo após 25 gerações de laboratório. Evidentemente, o nível de variabilidade das colônias de laboratório irá depender da variabilidade das populações naturais; entretanto, tais resultados reforçam a hipótese de que a variabilidade genética destes parasitóides já é baixa, em condições naturais, o que representa menos problemas em criações de laboratório e possibilita maior facilidade de intercâmbio desta espécie entre laboratórios.

São encontradas na literatura recomendações para o tamanho ótimo de uma população fundadora, com números variáveis de 200 até 1000 indivíduos (Mackauer, 1976; Bartlett, 1985; Waage et al., 1985); entretanto, esse número é muitas vezes, baseado em estudos teóricos. Na prática, observou-se que, no caso de *T. pretiosum*, o tamanho da população inicial não é um problema muito relevante, principalmente se

esse tamanho elevar-se significativamente logo nas primeiras gerações. Sem dúvida, quanto maior for o número de indivíduos fundadores, maior será a possibilidade de se obterem colônias com melhor qualidade, devido à maior diversidade genética. Isso ficou demonstrado com a maior taxa de parasitismo observado nas populações iniciadas com dez casais em relação àquelas iniciadas com cinco e com um casal. Apesar de não chegar a comprometer a qualidade da colônia, uma redução de 14% é economicamente significativa em se tratando de criação massal com fins comerciais. Baseando-se nos resultados desse trabalho, recomenda-se, como medida preventiva, iniciar criações com um tamanho efetivo igual ou superior a 15 indivíduos, elevando esse número ao máximo e mantendo-o, dentro das possibilidades, durante todo o período de criação.

Segundo Hassan (1993) e Liu & Smith (2000), a principal preocupação num programa de criação massal de *T. pretiosum*, deve ser direcionada à seleção dos indivíduos fundadores. Nesse estudo ficou demonstrado que populações iniciadas com pequeno número de indivíduos ou mesmo com um casal, dificilmente apresentarão problemas limitantes de criação, devido ao endocruzamento. Portanto, a seleção torna-se fundamental, já que a linhagem selecionada irá formar a base do programa de criação e liberação (Smith, 1996) e geralmente observam-se diferenças em algumas características biológicas e comportamentais entre linhagens e mesmos entre indivíduos. Liu & Smith (2000) desenvolveram dois índices (índice de caráter e de adaptabilidade) que possibilitam, por meio de avaliações biológicas rotineiras (longevidade, emergência, fecundidade e razão sexual), selecionar linhagens com melhor potencial de adaptação às condições de campo.

Pequenas alterações (especialmente de condições bióticas) no processo de criação podem ocasionar quedas, às vezes drásticas, nos tamanhos das populações e elevar significativamente o coeficiente de endocruzamento. *T. pretiosum* demonstrou suportar uma alta taxa de endocruzamento ($F = 0,35$, para populações iniciadas com um casal), sem que reflexos degenerativos (que comprometam sua eficiência) tenham sido evidenciados em suas características biológicas; entretanto, “estrangulamentos” freqüentes no tamanho da população podem elevar o valor de F a um nível que pode vir a comprometer a qualidade da colônia. O nível máximo de endocruzamento suportado

por *T. pretiosum* não foi determinado nesse estudo, e, portanto, não é possível prever as consequências da elevação no valor de *F* sobre suas características biológicas, mas para efeito prático, e como medida preventiva, pode-se adotar um valor máximo em torno de 0,35, o que foi obtido, nas condições do presente trabalho, com quase um ano de criação, considerando-se populações iniciadas com apenas um casal.

A redução na heterozigose da população de laboratório pode ocasionar perdas de alelos que por sua vez podem provocar mudanças profundas e permanentes na constituição genética da colônia. O enriquecimento da variabilidade genética da colônia e conseqüentemente o restabelecimento dos alelos perdidos, só é possível, segundo Mason et al. (1987), por meio da introdução de indivíduos da população selvagem. Recomendações nesse sentido são baseadas em fundamentos teóricos, sendo raros os estudos que demonstram, na prática, os benefícios dessa atividade. No caso de *T. pretiosum*, foi constatado no presente trabalho, que a mistura de populações é uma prática dispensável, em função da possibilidade de se iniciarem novas colônias, mesmo com um pequeno número de fundadores e da facilidade de multiplicação desse parasitóide em laboratório. Apesar de o aumento na taxa de homozigose não ter apresentado consequências aparentemente significativas na qualidade das colônias estudadas, populações recém-colonizadas apresentam-se geneticamente mais próximas das populações selvagens, em relação às populações obtidas da mistura entre parasitóides nativos e de laboratório. Essa proximidade garante a manutenção, por mais tempo, dos atributos naturais da colônia, o que, de acordo com Bigler (1994), é desejável sob o ponto de vista de controle de qualidade.

Neste sentido, é importante salientar que as conclusões desse trabalho, referentes à resistência de *T. pretiosum* a altas taxas de endocruzamento, são baseadas nas cinco variáveis biológicas monitoradas, o que não descarta a possibilidade de que possa ter havido mudanças morfológicas e comportamentais. As variáveis monitoradas foram selecionadas por representarem características desejáveis para uma boa adaptabilidade do inimigo natural em condições de campo e por possibilitarem medições rápidas, que segundo Smith (1996), são preferíveis no processo de controle de qualidade, por serem passíveis de realizar numa atividade rotineira de laboratório. Os parâmetros biológicos,

indicados por Bigler (1994), para medições durante o processo de criação massal de *Trichogramma* spp., são os seguintes: fecundidade, porcentagem de emergência, razão sexual, longevidade, locomoção (caminhamento e vôo), aceitação do hospedeiro (natural) e identificação das espécies/linhagens.

Dentre os aspectos biológicos monitorados, o parasitismo (número de ovos parasitados nas primeiras 48 h) demonstrou ser uma variável adequada para detectar a perda de qualidade devido ao efeito fundador, sendo recomendável, portanto, que esta seja sempre incluída nos processos de seleção e monitoramento da qualidade. Por sua vez, a variável deformação de asas, apesar de sua importância, do ponto de vista prático, não demonstrou ser representativa da qualidade da colônia, considerando aspectos relativos ao efeito do endocruzamento, tendo apresentado resultados muito variáveis ao longo da criação. Essa inconstância dos resultados dificulta a associação com uma possível degradação genética da colônia, mas não implica que a mesma não deva ser incluída nos programas de controle de qualidade, pois altas taxas de deformação de asa podem indicar falhas no processo de criação, que por sua vez, se não corrigidas, podem comprometer um programa de liberação.

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que é possível iniciarem-se criações de *T. pretiosum* com apenas um casal, sem que consequências significativas sejam observadas nas suas características biológicas, possibilitando a manutenção da colônia, por, pelo menos, 25 gerações, sem comprometer sua qualidade. Os resultados observados, considerando as populações estudadas, indicam que o endocruzamento não é limitante para criações massais de *T. pretiosum*.

4. CONTROLE DE QUALIDADE DE POPULAÇÕES TELÍTOCAS E SEXUADAS DE *Trichogramma pretiosum*, RILEY, 1879, EM LABORATÓRIO

RESUMO

O objetivo do trabalho foi monitorar, durante 24 gerações, a qualidade de populações sexuadas (arrenótocas) e telítocas de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, a fim de avaliar, os efeitos da colonização em laboratório sobre características biológicas destes dois tipos de reprodução do parasitóide. Os parasitóides foram obtidos em coletas de campo, sobre ovos de *Helicoverpa zea* (Bod., 1850), em milho, e mantidos em laboratório em ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879). Foram selecionados machos e fêmeas virgens, oriundos de locais diferentes, utilizando-os em cruzamentos controlados para iniciar as populações de laboratório. Cada população sexuada foi formada a partir de um casal e no caso das telítocas, a partir de uma fêmea, num total de cinco repetições para cada tipo de reprodução. As populações foram avaliadas, com base em variáveis biológicas, monitorando-se o número de ovos parasitados, porcentagem de emergência, razão sexual, longevidade e deformação de adultos. Para as populações sexuadas, monitorou-se também, a cada geração, o número efetivo de indivíduos e o coeficiente de endocruzamento. Concluiu-se que populações sexuadas de *T. pretiosum* apresentam significativa superioridade, em relação ao parasitismo e à habilidade para suportar adversidades no processo de criação, quando comparadas às populações telítocas. Estas, por sua vez, se submetidas a um criterioso processo de seleção, podem ser mantidas com qualidade aceitável, por, pelo menos, 23 gerações, em criações de

laboratório; entretanto, exigem maior rigor nos procedimentos de controle de qualidade, em relação às populações sexuadas.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico, controle de qualidade, consanguinidade, endocruzamento, criação massal, Trichogrammatidae.

QUALITY CONTROL OF THELYTOKOUS AND SEXUAL POPULATIONS OF *Trichogramma pretiosum* RILEY, 1879, IN LABORATORY

SUMMARY

The goal of this research was to monitor, during 24 generations, the quality of sexual (arrhenotokous) and thelytokous populations of *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, in order to evaluate, the colonization effects in laboratory, on biological features of these two types of reproduction of the parasitoid. The parasitoids were acquired in field collectings, on eggs of *Helicoverpa zea* (Bod., 1850), in corn, and kept in laboratory in eggs of the factitious host *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879). Virgin males and females, collected in different places, were selected and used in controlled crossings to start the laboratory populations. Each sexual population was formed from a couple and in the case of thelytokous, from a female, in a total of five replications for each type of reproduction. The populations were evaluated, based on biological variables, monitoring the number of parasitized eggs, emergence rate, sex ratio, longevity and deformation of adults. For the sexual populations, it was also monitored, to each generation, the effective number of individuals and the coefficient of inbreeding. It was concluded that sexual populations of *T. pretiosum* show significant superiority, in relation to the parasitism and the ability to support adversities in the rearing process, when compared with the thelytokous populations. These, in turn, if submitted to a

criterious selection process, can be kept with acceptable quality, for, at least, 23 generations, in laboratory rearings; however, they demand a higher rigor in the quality control proceedings, in relation to the sexual populations.

KEY WORDS: Biological control, quality control, consanguinity, inbreeding, mass rearing, Trichogrammatidae.

4.1. INTRODUÇÃO

Os parasitóides do gênero *Trichogramma* são normalmente utilizados em liberações inundativas ou inoculativas estacionais, com a expectativa de efeito imediato sobre a população da praga. Portanto, são exigidos grandes números de parasitóides, com excelente qualidade, para liberações em locais e momentos adequados (Bigler, 1994). Populações para liberações inundativas são freqüentemente selecionadas pela alta fecundidade e emergência, razão sexual com alto número de fêmeas, alta longevidade, preferência hospedeira pela praga alvo, capacidade de “busca” e tolerância às condições climáticas. Uma população com essas características, segundo Smith (1996), é definida como de “alta qualidade”. A produção de *Trichogramma* com alta qualidade depende do uso apropriado de instalações adequadas, equipamentos e de uma meticulosa performance das operações de criação (Bigler, 1994).

No caso de criação de inimigos naturais, como em qualquer inseto de laboratório, podem ocorrer variações, devido à perda da variabilidade genética da população (devido à seleção e cruzamentos entre irmãos) (Parra, 1992). Essa perda pode alterar a habilidade do inseto criado, em desempenhar seu papel em programas de controle de pragas. No processo de domesticação em laboratório são selecionados insetos que tenham características genótípicas adequadas para sobreviver naquela condição particular. Desta forma, a adaptabilidade dos insetos de laboratório deve ser determinada monitorando-se mudanças nos componentes genéticos e mantendo-se adequados níveis de variabilidade

genética (Joslyn, 1984). Neste sentido, o conhecimento do tipo de reprodução do inimigo natural torna-se fundamental no processo de seleção e de criação em laboratório.

Todas as espécies biparentais de Hymenoptera, reproduzem-se por arrenotoquia, uma forma de partenogênese facultativa na qual óvulos não fertilizados originam machos haplóides e óvulos fertilizados originam fêmeas diplóides (Havron et al., 1987). Entretanto, espécies (e/ou linhagens) uniparentais, reproduzindo-se por telitoquia também são encontradas em muitos himenópteros, ocorrendo, neste caso, a origem de fêmeas a partir de óvulos não fertilizados (Stouthamer & Kazmer, 1994). Na maioria dos himenópteros de reprodução telítoca, a meiose ocorre normalmente e a diploidia é restaurada pela fusão de produtos meióticos (Suomalainen, 1987; citado por Cook, 1993). A reprodução por apomixia (mecanismo que não envolve “crossing-over”, sendo os descendentes geneticamente idênticos à mãe), por outro lado, é um processo raro em Hymenoptera (Cook, 1993). Desta forma, pode-se considerar que, mesmo sendo os descendentes oriundos de uma mesma fêmea telítoca, a constituição genética da população não se mantém inalterada, a cada geração, sugerindo a existência de variabilidade entre os indivíduos. Essa variabilidade, no caso de populações sexuadas, pode ser mantida em níveis satisfatórios, dependendo do tamanho inicial da colônia (Bartlett 1985).

Parasitóides do gênero *Trichogramma* podem apresentar diferentes tipos de reprodução (arrenotoquia, telitoquia e deuterotoquia) na mesma espécie, o que, segundo Stouthamer (1993), permite escolher a forma mais adequada em liberações visando ao controle biológico. Aeschlimann (1990) destacou algumas vantagens do uso de liberações, primeiramente de uma forma assexuada (telítoca) e em seguida de uma forma sexuada (arrenótoca), para o aumento da eficiência de programas de controle biológico aplicado. Stouthamer (1993), por sua vez, considera que a sequência de liberação não deve ser rígida, pois ambas as formas de reprodução podem ser utilizadas, em função das inúmeras situações diferentes a que os parasitóides podem ser submetidos. Independentemente do tipo de reprodução do parasitóide a ser utilizado, ele deve apresentar qualidade para exercer a sua função, e isso irá depender de diversos fatores,

como: a seleção da população “fundadora”, o controle do processo de criação, da produção e do produto final (Laing & Bigler, 1991).

O objetivo desse trabalho foi monitorar, durante 24 gerações, a qualidade de populações sexuais (arrenótocas) e telítocas de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, iniciadas, respectivamente, a partir de um casal e de uma fêmea, a fim de avaliar os efeitos da colonização em laboratório sobre características biológicas destes dois tipos de reprodução do parasitóide.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($60 \pm 10\%$) e fotoperíodo (14 L: 10 E).

4.2.1. Origem e manutenção dos parasitóides

As populações de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, foram obtidas em coletas de campo, sobre ovos de *Helicoverpa zea* (Bod., 1850) (Lep.: Noctuidae), em milho. As coletas foram realizadas nas áreas experimentais da ESALQ, em Piracicaba, e em plantios comerciais do município de Tanquinho, sendo estas áreas localizadas a aproximadamente 40 km de distância entre si, para evitar a obtenção de indivíduos aparentados. As pontas de espigas contendo estilo-estigmas eram coletadas e levadas ao laboratório, onde se fazia a triagem dos ovos de *H. zea*, acondicionando-os em microplacas utilizadas para teste serológico Elisa (12,5 x 8,0 cm), contendo 96 células de 7,0 mm de diâmetro e 10,0 mm de altura, de base cônica, tampados com filme plástico de PVC (Magipack ®). Os ovos que se tornavam escuros (característica do parasitismo por *Trichogramma*) eram individualizados em cápsulas gelatinosas transparentes (tipo usado para fármacos) até a emergência dos adultos. Os parasitóides

emergidos foram individualizados (machos e fêmeas virgens, oriundos de locais diferentes) e utilizados para fundar as populações de laboratório. Inicialmente acasalou-se, aos pares, separadamente, um grande número de indivíduos (sexuados), bem como, individualizou-se um grande número de fêmeas (telítocas), para posteriormente serem selecionadas cinco populações de cada um dos dois tipos de reprodução (sexuada e telítoca), com base nos casais e nas fêmeas que parasitaram maior número de ovos do hospedeiro de laboratório.

As criações foram mantidas em laboratório em tubos de vidro (9,0 x 2,5 cm), tampados com filme plástico de PVC (Magipack ®), utilizando-se como hospedeiro alternativo, ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lep.: Pyralidae). Esse hospedeiro foi obtido da criação existente no Laboratório de Biologia de Insetos da ESALQ/USP, mantida em dieta à base de farinha de trigo integral (97%) e levedura de cerveja (3%), ou farinha de trigo integral (40%) e farinha de milho (60%), de acordo com a metodologia proposta por Parra (1997). Foram utilizados ovos com idade máxima de 24 h, submetidos a um processo de inviabilização através da exposição dos mesmos à radiação ultra-violeta, por um período de 30 minutos e a uma distância de 15 cm da fonte de luz (Stein & Parra, 1987). Estes eram colados, por meio de uma solução de goma arábica (50%), em pedaços de cartolina azul (7,0 x 0,8 cm), e ofertados aos parasitóides adultos, acrescentando-se na parede interna do tubo de criação, algumas gotas de mel puro, como alimento para os mesmos (Parra, 1997).

4.2.2. Seleção das populações e monitoramento da qualidade

População sexuada (arrenótoca)

A descendência (F_1) contendo parasitóides machos e fêmeas era a garantia de que as populações selecionadas apresentavam partenogênese arrenótoca e de que a cópula havia sido realizada, já que fêmeas virgens originam apenas machos. As cinco populações selecionadas foram mantidas isoladas (sem mistura), em sistema de

cruzamentos consanguíneos, durante todo o período do experimento. Foi permitido às mesmas aumentarem em número até alcançarem um tamanho efetivo (N_e) superior a 1000 indivíduos, e, a partir de então, monitorou-se esse tamanho utilizando-se a fórmula proposta por Li (1955), para populações haplodiplóides:

$$N_e = 9 N_m N_f / (4 N_m + 2 N_f)$$

em que:

N_e = número efetivo de indivíduos;

N_m = número de machos;

N_f = número de fêmeas.

O número de machos e fêmeas foi estimado, a cada geração, por meio de amostragens. Cada população sexuada foi iniciada a partir de um casal visando forçar o endocruzamento e observar as conseqüências sobre a qualidade de *T. pretiosum*. O coeficiente de endogamia foi monitorado utilizando-se a fórmula de recorrência proposta por Wright (1922), citada por Falconer (1960):

$$F_t = 1/(2 N_e) + [1 - 1/(2 N_e)] F_{t-1}$$

em que:

F_t = coeficiente de endogamia na geração t;

N_e = número efetivo de indivíduos;

F_{t-1} = coeficiente de endogamia na geração t-1.

População telítica

A descendência contendo unicamente fêmeas foi a característica utilizada para confirmação de que as populações selecionadas eram realmente telíticas. Da mesma

forma que para as populações sexuadas, nesse caso também, permitiu-se às cinco populações aumentarem em número até atingirem aproximadamente 1000 a 1300 fêmeas por tubo de criação. No caso das populações telítocas, não se realizou o monitoramento do número efetivo (N_e) e do coeficiente de endogamia (F), já que os descendentes eram todos fêmeas.

Durante o período do experimento, a qualidade das populações telítocas foi avaliada nove vezes, enquanto que para as populações sexuadas foram realizadas 10 avaliações. O resultado de cada variável, nas gerações monitoradas, será referente à média de cinco repetições, das quais retiravam-se 100 fêmeas (20 de cada repetição) para utilização nos testes de qualidade. As avaliações foram baseadas em aspectos biológicos monitorando-se os seguintes parâmetros:

número de ovos parasitados: cartelas contendo, em média, 200 ovos eram ofertadas a 20 fêmeas de, no máximo, 10 horas de idade, individualizadas em tubos de vidro (7,5 x 1,0 cm) e alimentadas com uma gota de mel puro. Estas permaneciam parasitando por 48 h, período em que ocorre a maior taxa de parasitismo (Cônsoi & Parra, 1996) e, em seguida, as cartelas eram retiradas e acondicionadas em novos tubos. Eram considerados parasitados os ovos que se tornavam escuros, procedendo-se à contagem no sexto dia após o início do experimento.

porcentagem de emergência: esse parâmetro foi computado com base no número de ovos que apresentavam orifício de emergência em relação ao número total de ovos parasitados.

razão sexual (apenas para populações sexuadas): os adultos, após 72 h da emergência, eram mortos por congelamento e separados por sexo com base nas antenas (Bowen & Stern, 1966). A razão sexual foi determinada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$r.s. = \text{fêmea} / (\text{macho} + \text{fêmea})$$

longevidade de fêmeas: as fêmeas, após terem sido utilizadas no teste de parasitismo, eram realimentadas com mel e monitoradas diariamente, até a sua morte.

deformações: paralelamente ao processo de separação dos sexos, os adultos eram examinados no sentido de se detectarem deformações morfológicas. As observações

foram dirigidas principalmente para as asas (Figura 5), pois é o local onde normalmente ocorrem deformações em *Trichogramma*, quando mantido em condições inadequadas (Cônsoli & Parra, 1997).

Figura 5. A - *Trichogramma* com asas normais; B - *Trichogramma* com asas atrofiadas (Desenho por Patrícia Milano).

4.2.3. Análise estatística dos dados

A análise de variância dos dados foi realizada seguindo o modelo Hierárquico e as médias comparadas pelo teste LSD, ao nível de significância de 5%, utilizando o programa SAS. Os valores das variáveis "número de ovos parasitados" e "longevidade" foram transformados em $\log(x)$ e a "porcentagem de emergência" em x^{10} . Os dados da variável "porcentagem de deformação" não se ajustaram a uma distribuição normal e nenhum tipo de transformação possibilitou a normalização dos mesmos. A análise da variável "razão sexual" foi realizada separada das demais, considerando apenas os valores da população sexuada, já que para a população telitoca os valores desta variável eram constantes ($r.s.= 1,0$). Neste caso, a análise de variância foi realizada seguindo um delineamento inteiramente casualizado e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se diferença significativa entre as populações, com relação ao número de ovos parasitados (Tabela 4). Assim, enquanto que para as populações telítocas a média de parasitismo foi de 13 ovos, para as populações sexuadas este número foi o dobro, ou seja, 26 ovos. Essa diferença na taxa de parasitismo entre populações telítocas e sexuadas de *Trichogramma*, já fora relatada por Stouthamer (1993) e normalmente é menor, em torno de 10 a 20%, para populações telítocas, podendo-se observar, segundo esse autor, reduções de até 50%, valor observado no presente estudo. A população sexuada, apesar da maior taxa de parasitismo, em relação à telítoca, apresentou uma redução de aproximadamente 43%, no número de ovos parasitados, da primeira (F4) para a última (F24) geração monitorada. Esta redução não foi observada nas populações telítocas; entretanto, é importante evidenciar, que das cinco populações telítocas iniciais, apenas duas mantiveram-se viáveis até o final do experimento (geração 23), enquanto três foram perdidas nas gerações 13, 15 e 17 (Figura 6). Esta perda dos tratamentos deu-se em função de uma repentina diminuição no tamanho da população, sendo que o pequeno número de fêmeas sobreviventes não parasitou, levando as referidas populações à extinção.

Reduções repentinas no tamanho da população são comuns em populações sexuadas e, segundo Bartlett (1984), podem ser consequência da deriva genética induzida pela seleção em condições de laboratório. Como em populações telítocas os descendentes são praticamente clones dos seus geradores (Cook, 1993), apresentando desta forma, uma baixa variabilidade genética, qualquer modificação nas condições de criação, às quais a população encontra-se adaptada, pode levar à sua extinção (teoria da vulnerabilidade dos clones). Neste sentido constatou-se que, apesar da preocupação com a padronização das condições do experimento, mantendo-o com o mínimo de alterações ao longo das gerações (Temperatura: $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa: $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo: 14 L: 10 E), houve uma falha no processo de alimentação das fêmeas selecionadas para os testes de qualidade. Na tentativa de diminuir o tamanho da gota de mel (fonte de alimento), para evitar o afogamento das fêmeas, foi registrado um efeito

negativo, pois o mel secava de 12 a 24 h após a oferta. Assim, algumas fêmeas, que nos testes de qualidade permaneciam 48 h parasitando, ficavam praticamente metade do tempo sem alimento e quando individualizadas após o parasitismo, para a avaliação da longevidade, permaneciam sem alimento até a sua morte. Esta falha no processo de criação foi responsável pela perda das três populações telítocas, bem como, pela redução no parasitismo das populações sexuadas. Outro reflexo negativo foi sobre a longevidade (Tabela 4), onde se observou um decréscimo, em média, de aproximadamente 48%, tanto para as populações sexuadas quanto para as telítocas, a partir da décima geração, quando se reduziu o tamanho da gota. Infelizmente este problema só foi detectado após o término do experimento, quando na geração 47 repetiram-se os testes de qualidade com as populações sexuadas, preocupando-se desta vez com a alimentação, e observou-se o restabelecimento do parasitismo e da longevidade (Tabela 4).

Apesar de ter sido uma falha técnica, ficou evidente a fragilidade de populações telítocas e a maior habilidade das populações sexuadas em superar as adversidades que eventualmente surgem, ao longo das gerações, em criações massais. Este fato deve ser considerado, já que se tem observado uma tendência de aumento do uso de linhagens telítocas em programas de Controle Biológico Aplicado. Aeschlimann (1990) discutiu a possibilidade, no caso de Hymenoptera, de se optar pelo modo de reprodução dos parasitóides a serem utilizados em programas de controle biológico, recomendando liberações iniciais de linhagens telítocas (visando uma rápida redução na população do hospedeiro e o estabelecimento da população do parasitóide), seguidas posteriormente por liberações de linhagens sexuadas (visando restaurar a variabilidade genética da população já estabelecida), para uma melhor exploração do potencial dos parasitóides em campo. Discussão semelhante foi realizada por Stouthamer (1993); entretanto, segundo este autor, a sequência de liberação de formas telítocas e sexuadas, deve ser mais flexível, considerando aspectos como diferenças na biologia entre as duas formas de reprodução, possibilidade de sucesso entre cruzamentos de machos arrenótocos e fêmeas telítocas e por fim, informações sobre a densidade e distribuição da população do hospedeiro.

Tabela 4. Valores médios de cinco variáveis biológicas, obtidos no monitoramento da qualidade de duas populações de *Trichogramma pretiosum* (telítoca e sexuada), durante várias gerações de criação em laboratório. Temperatura $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h.

Popul.	Geração	Nº de repet. ¹	Variáveis biológicas $\pm s(x)$				
			Nº de ovos parasitados	Emergência (%)	Razão sexual	Longevidade (dias)	Deformação (%) ²
TELÍTOCA	5	5	15,2 a	89,4 a	1,0	8,6 ab	1,1
	7	5	13,0 a	88,9 a	1,0	10,8 a	0,7
	9	5	13,7 a	89,0 a	1,0	9,2 a	1,4
	11	5	12,3 a	92,5 a	1,0	5,3 cd	1,2
	13	4	11,7 a	91,7 a	1,0	5,2 cd	1,5
	15	3	12,9 a	90,8 a	1,0	4,5 d	1,6
	17	2	10,4 a	94,7 a	1,0	5,7 cd	2,6
	21	2	14,5 a	91,0 a	1,0	6,3 bc	0,9
	23	2	14,0 a	93,8 a	1,0	4,9 cd	0,2
Média			13,1 B	91,3 B	1,0	6,7 B	1,2
SEXUADA	4	5	33,8 a	78,9 d	0,71 a	11,5 a	1,3
	6	5	32,4 a	95,8 ab	0,75 a	11,3 ab	0,7
	8	5	22,9 b	95,2 ab	0,70 a	13,1 a	1,0
	10	5	35,5 b	88,9 cd	0,74 a	9,0 bc	1,5
	12	4	28,5 ab	94,5 abc	0,77 a	6,9 d	1,3
	14	5	22,7 b	97,4 a	0,72 a	7,0 d	0,5
	16	5	22,9 b	97,4 a	0,76 a	5,7 de	0,9
	18	5	20,8 b	97,4 a	0,72 a	5,1 e	1,0
	22	5	26,7 ab	91,3 bc	0,70 a	7,1 cd	1,0
	24	5	19,1 b	95,7 ab	0,68 a	6,2 de	0,3
Média ²			32,1	97,8	0,65	10,0	0,9
Média ²			26,5 A	93,3 A	0,72	8,3 A	0,9

¹ Cada repetição refere-se a uma população iniciada com uma fêmea, no caso da população telítoca, e com um casal, no caso da população sexuada.

² Não inclui os valores da geração 47.

³ Médias não comparadas estatisticamente devido aos dados não se ajustarem a uma distribuição normal.

- Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si, pelo teste LSD ($P \geq 0,05$). No caso da variável "razão sexual", pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

- Letras maiúsculas: comparação entre populações

- Letras minúsculas: comparação das gerações dentro de cada população

- As setas indicam as gerações nas quais não ocorreu parasitismo, conduzindo à perda das linhagens.
- T1 a T5: populações de laboratório iniciadas a partir de uma única fêmea.

Figura 6. Monitoramento do parasitismo de cinco populações partenogenéticas telíticas de *Trichogramma pretiosum*, ao longo de 23 gerações de criação em laboratório. Temperatura $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h.

De qualquer forma, Aeschlimann (1990) e Stouthamer (1993), concordam quanto a possibilidade do uso prático de linhagens telíticas de *Trichogramma*, para melhorar a eficiência de programas de controle biológico. Isto sendo verdadeiro, e considerando-se os resultados do presente estudo, haverá necessidade de um monitoramento mais criterioso da qualidade das populações de laboratório e um maior cuidado no processo de criação massal, para evitar consequências drásticas, como a perda de linhagens, ocorrida ao longo do presente trabalho. Da mesma forma, os resultados indicam a importância da realização de uma rigorosa seleção de linhagens candidatas, antes de se

iniciar a criação massal, já que das cinco populações telítocas, utilizadas neste trabalho, duas conseguiram manter-se viáveis, mesmo sofrendo as mesmas adversidades das demais.

Segundo Stouthamer et al. (1990), existem duas formas de telitoquia em *Trichogramma*: a telitoquia reversível (associada a microrganismos) e a não-reversível, podendo a primeira ser revertida com a utilização de antibióticos. As populações utilizadas neste trabalho apresentavam telitoquia reversível, pois, após o tratamento das fêmeas com antibiótico (tetraciclina), na base de 100 mg para 1 ml de mel, conforme metodologia de Parra et al. (1991), observou-se o aparecimento de machos. A espécie de microorganismo envolvido não foi identificada, mas possivelmente deve tratar-se da alfa-proteobactéria do gênero *Wolbachia*, comumente encontrada em linhagens telítocas de várias espécies de *Trichogramma* (Stouthamer et al, 1993).

Com relação às populações sexuadas, o fato de cada uma ter sido iniciada com apenas um casal, levantou inicialmente a suspeita de que a redução do número de ovos parasitados e da longevidade fosse devida a problemas de deterioração genética, em função do alto coeficiente de endocruzamento. Entretanto, a queda na qualidade ocorrida, também, nas populações telítocas (como se observou para a variável longevidade), revelou a possibilidade de que esses resultados negativos tenham ocorrido, principalmente, em função da alimentação deficiente ao longo das gerações e não devido a problemas genéticos. No entanto, não se pode descartar o fato de que algum processo genético degenerativo tenha ocorrido, em associação ao problema da alimentação, apesar de as populações sexuadas terem demonstrado suportar uma alta taxa de endocruzamento. Esta taxa, que já era alta inicialmente ($F = 0,33$), em função do reduzido número de fundadores (um casal), atingiu ao final do experimento (geração 24) um coeficiente médio de 0,35 (Figura 7). Como modelo de comparação, uma população de milho com um coeficiente de endogamia de 0,50 tem a sua produção final de grãos reduzida em aproximadamente 30 a 40%. Evidentemente trata-se de uma comparação grosseira, mas que demonstra o quanto é significativo o efeito do endocruzamento sobre a constituição genética de um organismo. No caso de himenópteros de reprodução sexuada (com arrenotoquia), como *Trichogramma*, a elevação desse índice não tem

revelado consequências degenerativas (Sorati et al., 1996; Liu & Smith, 1997). A principal hipótese para explicar esse fenômeno, segundo Roush (1989), é a de que o comportamento de acasalamento e a baixa densidade populacional favoreceram, ao longo dos anos de evolução, uma rotina de cruzamentos consanguíneos na natureza, e esse endocruzamento periódico, de acordo com Crozier (1977), pode ter levado à exposição e eliminação seletiva de alelos recessivos letais e semi-letais, principalmente por se tratarem de himenópteros de reprodução arrenótoca (haplo-diplóides), nos quais todas as características (exceto aquelas expressas somente nas fêmeas) são expostas a cada geração nos machos haplóides.

Figura 7. Valores médios do número efetivo (N_e), do número total (N) e do coeficiente de endogamia (F) de cinco populações sexuadas de *Trichogramma pretiosum* (iniciadas com 1 casal fundador), durante 25 gerações de criação em laboratório. Temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h.

Esse fato ficou demonstrado no presente trabalho, pois as cinco populações sexuadas, iniciadas com um casal ($F = 0,33$), não apresentaram características degenerativas ao longo das gerações. A queda no parasitismo e na longevidade deu-se por uma falha na técnica de criação, como discutido anteriormente, o que significa que se esse processo for controlado rigorosamente, será possível manter criações com qualidade aceitável por longos períodos, mesmo se iniciadas com pequeno número de fundadores. Quanto maior o número inicial de fundadores, menor será o coeficiente de endocruzamento e menor será a sua velocidade de progressão ao longo das gerações (Figura 7). Entretanto, é importante atentar para o fato de que se deve considerar o número efetivo (N_e) e não o número total (N) de indivíduos. O parâmetro N_e é geralmente menor que N , pois leva em consideração a proporção de machos e fêmeas, separadamente, e não a soma dos dois sexos. Neste trabalho, o valor do N_e foi em média 70% de N , atingindo um mínimo de 60,7% e um máximo de 75,5% (Figura 5). A manutenção do N_e , com valores em torno de 1000 indivíduos, demonstrou ser suficiente para manter a colônia com uma qualidade aceitável, por longos períodos de colonização em laboratório.

Os resultados da variável razão sexual não apresentaram variação significativa no decorrer das gerações avaliadas, bem como, os resultados da variável porcentagem de emergência, considerando a população telítica (Tabela 4). No caso da população sexuada, os dados da porcentagem de emergência apresentaram significativa oscilação ao longo das gerações, assim como a porcentagem de deformação, neste caso, para ambas as populações. Apesar da grande oscilação nos valores destas variáveis, não foi possível correlacionar os altos e baixos, com a qualidade da colônia. Estes resultados permitem considerar que, apenas a longevidade e o parasitismo demonstram serem variáveis adequadas para detecção de perdas de qualidade em colônias de laboratório. Por outro lado, a porcentagem de emergência, a razão sexual e a porcentagem de deformação, não refletem, com precisão, a qualidade das populações monitoradas.

Baseando-se nos resultados obtidos, pode-se concluir que populações sexuadas de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 apresentam significativa superioridade, em relação ao parasitismo e à habilidade para suportar adversidades no processo de criação,

quando comparadas às populações telíticas. Estas, por sua vez, se submetidas a um criterioso processo de seleção, podem ser mantidas com qualidade aceitável, por pelo menos 23 gerações, em criações de laboratório; entretanto, exigem maior rigor no processo de controle de qualidade, em relação às populações sexuadas.

5. TESTE DE VÔO COMO CRITÉRIO DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE *Trichogramma pretiosu* RILEY, 1879: ADAPTAÇÃO DE METODOLOGIA

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade de populações sexuais de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, em laboratório, utilizando-se o teste de vôo recomendado pela Organização Internacional de Controle Biológico (IOBC). Os parasitóides foram obtidos em coletas de campo, sobre ovos de *Helicoverpa zea* (Bod., 1850), em milho, e mantidos em laboratório em ovos do hospedeiro alternativo *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879). Numa primeira etapa, realizou-se a comparação entre o modelo padrão, recomendado pela IOBC (com algumas modificações) e um modelo adaptado e denominado ESALQ. Para cada modelo, avaliou-se a qualidade de três populações de *T. pretiosum*, mantidas em laboratório por três, 35 e 72 gerações, respectivamente. Independente da geração, ambos os modelos não registraram diferença na qualidade, entre as populações estudadas, tomando-se por base a porcentagem de parasitóides que apresentaram aptidão para vôo, após a emergência. O modelo ESALQ permitiu uma melhor discriminação entre “voadores” e “não voadores”. Numa segunda etapa, utilizou-se o modelo ESALQ para monitorar, durante 21 gerações, a qualidade de três populações sexuais de *T. pretiosum*, iniciadas respectivamente com um, cinco e dez casais. A população iniciada com um casal apresentou qualidade inferior em comparação com as populações iniciadas com cinco e dez casais. O teste de vôo mostrou-se eficiente na determinação da qualidade de populações de *T. pretiosum*, em condições de laboratório, e as modificações realizadas no modelo padrão

favoreceram uma melhor separação de “voadores” e “não voadores” do parasitóide, podendo o modelo ESALQ ser indicado como substituto do modelo padrão, recomendado pela IOBC.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico, controle de qualidade, teste de vôo, criação massal, Trichogrammatidae.

FLIGHT TEST AS EVALUATION CRITERION FOR THE QUALITY OF *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879: METHODOLOGY ADAPTATION

SUMMARY

The goal of the research was to evaluate the quality of populations of *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, in laboratory, by using the flight test recommended by the International Organization of Biological Control (IOBC). The parasitoids were acquired in field collectings, on eggs of *Helicoverpa zea* (Bod., 1850), in corn, and kept in laboratory in eggs of the factitious host *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879). In a first stage, it was made a comparison between the standard model, recommended by the IOBC (with some modifications), and a customized model named ESALQ. For each model, it was evaluated the quality of three populations of *T. pretiosum*, kept in laboratory for three, 35 and 72 generations, respectively. Independent from the generation, both models did not register difference in the quality, between the studied populations, based on the percentage of parasitoids that showed initial flight capacity, after the emergence. The ESALQ model allowed better discrimination between "non-flyers" and "flyers". In a second stage, the ESALQ model was used to monitor, during 21 generations, the quality of three sexual populations of *T. pretiosum*, respectively started by using one, five and ten couples. The population wich was started with a single couple showed an inferior quality in comparison to the populations wich

were started by using five and ten couples. The flight test was highly efficient in the quality determination of *T. pretiosum* populations, in laboratory conditions, and the accomplished modifications in the standard model provided a better separation of flyers and non-flyers of the parasitoid, being able to indicate the ESALQ model as a substitute of the standard model, recommended by the IOBC.

KEY WORDS: Biological control, quality control, flight test, mass rearing, Trichogrammatidae.

5.1. INTRODUÇÃO

A produção de inimigos naturais com qualidade comparável àqueles da natureza é o principal objetivo de qualquer laboratório de criação que vise atender a programas de Controle Biológico Aplicado. O controle da qualidade, segundo Clarke & McKenzie (1992), é um dos fatores determinantes para o sucesso desses programas, sendo a qualidade total de um organismo definida como a sua capacidade em controlar a praga após a liberação em campo. Portanto, de acordo com Lenteren (1992_a), o objetivo do controle de qualidade é determinar se um inimigo natural, após gerações sucessivas em laboratório, continua eficiente no controle de pragas.

Um grande número de testes de laboratório tem sido conduzido objetivando monitorar a qualidade de inimigos naturais, com base principalmente em parâmetros biológicos; entretanto, existe necessidade de se estabelecerem parâmetros fáceis de serem medidos e que indiquem com segurança a qualidade do inimigo natural, a fim de padronizá-los internacionalmente para uso rotineiro em criações massais.

Na Europa, segundo Lenteren (1992_b), foram desenvolvidas normas, padronizadas pelo Grupo de Trabalho da Organização Internacional de Controle Biológico - IOBC-QC (IOBC global working group "Quality control of mass reared arthropods"), para controle de qualidade em criações de diversos inimigos naturais utilizados em casas-de-vegetação (cultivo protegido). Para parasitóides, os testes

envolvem a avaliação dos seguintes componentes de qualidade: número de adultos emergidos, razão sexual, fecundidade, longevidade, tamanho do adulto, atividade de vôo e performance em campo. A atual recomendação da IOBC-QC, para *Trichogramma*, é selecionar, preliminarmente, com critérios bem rigorosos, linhagens e espécies com base em características biológicas e comportamentais (Hassan, 1994; 1997). Segundo esta Organização, as avaliações subseqüentes de qualidade, feitas durante o processo de criação, podem ser menos detalhadas e mais direcionadas para atributos que possibilitem a obtenção de resultados rápidos.

Um dos atributos importantes e que pode sofrer modificações no processo de colonização, é a atividade de vôo. Esta é uma característica fundamental para o desempenho do parasitóide em condições de campo e, portanto, necessita ser monitorada.

Dutton & Bigler (1995) desenvolveram uma metodologia para avaliar a atividade de vôo de *Trichogramma brassicae* Bezdenko, em condições de laboratório e campo, para testes de controle de qualidade. Através dela, os autores detectaram diferenças na atividade de vôo entre duas linhagens de *T. brassicae* criadas em laboratório, a primeira por duas gerações (F2) e a segunda por 39 gerações (F39). Os autores concluíram que o teste de vôo realizado em laboratório pode, potencialmente, ser utilizado como um indicador da qualidade de *Trichogramma*, por ser um método simples, rápido e barato. Enkegaard & Reitzel (1991) recomendaram um teste de vôo de curta distância, para os parasitóides *Aphidoletes aphidimiza* (Rond.), *Aphidius matricariae* Haliday, 1834 e *Encarsia formosa* Gahan, com a utilização de um modelo bastante semelhante ao descrito por Dutton & Bigler (1995), para *T. brassicae*. A utilização deste mesmo modelo (com algumas modificações) já fora recomendada por Bigler (1992) para testes tanto com parasitóides como predadores.

O objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade de populações de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, em função do número de gerações de laboratório e do tamanho da população inicial, utilizando-se como critério de avaliação a atividade de vôo, e testar a eficiência do modelo desenvolvido por Dutton & Bigler (1995) (com algumas modificações), em relação a um modelo adaptado e denominado modelo ESALQ.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Obtenção e manutenção dos parasitóides

As linhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, para início das criações de laboratório, foram obtidas em coletas de campo, sobre ovos de *Helicoverpa zea* (Bod., 1850) (Lep.: Noctuidae), em milho. As coletas foram realizadas nas áreas experimentais da Embrapa Milho e Sorgo, e em plantios comerciais do município de Sete Lagoas (Latitude 19° 28' S e longitude 44° 15' O), distantes entre si (proximidade mínima de 4 Km), para evitar a obtenção de indivíduos aparentados. As criações foram mantidas em laboratório em tubos de vidro (9,0 x 2,5 cm), tampados com filme plástico PVC (Magipack ®), utilizando-se como hospedeiro alternativo, ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lep.: Pyralidae). Esse hospedeiro foi obtido da criação existente no Laboratório de Criação de Insetos da Embrapa Milho e Sorgo, mantida em dieta à base de farinha de trigo integral (48,5 %), farinha de milho (48,5 %), e levedura de cerveja (3%). Foram utilizados ovos com idade máxima de 24 h, submetidos a um processo de inviabilização através da exposição dos mesmos à radiação ultra-violeta (Stein & Parra, 1987). Estes eram colados, por meio de uma solução de goma arábica (50%), em pedaços de cartolina azul (7,0 x 0,8 cm), e ofertados aos parasitóides adultos, acrescentando-se na parede interna do tubo de criação, algumas gotas de mel puro, como fonte de alimento (Parra, 1997).

5.2.2 Descrição dos modelos para testes de vôo

Modelo original (com adaptações)

A unidade-teste original, desenvolvida por Dutton & Bigler (1995), para avaliação da atividade de vôo de *Trichogramma*, em laboratório, consiste de um cilindro de PVC com 18 cm de altura e 11 cm de diâmetro (Figura 9A). Uma placa de Petri transparente, pulverizada com cola 24 horas antes do experimento, é colocada na parte superior do cilindro, servindo como armadilha para os parasitóides em vôo (a cola deve

ser isenta de odores ou outras características que possam afetar o comportamento do parasitóide). A parte inferior do cilindro é fechada com uma tampa plástica firmemente ajustada. Internamente, a parte inferior e os lados são cobertos com uma folha plástica preta, de forma a forçar a atração dos insetos em direção à fonte de luz (topo). Um anel de cola de 0,5 cm é pulverizado na região interna do cilindro a 2,5 cm da extremidade inferior como uma barreira para o caminhar dos parasitóides. Um recipiente plástico (2 x 2 x 1 cm) contendo aproximadamente 300 ovos de *A. kuehniella*, parasitados por *Trichogramma* spp., próximos a emergência, é colocado na região inferior central de cada cilindro. A posição e o número de parasitóides no anel de cola, na placa de Petri ("voadores") e no fundo ("não voadores") são registrados e utilizados nos cálculos de porcentagens, em relação ao número total de adultos emergidos. Os parasitóides considerados "não voadores" são observados sob microscópio estereoscópico para se determinar a porcentagem de indivíduos com deformações nas asas.

Em função de algumas dificuldades encontradas na utilização do modelo original, principalmente relacionadas ao escape de parasitóides, foram realizadas algumas modificações visando ao aumento da eficiência do mesmo (Figura 9A). O modelo adaptado consiste de um cilindro de PVC com as mesmas dimensões do modelo original; entretanto, o seu interior é pintado com tinta acrílica preta sobre uma camada de tinta látex branco, para facilitar a fixação da mesma (Figura 8A). Com isso, substituiu-se o uso da folha plástica preta recomendada no modelo original. O fundo do tubo é vedado com um plástico flexível preto (tamanho maior que o diâmetro do tubo) ajustado firmemente por meio de um disco de isopor de aproximadamente um centímetro de espessura e com o mesmo diâmetro do tubo (Figura 8B). As bordas do plástico, que após o encaixe, sobram para o exterior do tubo, são fixadas ao mesmo por meio de elásticos, que permitem uma perfeita vedação, evitando a fuga dos parasitóides. Em função da espessura do isopor, o anel de cola, utilizado como barreira, é pincelado a 3,5 cm da extremidade inferior do modelo, diretamente na parede interna do mesmo (Figura 8C). Os ovos parasitados, prestes a emergência, são acondicionados no fundo do tubo sobre uma placa plástica de 2,5 cm de diâmetro e 1,0 cm de altura.

Figura 8. Unidade-teste para avaliação da atividade de vôo de *Trichogramma* spp. (modelo adaptado de Dutton e Bigler, 1995). **A** - Modelo montado; **B** - Componentes do modelo: **a** - plástico de polietileno preto; **b** - disco de isopor; **c** - elástico; **d** - tubo de PVC; **e** - placa de Petri; **C** - Anel de cola (barreira ao caminhamento). (Fotos por Heraldo Negri de Oliveira).

Modelo ESALQ

Em pré-testes realizados com o modelo adaptado, observou-se que um grande número de parasitóides era encontrado preso ao anel de cola. Atribuiu-se esse fato à característica apresentada por alguns parasitóides, de caminhar, logo após a emergência, mesmo antes de finalizar o processo de distensão das asas (observação pessoal). Desta forma, desenvolveu-se o modelo denominado “ESALQ”, que apresenta as mesmas características do modelo adaptado, com a diferença de que os ovos parasitados de *A. kuehniella*, ao invés de serem acondicionados em placas plásticas, são colocados no fundo de um tubo de ensaio (9,0 x 2,5 cm), que por sua vez, é fixado no centro da região inferior da unidade-teste, por meio de uma fita adesiva (Figura 9B). Essa modificação foi realizada com o objetivo de permitir que o parasitóide tenha um tempo suficiente

para distensão das asas, o que é conseguido durante o período de caminhamento neste tubo, antes do contato com o anel de cola, dando oportunidade aos “voadores” de distenderem suas asas e ultrapassarem essa barreira, evitando-se assim, erros na avaliação.

5.2.3. Comparação de modelos para testes de vôo

O trabalho foi desenvolvido numa sala climatizada do Laboratório de Criação de Insetos da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas – MG, com temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $60 \pm 10\%$. O ambiente foi mantido constantemente iluminado durante o período em que o experimento foi conduzido. A comparação foi realizada entre o modelo adaptado da IOBC e o modelo ESALQ. Cada modelo foi utilizado para avaliar a qualidade de três populações de *T. pretiosum*, mantidas em laboratório por três, 35 e 72 gerações, respectivamente. Os tratamentos foram constituídos de seis repetições, sendo estas distribuídas ao acaso, sobre uma bancada de madeira, diretamente abaixo da fonte de luz, desde que o inseto é fototrópico positivo. Cada tratamento recebeu, em média, 600 ovos parasitados de *A. kuehniella*, prestes à emergência, sendo as unidades-teste mantidas durante três dias, após o início da emergência dos parasitóides; após este período, os insetos foram congelados, para se proceder às avaliações. Registrou-se a porcentagem de parasitóides encontrados na tampa (“voadores”), no fundo (“não voadores”), e no anel, avaliando-se também, em relação aos “não voadores”, a porcentagem de indivíduos com asas deformadas.

5.2.4. Controle de Qualidade de populações de *T. pretiosum* através do teste de vôo.

Utilizando-se o modelo ESALQ, realizou-se o monitoramento da qualidade de três populações de *T. pretiosum*, ao longo de 21 gerações de laboratório, visando avaliar a eficiência do mesmo em detectar alterações na atividade de vôo do parasitóide, como

critério de controle de qualidade. As populações monitoradas foram iniciadas a partir de um, cinco e dez casais fundadores, num delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco repetições. As gerações avaliadas foram variáveis de acordo com a população, sendo realizados testes com as populações iniciadas com um casal, nas gerações 6, 13 e 21; com as populações iniciadas com cinco casais, nas gerações 6, 14 e 21; e com as populações iniciadas com dez casais, nas gerações 7, 13 e 20. Os testes foram conduzidos nas mesmas condições descritas para o teste de comparação de modelos; entretanto, os insetos não foram congelados no terceiro dia, sendo avaliados no quinto dia após o início do experimento.

Figura 9. Unidades-teste para avaliação da atividade de vôo de *Trichogramma* em laboratório: **A** – Modelo original de Dutton & Bigler (1995), com indicação (setas) dos locais onde foram realizadas adaptações: **a** - pintura interna preta em substituição à folha plástica preta, **b** - anel de cola pincelado a 3,5 cm do fundo, ao invés de 2,5 cm, **c** - vedação do fundo com plástico preto e isopor em substituição à tampa plástica; **B** – Modelo ESALQ.

5.2.5. Análise estatística dos dados

A análise de variância dos dados foi realizada seguindo o delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial, e as médias comparadas pelo teste LSD, ao nível de significância de 5%, utilizando-se o programa SAS. No experimento de "controle de qualidade de populações de *T. pretiosum* através do teste de vôo", os valores das variáveis "porcentagem de indivíduos capturados no anel" e "porcentagem de indivíduos capturados no fundo" foram transformados em $\log(x)$ e a "porcentagem de indivíduos capturados na tampa" em $(\text{ARCSEN } \sqrt{x/100})^{4,2}$. No teste de comparação de modelos, os valores das variáveis "porcentagem de indivíduos capturados no anel" e "porcentagem de indivíduos capturados no fundo" foram transformados, respectivamente, em $\sqrt{x}$ e $\log(x)$.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Comparação de modelos para testes de vôo

A porcentagem de parasitóides capturados na tampa ("voadores") das unidades estudadas foi significativamente maior no modelo ESALQ, em comparação ao modelo da IOBC, com adaptações. Nos testes em que se utilizou o modelo adaptado, a porcentagem média de "voadores", para as três populações de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, estudadas, foi de 77,1 %; enquanto que com a utilização do modelo ESALQ, esse número elevou-se para 86,0 % (Tabela 5). Este fato demonstra que a modificação realizada no modelo ESALQ (Figura 9B), permitiu um aumento da sensibilidade do teste de vôo, na detecção da porcentagem de indivíduos "voadores". Vale salientar que todos os indivíduos capturados na tampa das unidades-teste, no modelo ESALQ, apresentavam asas completamente distendidas, indicando que os mesmos alcançaram o topo das unidades voando e não caminhando. Esta observação foi realizada para evitar dúvidas quanto a funcionalidade do modelo ESALQ, já que o tubo

de ensaio, introduzido neste modelo, ultrapassa em altura, o anel de cola utilizado como barreira ao caminamento (Figura 9B). Este fato, poderia facilitar um possível salto do parasitóide, da borda superior do tubo de ensaio, para a parede da unidade-teste, a uma altura acima do anel de cola.

A porcentagem média de indivíduos capturados no anel de cola foi superior no modelo adaptado (confirmando observações feitas em testes prévios), sendo este o principal motivo para a realização de modificações nesse modelo, já que os indivíduos presos no anel não podem ser categorizados nem como “não voadores” e nem como “voadores”, já que ambos podem alcançar essa barreira tanto por caminamento quanto por vôo. Portanto, quanto menor o número de indivíduos presos no anel de cola, melhor a qualidade do teste, com maior confiabilidade da avaliação. No presente estudo esse número foi, em média, de 5% para o modelo ESALQ e de 8,2% para o modelo adaptado (Tabela 5), indicando que a modificação introduzida no modelo ESALQ (tubo de ensaio) possibilitou uma melhor discriminação dos "voadores", pois nesse modelo, para que o parasitóide chegue ao anel de cola, ele necessita percorrer um longo caminho, tendo inclusive que ir contra algumas características comportamentais intrínsecas à espécie (geotropismo negativo e fototropismo positivo), após alcançar o topo do tubo, no interior da unidade-teste. Nesse percurso, o parasitóide tem tempo de distender suas asas e voar, sendo capturado na tampa da unidade-teste, o que não ocorre no modelo adaptado, onde o parasitóide recém emergido, ao caminhar na parede interna da unidade-teste, antes de distender as asas, tem maior probabilidade de ficar preso no anel de cola, deixando de ser computado como “voador” e interferindo na precisão do teste.

Com a utilização do modelo adaptado, observou-se também uma maior porcentagem de indivíduos capturados no fundo da unidade-teste ("não voadores"), não havendo, no entanto, nos testes com ambos os modelos, diferença entre as populações. Esse resultado demonstra, mais uma vez, que o modelo ESALQ permite uma melhor discriminação entre “voadores” e “não voadores”, pois o parasitóide que ao chegar ao topo do tubo de ensaio, no interior da unidade-teste, caminhar em direção ao fundo da mesma, certamente possui reduzida propensão ao vôo ou encontra-se com as asas deformadas.

Tabela 5. Comparação da eficiência de dois modelos para avaliação da atividade de vôo de *Trichogramma pretiosum*, em laboratório, com base na porcentagem de indivíduos capturados em diferentes locais das unidades-teste e na porcentagem de indivíduos deformados. Temperatura $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 24 h.

MODELO	PARÂMETROS AVALIADOS			
	% de indivíduos capturados na tampa ("voadores")			
	População			Média
	F3	F35	F72	
IOBC (Adaptado)	76,9	79,1	75,4	77,1 B
ESALQ	85,3	89,0	83,6	86,0 A
Média	81,1 a	84,0 a	79,5 a	
	% de indivíduos capturados no anel (barreira)			
	F3	F35	F72	Média
IOBC (Adaptado)	09,2	05,3	10,0	08,2 A
ESALQ	05,5	03,2	06,4	05,0 B
Média	07,4 a	04,2 b	08,2 a	
	% de indivíduos capturados no fundo ("não voadores")			
	F3	F35	F72	Média
IOBC (Adaptado)	13,9	15,6	14,6	14,7 A
ESALQ	09,1	07,9	10,0	09,0 B
Média	11,5 a	11,7 a	12,3 a	
	% de indivíduos com asas deformadas *			
	F3	F35	F72	Média
IOBC (Adaptado)	29,3 a A	24,2 a A	32,6 a B	28,7
ESALQ	21,0 b A	23,6 b A	47,9 a A	30,8
Média	25,2	23,89	40,22	

- Populações: F 3, F 35 e F 72 (o número refere-se à geração de criação em laboratório).

- Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

Letras Minúsculas: comparação entre populações

Letras Maiúsculas: comparação entre modelos

* Porcentagem de deformados em relação ao total de parasitóides encontrados no fundo dos tubos.

A porcentagem de indivíduos que apresentaram asas deformadas, em relação aos "não voadores", não diferiu, entre as populações, quando os testes foram realizados com o modelo adaptado. Entretanto, com o modelo ESALQ, detectou-se uma porcentagem de deformação de asas significativamente superior para a população F72, em relação às

demaís gerações, revelando que a modificação realizada nesse modelo, possibilitou uma melhor seleção dos parasitóides "não voadores" e conseqüentemente, favoreceu a detecção mais precisa da porcentagem de indivíduos deformados. Esse aumento na porcentagem de deformação, no entanto, não interferiu na qualidade da população, já que nesse caso, apenas 10% dos parasitóides foram considerados "não voadores". Era esperado, conforme observação de Morrison & King (1977); citado por Lenteren (1991), que a população F72 fosse apresentar problemas significativos de qualidade, em função do grande número de gerações mantidas em laboratório, sobre um único hospedeiro. Entretanto, os resultados obtidos para esta população, referentes à porcentagem de "voadores", não diferiram daqueles obtidos para as populações F3 e F35. Independente da geração, ambos os modelos não registraram diferença na qualidade das populações estudadas, com relação à porcentagem de "voadores". Este resultado diverge do obtido por Dutton & Bigler (1995), em que os autores observaram uma menor porcentagem de "voadores" numa população de *Trichogramma brassicae* Bezdenko mantida por 39 gerações em laboratório, em comparação com uma mantida por apenas duas gerações.

5.3.2. Controle de Qualidade de populações de *T. pretiosum* através do teste de vôo.

O teste de vôo demonstrou ser um método eficiente para a detecção de perdas de qualidade em populações de *T. pretiosum*, e o modelo ESALQ apresentou alta sensibilidade na seleção de populações desse parasitóide, com base na atividade de vôo. Considerando-se os resultados obtidos, relativos à porcentagem de parasitóides "voadores" (Tabela 6), pode-se afirmar que as populações iniciadas a partir de um casal apresentam qualidade inferior em comparação às populações iniciadas a partir de cinco e dez casais, indicando que o tamanho inicial da colônia de laboratório tem efeito significativo sobre sua qualidade ao longo das gerações de criação. A porcentagem média de "voadores", para as populações iniciadas a partir de um casal, não alcançou os 80% nas três gerações avaliadas, enquanto que para as demais, a média de "voadores" foi sempre superior a esse valor, exceção feita apenas para as populações iniciadas a partir de cinco casais, na geração 21, em que se observou uma significativa redução na

porcentagem de "voadores", em relação às primeiras gerações (77,7% contra 88,3% e 90,6% nas gerações 6 e 13 respectivamente). De acordo com Wajnberg (1991) populações de laboratório não devem ser iniciadas com pequeno número de indivíduos; entretanto, não existe um tamanho ideal para uma colônia inicial, já que uma série de fatores pode influenciar nesse tamanho. Mackauer (1976) considerou que um número inicial de 500 indivíduos é adequado para a maioria dos programas de controle biológico. Já Bartlett (1985), mencionou um número mínimo de mil indivíduos. Entretanto, a obtenção de grandes quantidades de parasitóides, em condições de campo, é muitas vezes difícil o que obriga, na prática, à fundação de colônias de laboratório a partir de um número restrito de indivíduos. No caso de *T. pretiosum*, Prezotti et al. (2001) constataram que é possível iniciarem-se criações com apenas um casal, sem que alterações significativas sejam observadas nas suas características biológicas, possibilitando a manutenção da colônia, por, pelo menos 25 gerações, sem comprometer sua qualidade. No entanto, segundo os mesmos autores, para a obtenção de populações com maior vigor, durante períodos mais longos, é aconselhável que as colônias sejam iniciadas com um tamanho efetivo igual ou superior a 15 indivíduos (o que corresponde a dez casais). O presente estudo confirma os resultados de Prezotti et al. (2001), pois as populações iniciadas a partir de dez casais apresentaram qualidade superior às demais; entretanto, os resultados obtidos para populações iniciadas a partir de um casal, com relação à porcentagem de "voadores", apesar de terem sido significativamente menores, ainda podem ser considerados satisfatórios (média igual ou superior a 75%).

Maiores porcentagens de indivíduos capturados no fundo do tubo, não implicaram em maiores porcentagens de indivíduos com asas deformadas, revelando que parte da população de *T. pretiosum* pode apresentar uma perda da característica natural de voar em direção à luz, logo após a emergência, independente de ter ou não as asas deformadas. A porcentagem média de indivíduos com asas deformadas, em relação aos "não voadores", não ultrapassou os 50 %, em todos os testes realizados (Tabela 6), demonstrando que mais da metade dos "não voadores" era composta de indivíduos com asas aparentemente normais. Esse fato indica que a simples observação da porcentagem de indivíduos que apresentam asas deformadas, em testes de controle de qualidade, não é

suficiente para caracterizar a qualidade do parasitóide, já que indivíduos com asas aparentemente normais, mas que não apresentam propensão ao vôo, podem comprometer a dispersão do parasitóide em campo e conseqüentemente o sucesso de um programa de controle biológico.

Tabela 6. Utilização do modelo ESALQ para o monitoramento da atividade de vôo de três populações de *Trichogramma pretiosum*, ao longo de várias gerações de laboratório, utilizando como critério de avaliação a porcentagem de indivíduos capturados em diferentes locais das unidades-teste e a porcentagem de indivíduos deformados. Temperatura $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 24 h.

Tamanho inicial da População (casais)	Geração	Local de captura dos parasitóides nas unidades-teste			Deformados*
		Tampa ("voadores")	Anel ("barreira")	Fundo ("não voadores")	
1	6	74,7 a B	13,6 a A	11,7 a A	41,8 a A
	13	79,1 a B	12,4 a A	08,4 a A	34,4 a A
	21	76,2 a B	12,2 a A	11,6 a A	32,9 a B
Média		76,7	12,7	10,6	36,4
5	6	88,3 a A	05,2 a B	06,4 b B	44,6 a A
	14	90,6 a A	04,4 a B	04,9 b A	29,5 b A
	21	77,7 b B	09,5 a B	12,8 a A	48,2 a A
Média		85,5	06,4	08,0	40,8
10	7	83,4 b A	07,8 a B	08,8 a AB	34,5 a A
	13	89,3 a A	04,5 a B	06,1 a A	37,9 a A
	20	88,5 a A	04,9 a B	06,6 a B	38,1 a AB
Média		87,1	05,7	07,2	36,8

- Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

Letras maiúsculas: comparação das gerações entre populações

Letras minúsculas: comparação das gerações dentro de cada população

* Porcentagem de deformados em relação ao total de parasitóides encontrados no fundo.

O teste de vôo mostrou-se altamente eficiente e sensível na determinação da qualidade de populações de *T. pretiosum*, em condições de laboratório. Segundo Bigler (1994), os testes de laboratório apresentam, dentre outras vantagens, o fato de serem relativamente baratos, rápidos, fáceis de serem repetidos sob condições padronizadas e possibilitarem comparações com padrões conhecidos. O teste de vôo apresenta todas essas características, além de ser de aplicação simples e permitir a reutilização de praticamente todo o material usado, conforme observação de Dutton & Bigler (1995). Os resultados obtidos com a utilização do modelo ESALQ, proposto na presente pesquisa, evidenciam que as modificações realizadas no modelo original, recomendado pela IOBC, levam a um menor percentual de erros e sugerem que o modelo ESALQ poderá vir a substituir o modelo convencional em testes de vôo para controle de qualidade de populações de *Trichogramma*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse trabalho sugerem que *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, é pouco afetado pelo endocruzamento, já que populações iniciadas com apenas um casal apresentaram excelente qualidade, mesmo após 25 gerações de criação em laboratório. Observou-se que, para esse parasitóide, o tamanho da população inicial não é um problema muito relevante, principalmente se esse tamanho elevar-se significativamente logo nas primeiras gerações. Entretanto, para maior vigor da população, durante períodos mais longos, é aconselhável que as colônias sejam iniciadas com um tamanho efetivo igual ou superior a 15 indivíduos (o que corresponde a 10 casais).

Quanto maior o número inicial de fundadores, menor será o coeficiente de endocruzamento (F) e mais lento será o seu aumento ao longo das gerações. Entretanto, é importante atentar para o fato de que deve-se considerar o número efetivo (N_e) e não o número total (N) de indivíduos. A manutenção de um valor de N_e , próximo de 1000 indivíduos, demonstrou ser suficiente para manter a colônia com uma qualidade aceitável, por 25 gerações de laboratório.

Com o reduzido efeito do endocruzamento sobre populações de *T. pretiosum*, a seleção de linhagens, para iniciar as criações de laboratório, torna-se fundamental, já que a linhagem selecionada irá formar a base do programa de criação e liberação (Smith, 1996) e geralmente observam-se diferenças em algumas características biológicas e comportamentais entre linhagens e mesmo entre indivíduos.

T. pretiosum demonstrou suportar uma alta taxa de endocruzamento ($F = 0,35$, para populações iniciadas com um casal), sem que reflexos degenerativos tenham sido evidenciados em suas características biológicas; entretanto, “estrangulamentos”

freqüentes no tamanho da população, durante a criação, podem elevar o valor de F a um nível que pode vir a comprometer a qualidade da colônia.

A introdução de parasitóides selvagens, para melhorar a qualidade de colônias mantidas por longos períodos em criações de laboratório, é uma prática dispensável para populações de *T. pretiosum*, em função da possibilidade de se iniciarem novas colônias, e mantê-las com qualidade satisfatória, mesmo se iniciadas com um pequeno número de indivíduos, e bem como, pela facilidade de multiplicação desse parasitóide em laboratório.

O parasitismo (número de ovos parasitados nas primeiras 48 h) demonstrou ser uma variável adequada para detecção da perda de qualidade devido ao efeito fundador, sendo recomendável, portanto, que esta seja sempre incluída nos programas de monitoramento da qualidade, em criações de *Trichogramma*. Já a variável deformação de asas, apesar de sua importância, do ponto de vista prático, não demonstrou ser representativa da qualidade da colônia, considerando aspectos relativos ao efeito do endocruzamento, tendo apresentado resultados muito variáveis ao longo da criação.

Dentre as variáveis estudadas, apenas a longevidade e o parasitismo demonstraram ser bons indicadores de qualidade, em colônias de laboratório. A porcentagem de emergência, a razão sexual e a porcentagem de deformação, não refletiram, com precisão, a qualidade das populações monitoradas.

Observou-se uma diferença significativa entre populações sexuadas (arrenótocas) e telítocas, com relação ao número de ovos parasitados. Enquanto que para as populações telítocas a média de parasitismo foi de 13 ovos, para as populações sexuadas este número foi o dobro, ou seja, 26 ovos.

Ficou evidente a fragilidade de populações telítocas e a maior habilidade das populações sexuadas em superar as adversidades que eventualmente surgem, ao longo das gerações, em criações massais. Isto implica na necessidade de um monitoramento mais criterioso da qualidade das populações telítocas em laboratório e um maior cuidado no processo de criação massal, para evitar consequências drásticas, como a perda de linhagens, ocorrida ao longo do presente trabalho. Os resultados obtidos indicam que, a seleção de linhagens, para utilização em criações massais, também é uma prática

fundamental no caso de espécies telítocas, já que das cinco populações utilizadas neste trabalho, duas conseguiram manter-se viáveis, por 23 gerações, mesmo sofrendo as mesmas adversidades das demais.

As populações telítocas utilizadas neste trabalho apresentavam telitoquia reversível, pois, após o tratamento das fêmeas com antibiótico (tetraciclina), na base de 100 mg para 1 ml de mel, conforme metodologia de Parra et al. (1991), observou-se o aparecimento de machos. A espécie de microorganismo envolvido não foi identificada, mas possivelmente deve tratar-se da alfa-proteobactéria do gênero *Wolbachia*, comumente encontrada em linhagens telítocas de várias espécies de *Trichogramma* (Stouthamer et al, 1993).

O teste de vôo mostrou-se altamente eficiente para determinação da qualidade de populações de *T. pretiosum*, em condições de laboratório. Os resultados obtidos com a utilização do modelo ESALQ, proposto na presente pesquisa, evidenciam que as modificações realizadas no modelo original, recomendado pela IOBC, levam a um menor percentual de erros e sugerem que o modelo ESALQ poderá vir a substituir o modelo convencional em testes de vôo para controle de qualidade de populações de *Trichogramma*.

Com base no teste de vôo detectou-se que populações de *T. pretiosum* iniciadas a partir de um casal, apresentaram qualidade inferior, com relação à porcentagem de parasitóides “voadores”, em comparação com populações iniciadas a partir de cinco e dez casais, indicando que o tamanho inicial da colônia de laboratório tem efeito significativo sobre sua qualidade ao longo das gerações de criação.

O teste de vôo é um método relativamente barato, rápido, de aplicação simples e preciso, devendo ser incluído como uma avaliação padrão para medições de qualidade em populações de *Trichogramma*.

Em programas de controle de qualidade de *T. pretiosum*, o monitoramento das populações de laboratório pode ser simplificado, deixando-se de avaliar cerca de sete variáveis biológicas, conforme recomendação da IOBC (Lenteren, 1994) e direcionando-se as avaliações apenas para as variáveis longevidade, parasitismo e atividade de vôo, neste caso, utilizando-se o modelo ESALQ.

7. CONCLUSÕES

- Criações de populações sexuadas de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, podem ser iniciadas com apenas um casal, e mantidas durante, pelo menos, 25 gerações de laboratório, sem que sua qualidade seja comprometida. Entretanto, para maior vigor da população, durante períodos mais longos, é aconselhável que estas sejam iniciadas com um tamanho efetivo igual ou superior a 15 indivíduos;
- Populações sexuadas de *T. pretiosum* apresentam reduzida carga genética, suportando altas taxas de endocruzamento, em criações de laboratório;
- A perda da qualidade, em função do tamanho inicial da colônia (efeito fundador), é detectada, em populações de *T. pretiosum*, através do parasitismo e da atividade de vôo;
- Populações sexuadas de *T. pretiosum* são mais rústicas e apresentam maior capacidade de parasitismo em relação às populações telíticas;
- As variáveis longevidade e parasitismo são os melhores indicadores biológicos da qualidade de populações de *T. pretiosum*, em criações de laboratório;
- O teste de vôo é um método eficiente para a determinação da qualidade de populações de *T. pretiosum*, em criações de laboratório,

- O modelo ESALQ é mais eficiente do que o modelo original, recomendado pela IOBC, para a avaliação da atividade de vôo de populações de *T. pretiosum*.
- Em programas de controle de qualidade de *T. pretiosum*, o monitoramento das populações de laboratório pode ser simplificado, com avaliações direcionadas apenas às variáveis longevidade, parasitismo e atividade de vôo, neste caso, utilizando-se o modelo ESALQ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AESCHLIMANN, J.P. Simultaneous occurrence of thelytoky and bisexuality in hymenopteran species, and its implications for the biological control of pests. **Entomophaga**, v. 35, n. 1, p. 3-5, 1990.
- BARTLETT, A.C. Establishment and maintenance of insect colonies through genetic control. In: KING, E.G.; LEPPA, N.C. (Eds.) **Advances and challenges in insect rearing**. Washington: USDA Agricultural Research Service, 1984_a. p. 1.
- BARTLETT, A.C. Genetic changes during insect domestication. In: KING, E.G.; LEPPA, N.C. (Eds.) **Advances and challenges in insect rearing**. Washington: USDA Agricultural Research Service, 1984_b. p. 2-8.
- BARTLETT, A.C. Guidelines for genetic diversity in laboratory colony establishment and maintenance. In: SINGH, P.; MOORE, R.F (Eds.) **Handbook of insect rearing**. Amsterdam: Elsevier, v. 1, 1985. p. 7-17.
- BIEMONT, C.; BOLETREAU, M. Hybridization and inbreeding effects on genome coadaptation in a haplo-diploid hymenoptera: *Cothanaspis boulandi* (Eucilidae). **Experientia**, v. 36, n. 1, p. 45-47, 1980.
- BIGLER, F. (Ed.). **Report of the sixth workshop of the IOBC global working group "Quality control of mass reared arthropods"**. Horsholm: IOBC, 1992. 26 p.

- BIGLER, F. Quality assessment and control in entomophagous insects used for biological control. **Journal of Applied Entomology**, v. 108, p. 390-400, 1989.
- BIGLER, F. Quality control in *Trichogramma* production. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S.A. (Eds.) **Biological control with egg parasitoids**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 93-112.
- BOWEN, W.R.; STERN, V.M. Effect of temperature on the production of males and sexual mosaics in a uniparental race of *Trichogramma semifumatum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 59, p. 823-834, 1966.
- CHAPMAN, T.W.; STEWART, S.C. Extremely high levels of inbreeding in a natural population of the free-living wasp *Acistrocerus antilope* (Hymenoptera: Vespidae: Eumeninae). **Heredity**, v. 76, n. 1, p. 65-69, 1996.
- CLARKE, G.M.; McKENSIE, L.J. Fluctuating asymmetry as a quality control indicator for insect mass rearing processes. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, n. 6, p. 2045-2050, 1992.
- CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P. Biology of *Trichogramma galloi* and *T. pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) reared in vitro and in vivo. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 89, n. 6, p. 828-834, 1996.
- CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P. Effects of constant and alternating temperatures on *Trichogramma galloi* Zucchi (Hym., Trichogrammatidae) biology II: Parasitism and longevity. **Journal of Applied Entomology**, v. 119, p. 667-670, 1995.

- CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P. Produção *in vitro* de parasitóides: criação de *Trichogramma galloi* e *T. pretiosum* no Brasil. In.: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Eds.) ***Trichogramma e o controle biológico aplicado***. Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 259-302.
- COOK, J.M. Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. **Heredity**, v. 71, p. 421-435, 1993.
- CROW, J.F.; KIMURA, M. **An introduction to population genetics theory**. New York: Harper and Row, 1970. 591 p.
- CROZIER, R.H. Evolutionary genetics of the Hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 22, p. 263-288, 1977.
- DUTTON, A.; BIGLER, F. Flight activity assessment of the egg parasitoid *Trichogramma brassicae* (Hym.: Trichogrammatidae) in laboratory and field conditions. **Entomophaga**, v. 40, n. 2, p. 223-233, 1995.
- ENKEGAARD, A.; REITZEL, J. 1991. A simple method for quality control of *Aphidoletes aphidimiza*, *Aphidius matricariae* and *Encarsia formosa*. In: WORKSHOP OF THE IOBC GLOBAL WORKING GROUP "QUALITY CONTROL OF MASS REARED ARTHROPODS", 5., Wageningen, 1991. **Proceedings**. Wageningen: OILB/IOBC, 1991. p. 102-110.
- FALCONER, D.S. **Introduction to quantitative genetics**. London: Oliver and Boyd, 1960. 365 p.
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 9 ed. São Paulo: Nobel, 1981. 205 p.

- HASSAN, S.A. Strategies to select *Trichogramma* species for use in biological control. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S.A. (Eds.) **Biological control with egg parasitoids**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 55-72.
- HASSAN, S.A. Seleção de espécies de *Trichogramma* para o uso em programas de controle biológico. In.: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Eds.) ***Trichogramma e o controle biológico aplicado***. Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 183-206.
- HASSAN, S.A. Selection of suitable *Trichogramma* strains to control the codling moth *Cydia pomonella* and the summer fruit tortrix moth *Adoxophyes orana*, *Pandemis heparana* (Lep.: Tortricidae). **Entomophaga**, v. 34, n. 1, p. 19-27, 1989.
- HASSAN, S.A. The mass rearing and utilization of *Trichogramma* to control lepidopterous pests: achievements and outlook. **Pesticide Science**, v. 37, p. 387-391, 1993.
- HASSAN, S.A.; GUO, M.F. A simple method to control the quality of mass reared egg parasites of the genus *Trichogramma*. In: WORKSHOP OF THE IOBC GLOBAL WORKING GROUP "QUALITY CONTROL OF MASS REARED ARTHROPODS", 5., Wageningen, 1991. **Proceedings**. Wageningen: OILB/IOBC, 1991. p. 127-137.
- HAVRON, A.; ROSEN, D.; RÖSSLER, Y.; HILLEL, J. Selection on the male hemizygous genotype in arrhenotokous insects and mites. **Entomophaga**, v. 32, n. 3, p. 261-268, 1987.
- JOSLYN, D.J. Maintenance of genetic variability in reared insects. In.: KING, E.G.; LEPLA, N.C. (Eds.) **Advances and challenges in insect rearing**. Washington: USDA Agricultural Research Service, 1984. p. 20-29.

LAING, J.E.; BIGLER, F. Quality control of mass-produced *Trichogramma* species. In: WORKSHOP OF THE IOBC GLOBAL WORKING GROUP "QUALITY CONTROL OF MASS REARED ARTHROPODS", 5., Wageningen, 1991. **Proceedings**. Wageningen: OILB/IOBC, 1991. p. 111-118.

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

LENTEREN, J.C. van. Designing and implementing quality control of beneficial insects: towards more reliable biological pest control. **Sting: Newsletter on Biological Control in Greenhouses**, n. 14, p 3-24, 1994.

LENTEREN, J.C. van. Quality control of natural enemies: Hope or illusion? In: WORKSHOP OF THE IOBC GLOBAL WORKING GROUP "QUALITY CONTROL OF MASS REARED ARTHROPODS", 5., Wageningen, 1991. **Proceedings**. Wageningen: OILB/IOBC, 1991. p. 1-14.

LENTEREN, J.C. van; WOETS, J. Biological and integrated pest control in greenhouses. **Annual Review of Entomology**, v. 33, p. 239-269, 1988.

LENTEREN, J.C.van. Improving the reliability of biological control by applying quality control of natural enemies. **Bulletin OILB-SROP**, v. 16, n. 2, p. 85-88, 1992_a.

LENTEREN, J.C.van. Quality control for natural enemies used in greenhouses. **Bulletin OILB-SROP**, v. 16, n. 2, p. 89-92, 1992_b.

- LEPPLA, N.C.; ASHLEY, T.R. Quality control in insect mass production: a review and model. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v. 35, n. 4, p. 33-44, 1989.
- LEPPLA, N.C.; FISHER, W.R. Total quality control in insect mass production for insect pest management. **Journal of Applied Entomology**, v. 108, p. 452-461, 1989.
- LI, C.C. **Population genetics**. Chicago: University of Chicago Press, 1955. 366 p.
- LIU, F.; SMITH, S.M. Genetic consequences of mass-rearing *Trichogramma minutum*. <http://www.sheridan.com/entsoc/abs/bc/E3120.html>. (08 Mai. 1999).
- LIU, F.; SMITH, S.M. Measurement and selection of parasitoid quality for biological control. **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, p. 3-13, 2000.
- LOPES, J.R.S. Estudos bioetológicos de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hym.: Trichogrammatidae) para o controle de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lep.: Pyralidae). Piracicaba, 1988. 141 p. Dissertação (M.S.). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MACKAUER, M. Genetic aspects of insect production. **Entomophaga**, v. 17, n. 1, p. 27-48, 1972.
- MACKAUER, M. Genetic problems in the production of biological control agents. **Annual Review of Entomology**, v. 21, p. 369-385, 1976.
- MASON, L.J.; PASHLEY, D.P.; JOHNSON, S.J. The laboratory as an altered habitat: phenotypic and genetic consequences of colonization. **Florida Entomologist**, v. 70, n. 1, p. 49-58, 1987.

NOLDUS, L.P.J.J. Semiochemicals, foraging behaviour and quality of entomophagous insects for biological control. **Journal of Applied Entomology**, v. 108, p. 425-451, 1989.

PARRA, J.R.P. **Criação massal de inimigos naturais**. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS, 2. Campinas: Fundação Cargill, 1992. p. 5-20.

PARRA, J.R.P. Técnicas de criação de *Anagasta kuehniella*, hospedeiro alternativo para produção de *Trichogramma*. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Eds.) **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 121-150.

PARRA, J.R.P.; SCHIMIDT, F.G.V.; ZUCCHI, R.A. Antibióticos utilizados para obtenção de machos de *Trichogramma*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 13., Recife, 1991. **Resumos**. Recife: SEB/UFRPE, 1991. p. 260.

PINTO, J.D. **Systematics of the North American species of *Trichogramma* westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae)**. Washington: Allen Press, 1998. 287 p.

PREZOTTI, L.; PARRA, J.R.P.; VENCOSK, R.; CRUZ, I.; COELHO, A.S.G. Effect of the size of the founder population on the quality of sexual populations of *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, in laboratory. **Biological Control**. /No prelo/

ROUSH, R.T. Genetic considerations in the propagation of entomophagous species. In: BAKER, R.R.; DUNN, P.E. (Eds.) **New directions in biological control: alternatives for supressing agricultural pests and diseases**. New York: Alan R. Liss., 1990. p. 373-387.

- ROUSH, R.T. Genetic variation in natural enemies: critical issues for colonization in biological control. In: MACKAUER, M.; EHRLER, L.E.; ROLLANDS, J. (Eds.) **Critical issues in biological control**. London: Intercept, 1989. p. 263-287.
- ROUSSE, D.R.; ESLAMI, J.; PERIQUET, G. Reproductive strategy of *Dinarmus vagabundus* Timb. (Hym.: Pteromalidae): real sex ratio, sequence of emitting diploid and haploid eggs and effects of inbreeding on progeny. **Journal of Applied Entomology**, v. 106, n. 3, p. 276-285, 1988.
- SMITH, S.M. Biological control with *Trichogramma*: advances, successes and potential of their use. **Annual Review of Entomology**, v. 41, p. 375-406, 1996.
- SORATI, M.; NEWMAN, M.; HOFFMANN, A.A. Inbreeding and incompatibility in *Trichogramma* nr. *brassicae*: evidence and implications for quality control. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 78, n. 3, p. 283-290, 1996.
- STEIN, C.P.; PARRA, J.R.P. Uso da radiação ultra-violeta para inviabilizar ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) visando estudos com *Trichogramma*. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 16, n. 1, p. 229-234, 1987.
- STOUTHAMER, R. The use of sexual versus assexual wasps in biological control. **Entomophaga**, v. 38, n. 1, p. 3-6, 1993.
- STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J.A.J.; LUCK, R.F.; WERREN, J.H. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. **Nature**, v. 361, p. 66-69, 1993.
- STOUTHAMER, R.; KAZMER, D.J. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene in *Trichogramma* wasps. **Heredity**, v. 73, p. 317-327, 1994.

- STOUTHAMER, R.; PINTO, L.D.; PLATNER, G.R.; LUCK, R.F. Taxonomic status of thelytokous forms of *Trichogramma*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 83, p. 475-581, 1990.
- TERZIAN, C.; BIÉMONT, C. The founder effect theory: quantitative variation and mdg-1 mobile element polymorphism in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. **Genetica**, v. 76, p. 53-63, 1988.
- UNRUH, T.R.; WHITE, W.; GONZÁLEZ, D.; GORDH, G.; LUCK, R.F. Heterozygosity and effective size in laboratory populations of *Aphidius ervi* (Hym.: Aphidiidae). **Entomophaga**, v. 28, n. 3, p. 245-258, 1983.
- WAAGE, J.K.; CARL, R.P.; MILLS, N.J.; GREATHEAD, D.J. Rearing entomophagous insects. In: SINGH, P.; MOORE, R.F (Eds.) **Handbook of insect rearing**. Amsterdam: Elsevier, v. 1., 1985. p. 45-66.
- WAJNBERG, E. Quality control of mass-reared arthropods: a genetical and statistical approach. In: WORKSHOP OF THE IOBC GLOBAL WORKING GROUP "QUALITY CONTROL OF MASS REARED ARTHROPODS", 5., Wageningen, 1991. **Proceedings**. Wageningen: OILB/IOBC, 1991. p. 15-25.
- WRIGHT, S.W. **Evolution and the genetics of populations: experimental results and evolutionary deductions**. Chicago: University of Chicago Press, v. 3, 1977. 613 p.