**CRIAÇÃO “*IN VITRO*” DE *Bracon hebetor* SAY, 1857 (HYM.:
BRACONIDAE): AVALIAÇÕES NUTRICIONAIS PARA O
APRIMORAMENTO DE DIETAS ARTIFICIAIS**

SANDRA REGINA MAGRO

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.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Janeiro – 2005

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

Magro, Sandra Regina

Criação "*in vitro*" de *Bracon hebetor* Say, 1857 (Hym.: Braconidae): avaliações nutricionais para o aprimoramento de dietas artificiais / Sandra Regina Magro. - - Piracicaba, 2005.
109 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.
Bibliografia.

1. Biologia animal 2. Controle biológico (Fitossanidade) 3. Criação animal
4. Dieta artificial 5. Fisiologia animal 6. Insetos parasitas 7. Nutrição animal I. Título

CDD 595.798

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis"

(Fernando Pessoa)

Aos meus primeiros "mestres" de Entomologia, Professores Doutores da Universidade Estadual de Londrina, Amarildo Pasini, Ayres de Oliveira Menezes Jr., Maurício Ursi Ventura e Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves, que me motivaram os primeiros passos e o primeiro interesse nessa inesgotável área de estudos, **dedico**.

Àqueles que jamais se cansaram de me incentivar, valorizar e de transmitir seus conhecimentos. Àqueles que, com seu exemplo de vida e dedicação me motivaram a ser a pesquisadora que hoje me tornei, meus amigos e orientadores Professor Dr. Parra e Dra. Beatriz Corrêa-Ferreira, meus mais profundos agradecimentos e a quem **ofereço** este trabalho.

À minha família, em especial a meus pais, Nilce e Raphael, presença constante em minha vida, sinal de força, estímulo e incentivo. A vocês que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui. A vocês que me ensinaram a viver e que são a razão da minha vida, a minha **homenagem**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo caminho e pela oportunidade;

Ao Dr. José Roberto Postali Parra, Professor Titular do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola e Diretor da Esalq-USP, pela orientação acadêmica, pelas valiosas discussões e constante incentivo, pelo exemplo de dedicação e indiscutível ética e profissionalismo;

Ao Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudo;

Aos Drs. Fernando L. Cônsoli e José Maurício Simões Bento, professores do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, pela amizade e relevante colaboração para a realização desta pesquisa;

A todos os Professores e Funcionários do Departamento que, indiscutivelmente, colaboraram para minha formação e capacitação para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Professor Dr. Flávio Henrique Caetano (Unesp – Campus de Rio Claro) e aos técnicos Gerson Mello Souza, Antônio e Mônica pela disponibilidade em ajudar, pela amizade e convivência e pelos conhecimentos repassados;

Ao Professor Dr. Elliot W. Kitajima, Coordenador do Núcleo de Apoio à Pesquisa – Microscopia Eletrônica Aplicada à Agronomia (NAP-MEPA) da Esalq / USP), ao Dr. Francisco Tanaka, ao MSc Pedro de Tarso e ao Biólogo e técnico Renato Solaroli, enfim, toda a equipe do laboratório de Microscopia, pelos ensinamentos transmitidos, pela dedicação, ajuda e apoio para a condução dos trabalhos com microscopia eletrônica;

Ao Dr. Walter Ribeiro Terra e Dra. Clélia Ferreira, Professores do Instituto de Química/USP, Laboratório de Bioquímica de Insetos, pela disponibilidade em ajudar, pelos ensinamentos e, sobretudo, pela amizade e respeito;

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Insetos: Luiza, Nilde, Cris, Xan, Pepê, Ciça, Renata, Blanes, Kaques, Alex, Lucas, Thais, Camila, Mig e Marisa, Plínio e Sandro pela amizade e convívio e especial agradecimento ao Dr. Alcides Batista Dias Jr. e Dra. Adriana Rios Lopes pelo auxílio, paciência e amor com que me trataram e ajudaram na condução dos trabalhos com enzimas digestivas;

À Dra Beatriz A. da Glória, Professora do Departamento de Ciências Biológicas (Esalq/USP), Laboratório de Anatomia Vegetal, e à sua técnica Marli K. M. Soares, pelo auxílio e orientação;

Ao Dr Márcio de Castro Silva Filho, Professor do Departamento de Genética e a sua equipe, em especial às Dra. Patrícia Pompermayer, Márcia Ometto de Mello Alves José e Juliana Dantas, pela preciosa colaboração e pela acolhida em seu Laboratório;

À Dra. Beatriz Spalding Corrêa-Ferreira, pesquisadora da Embrapa-Soja, pela constante presença e incentivo;

À Bug Agentes Biológicos, ao Danilo Pedrazzoli, Diogo Carvalho, Heraldo Negri de Oliveira e Peter Kasten Jr., pela incansável ajuda e amizade nestes quatro anos de pesquisa;

A todos os amigos do curso, em especial à equipe do Laboratório de Biologia de Insetos: Neide Graciano Zério, Amarildo Pasini, Dori Nava, Maria Aparecida Bitencourt Leão, Ana Lia P. Pedrazzoli, Priscila Fortes, Mariuxi Lorena Torres, Ademir Diniz, José Francisco Garcia, Nívia Dias, Cristiane Nardi, Gilberto Domingues, Adriana Marques, Tatiana Ibelli, Marina Martins, Flávia de Moura M. Bento, Danilo José Libardi, André Signoretti e André H. Costa, Daniel J. Cerântola, Eliane Grisoto e Marjorie Rodrigues, pela companhia, amizade e colaboração;

À Erica Frazão, Ranyse Querino, Érica Crêspo e Teresinha Giustolin; Rogério e Cia, Parmito e Jô, Gregório e Aline, Marco-Tati e aos “Sacerdotes”, amigos de todos os dias que, com descontração e companheirismo, muito me ajudaram;

Aos amigos-irmãos: Adriana, Jaime, Júnior e Inês. O agradecimento é coletivo, mas o sentimento é singular. “Gracias a la vida” por conhecer e conviver com vocês; “Gracias” pela vida de vocês;

A Luciano Ribeiro, meu marido, presença forte e encorajadora, ajuda e compreensão incondicionais e amor gratuito, obrigada; e a sua família ‘Seo’ José, ‘dona’ Benete, Michele e Emerson, pela maravilhosa convivência e respeito;

Aos meus pais, Raphael e Nilce. Aos meus irmãos(as) e cunhados(as) Sonia e Samuel, Berenice e Paulo, Mauro e Célia, Solange e Luiz, Ezylda e Gilberto, Edson e Mirian, Adriana e Fernando e a todos meus sobrinhos: Priscila, Luana e Rafael; Bárbara e Débora; Marcos, Marcelo e Rosana; Lucas, Lorena e Giovana; Brenda, Paloma e Larissa; Thiago e Isabela por fazerem parte da minha vida e por enchê-la de alegria e satisfação. E à Juliana (também minha sobrinha) por me ensinar, a tempo, as mágicas palavras “*inutila truncat*”, que tanto me ajudaram;

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram ou foram presença motivadora durante esta etapa de minha vida, obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xvi
SUMMARY	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Criação “ <i>in vitro</i> ” de parasitóides	3
2.2 Eficiência de parasitóides criados “ <i>in vitro</i> ”	6
2.3 Necessidades nutricionais dos insetos e composição básica de dietas artificiais	7
2.4 Fatores que podem influenciar o desenvolvimento “ <i>in vitro</i> ”	10
2.5 Formação de casulo e composição da seda	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Manutenção da população de <i>Bracon hebetor</i> Say (Hym. Braconidae)	14
3.2 Preparo da dieta artificial para criação do parasitóide	14
3.3 Estudo da glândula de seda de <i>B. hebetor</i>	15
3.3.1 Extração das glândulas e quantificação de proteína	15
3.3.2 Ultramorfologia da glândula salivar do ectoparasitóide larval <i>B. hebetor</i> criado “ <i>in vivo</i> ” e “ <i>in vitro</i> ”	16
3.3.3 Ultra-estrutura da glândula salivar do ectoparasitóide larval <i>B. hebetor</i> criado “ <i>in vivo</i> ” e “ <i>in vitro</i> ”	17
3.3.4 Teste histoquímico	17
3.4 Seleção do hospedeiro alternativo e aspectos nutricionais	18

3.4.1 Exigências nutricionais do ectoparasitóide <i>B. hebetor</i> - aminograma comparado do hospedeiro e da dieta artificial	18
3.4.2 Histoquímica do conteúdo intestinal do ectoparasitóide larval <i>B. hebetor</i> criado “ <i>in vivo</i> ” e “ <i>in vitro</i> ”	18
3.4.3 Caracterização das enzimas digestivas	19
3.4.3.1 Preparo do homogeneizado intestinal de <i>B. hebetor</i>	19
3.4.3.2 Ensaio enzimáticos	20
3.4.3.3 Identificação das proteinases intestinais em <i>B. hebetor</i> – Cromatografias	22
3.4.3.4 Inibidores de proteinases presentes na hemolinfa de lepidópteros	23
3.5 Avaliação dos ínstares larvais e do consumo de alimento para <i>B. hebetor</i>	24
3.6 Comparação de dietas artificiais para a criação de <i>B. hebetor</i>	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Estudo da glândula de seda de <i>Bracon hebetor</i> Say (Hym.: Braconidae).....	29
4.1.1 Extração das glândulas e quantificação de proteína	29
4.1.2 Ultramorfologia da glândula salivar e do aparelho digestivo do ectoparasitóide larval <i>B. hebetor</i> criado “ <i>in vivo</i> ” e “ <i>in vitro</i> ”	36
4.1.3 Ultra-estrutura e histoquímica da glândula salivar do ectoparasitóide larval <i>B. hebetor</i> criado “ <i>in vivo</i> ” e “ <i>in vitro</i> ”.....	40
4.2 Seleção do hospedeiro alternativo e aspectos nutricionais	51
4.2.1 Exigências nutricionais do ectoparasitóide <i>B. hebetor</i> - aminograma comparado do hospedeiro e da dieta artificial	51
4.2.2 Histoquímica do conteúdo intestinal do ectoparasitóide larval <i>B. hebetor</i> criado “ <i>in vivo</i> ” e “ <i>in vitro</i> ”	56
4.3 Caracterização das enzimas digestivas de <i>B. hebetor</i>	59
4.3.1 Ensaio enzimáticos	59
4.3.2 Identificação das proteinases intestinais em <i>B. hebetor</i> – Cromatografias	60
4.3.3 Inibidores de proteinases presentes na hemolinfa de lepidópteros	68
4.4 Avaliação dos ínstares larvais e do consumo de alimento para <i>B. hebetor</i>	73
4.5 Comparação de dietas artificiais para a criação de <i>B. hebetor</i>	79
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
6 CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Condições de ensaio e métodos utilizados na determinação das atividades enzimáticas de homogeneizados intestinais de <i>Bracon hebetor</i> criado sobre o hospedeiro natural <i>Anagasta kuehniella</i> e em dieta artificial	21
2 Composição das dietas artificiais utilizadas para criação “ <i>in vitro</i> ” de <i>Bracon hebetor</i>	27 e 28
3 Proporção relativa (%) de aminoácidos presentes na hemolinfa de <i>Anagasta kuehniella</i> (hospedeiro natural), <i>Diatraea saccharalis</i> , <i>Anticarsia gemmatilis</i> , <i>Heliothis virescens</i> , <i>Spodoptera frugiperda</i> (hospedeiros alternativos) e dieta artificial, para a criação de <i>Bracon hebetor</i>	52
4 Duração (dias) e viabilidade do ciclo total (ovo-adulto) e porcentagem de formação de casulos de <i>Bracon hebetor</i> , criado em diferentes hospedeiros/substratos com variação na concentração de proteína (temperatura de 25±2°C; UR do ar de 70±10% e fotofase de 14 horas)	56
5 Atividade de diferentes enzimas digestivas no intestino médio de <i>Bracon hebetor</i>	60
6 Efeito da hemolinfa de diferentes espécies de lepidópteros (lagartas), na atividade enzimática tripsina (ZFRMCA), em homogeneizados intestinais de <i>Bracon hebetor</i> criado sobre o hospedeiro natural, <i>Anagasta kuehniella</i> e em dieta artificial	68
7 Efeito da hemolinfa de diferentes espécies de lepidópteros (lagartas), na atividade enzimática tripsina (ZGGMCA), na presença de tripsinas bovina e purificadas de <i>Periplaneta americana</i>	70

8	Concentração de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) na hemolinfa de seis espécies de lepidópteros (método de Bradford, 1976)	73
9	Comprimento da mandíbula (intervalo de variação) e razão de crescimento de <i>Bracon hebetor</i> criado em dieta artificial e sobre o hospedeiro natural (temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas)	77
10	Efeito do componente de inseto utilizado na dieta sobre a viabilidade do ciclo total (ovo-adulto) e a formação de casulos em <i>Bracon hebetor</i> (temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas)	79
11	Viabilidade (%) das fases de ovo, larva, pupa e ciclo total e porcentagem de formação de casulo de <i>Bracon hebetor</i> criado em diferentes dietas artificiais e sobre o hospedeiro natural <i>Anagasta kuehniella</i> (temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas)	84
12	Viabilidade (%) das fases de ovo, larva, pupa e ciclo total e porcentagem de formação de casulo de <i>Bracon hebetor</i> criado em diferentes dietas artificiais e sobre o hospedeiro natural, <i>Anagasta kuehniella</i> (temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas)	85
13	Duração (dias) das fases de ovo, larva, pupa e ciclo total de <i>Bracon hebetor</i> criado em diferentes dietas artificiais e sobre o hospedeiro natural, <i>Anagasta kuehniella</i> (temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas).....	91
14	Peso (mg) de pupas de <i>Bracon hebetor</i> criado em diferentes dietas artificiais e sobre o hospedeiro natural, <i>Anagasta kuehniella</i> (72 horas após a liberação da mecônia) (temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas)	91
15	Longevidade (dias) de adultos de <i>Bracon hebetor</i> criado em diferentes dietas artificiais e sobre o hospedeiro natural, <i>Anagasta kuehniella</i> (temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas)	92

LISTA DE FIGURAS

	Página
1A Desenvolvimento de <i>Bracon hebetor</i> em hospedeiro natural e em dieta artificial (esquerda e direita, respectivamente) (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas). A e B com 72-76 h; C e D com 76-80 h; E e F com 80-84 h; G e H com 84-88 h (aumento 7X)	31
1B Desenvolvimento de <i>Bracon hebetor</i> em hospedeiro natural e em dieta artificial (esquerda e direita, respectivamente) (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas). A e B com 88-92 h; C e D com 92-96 h; E e F com 96-100 h; G e H com 100-104 h (aumento 7X)	32
1C Desenvolvimento de <i>Bracon hebetor</i> em hospedeiro natural e em dieta artificial, (esquerda e direita, respectivamente) (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas). A e B com 104-108 h; C e D com 108-112 h; E e F com 112-116 h; G e H com 116-120 h (aumento 7X)	33
1D Desenvolvimento de <i>Bracon hebetor</i> em hospedeiro natural e em dieta artificial (esquerda e direita, respectivamente) (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas). A e B com 120-124 h - seta indica mecônia; C e D com 124-128 h; E com 128-132 h - seta indica seda; F com 132-136 h (aumento 7X)	34
1E Desenvolvimento de <i>Bracon hebetor</i> em hospedeiro natural e em dieta artificial (esquerda e direita, respectivamente) (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas). A e B com 144-148 h (aumento 7X) - seta indica a mecônia; C e D com 246 horas (aumento 18X)	35

2	Quantificação de proteína das glândulas salivares de <i>Bracon hebetor</i> criado sobre o hospedeiro natural, <i>Anagasta kuehniella</i> ("in vivo") e em dieta artificial ("in vitro"), pelo método de Bradford (1976), durante o período de 72 a 148 horas	36
3	Intestino e glândulas salivares de <i>Bracon hebetor</i> criado no hospedeiro natural. A) i- intestino; gs- glândula de seda; B) R- reservatório; C) tm- túbulos de Malpighi. Observação em microscopia eletrônica de varredura (MEV), aumentos A=50X; B e C=35X	38
4	Esquema da glândula salivar de <i>Bracon hebetor</i> . ds- ducto simples (ou lateral); ds2- ducto simples (ou lateral); R- reservatório; b- bifurcação e rs- região secretora. Aumento 50X.....	39
5	Região proximal do ducto simples (região de armazenamento) (A) e região secretora (B) da glândula de seda de <i>Bracon hebetor</i> criado no hospedeiro natural <i>Anagasta kuehniella</i> . Idade 96-100 horas (corte semi-fino). À direita observações em microscópio óptico, à esquerda esquema da glândula de seda	43
6	Região proximal do ducto simples (região de armazenamento) da glândula salivar de <i>Bracon hebetor</i> criado no hospedeiro natural, <i>Anagasta kuehniella</i> . Idade 96-100 horas (corte ultra-fino). A) N-núcleo; nu-nucléolo; mi-microvilosidades, mb-membrana basal; S-secreção; B) N-núcleo; nu-nucléolo; CG-complexo de Golgi; C) M-mitocôndria; RER-retículo endoplasmático rugoso. Observações em microscópio eletrônico de transmissão (MET).....	44
7	Região secretora da glândula salivar de <i>Bracon hebetor</i> criado no hospedeiro natural, <i>Anagasta kuehniella</i> . Idade 96-100 horas (corte ultra-fino). A) mb-membrana basal; B) N-núcleo; nu-nucléolo; CG-complexo de Golgi; C) mi-microvilosidades; S-secreção; D) m-microvilosidades. Observações em microscópio eletrônico de transmissão (MET).....	45

8 Região proximal do ducto simples (região de armazenamento) (A) e região secretora (B) da glândula salivar de <i>Bracon hebetor</i> criado em dieta artificial. Idade 120-124 horas (corte semi-fino). À direita observações em microscópio óptico, à esquerda esquema da glândula de seda	46
9 Região proximal do ducto simples (região de armazenamento) da glândula salivar de <i>Bracon hebetor</i> criado em dieta artificial. Idade 120-124 horas (corte ultra-fino). A) N-núcleo; nu-nucléolo; mb-membrana basal; B) N-núcleo; nu-nucléolo; mi-microvilosidades; C) RER-retículo endoplasmático rugoso; mb-membrana basal. Observações em microscópio eletrônico de transmissão (MET)	47
10 Região secretora da glândula salivar de <i>Bracon hebetor</i> criado em dieta artificial. Idade 120-124 horas (corte ultra-fino). A) N-núcleo; nu-nucléolo; CG-complexo de Golgi; mb-membrana basal; B) RER-retículo endoplasmático rugoso; CG-complexo de Golgi; C) RER-retículo endoplasmático rugoso; M-mitocôndria; CG-complexo de Golgi. Observações em microscópio eletrônico de transmissão (MET)	48
11 Cortes transversais, em microscópio óptico, da glândula de seda de <i>Bracon hebetor</i> criado no hospedeiro natural, contrastados com Azul de Bromofenol. A- região de armazenamento, BCD- secretora	49
12 Cortes transversais, em microscópio óptico, da glândula de seda de <i>Bracon hebetor</i> criado em dieta artificial, contrastados com Azul de Bromofenol. A e B – respectivamente região de armazenamento e secretora	50
13 Correlação entre a quantidade de proteína existente em hospedeiros alternativos, natural e dieta artificial e a viabilidade do ciclo total de <i>Bracon hebetor</i> (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas)	54
14 Correlação entre a quantidade de proteína existente em hospedeiros alternativos, natural e dieta artificial e a porcentagem de parasitóides (<i>Bracon hebetor</i>) que formaram casulo (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas)	55

15 Cortes do intestino médio de <i>Bracon hebetor</i> criado “ <i>in vivo</i> ” (A) e “ <i>in vitro</i> ” (B). Cortes C e D contrastados para proteína e E e F contrastados para lipídios, respectivamente para insetos criados “ <i>in vivo</i> ” e “ <i>in vitro</i> ”. As setas indicam as vesículas de lipídios	58
16 Cromatografia de troca iônica em coluna High Q de homogeneizado intestinal de <i>Bracon hebetor</i> criado sobre o hospedeiro natural. Substrato para proteinase total: CasFITC	64
17 Cromatografia de troca iônica em coluna High Q de homogeneizado intestinal de <i>Bracon hebetor</i> criado sobre o hospedeiro natural. Substrato para tripsina: ZFRMCA.....	65
18 Cromatografia de troca iônica em coluna High Q de homogeneizado intestinal de <i>Bracon hebetor</i> criado na dieta artificial. Substrato para proteinase total: CasFITC	66
19 Cromatografia de troca iônica em coluna High Q de homogeneizado intestinal de <i>Bracon hebetor</i> criado na dieta artificial. Substrato para tripsina: ZFRMCA	67
20 Atividade enzimática de homogeneizados intestinais de <i>Bracon hebetor</i> criado sobre o hospedeiro natural (<i>Anagasta kuehniella</i>) e em dieta artificial, resultante de cromatografia Resource Q, submetidos ao substrato ZGGR-Mca – específico para enzimas do tipo tripsina	71
21 Atividade enzimática de homogeneizados intestinais de <i>Bracon hebetor</i> criado sobre o hospedeiro natural (<i>Anagasta kuehniella</i>) e em dieta artificial, resultante de cromatografia hidrofóbica Resource_Phe, submetidos ao substrato ZGGR-Mca – específico para enzimas do tipo tripsina	72
22 Mandíbulas de <i>Bracon hebetor</i> , utilizadas para determinação dos instares de larvais do parasitóide. Preparação fenol e Hoyer's, observações em microscópio óptico. Detalhe indica a medida em μm	75

23 Médias dos comprimentos (μm) das mandíbulas de <i>Bracon hebetor</i> , em diferentes tempos de amostragem, para insetos criados “ <i>in vivo</i> ” (A) e “ <i>in vitro</i> ” (B) (temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas). O conjunto de dados, dentro das elipses, representam os respectivos instares larvais	76
24 Ganho acumulado de peso (%) durante o desenvolvimento larval de <i>Bracon hebetor</i> criado em dieta artificial (“ <i>in vitro</i> ”) e sobre o hospedeiro natural (“ <i>in vivo</i> ”) (temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas).....	78
25 Dieta artificial para a criação de <i>Bracon hebetor</i> . A e B – com e sem corante “Amarante”, respectivamente	78
26 Fenograma obtido da análise de agrupamento para dietas e hospedeiro natural (controle) testados para criação de <i>Bracon hebetor</i> . Fenograma UPGMA por Distância Euclidiana Média	83
27 Fenograma obtido da análise de agrupamento para dietas e hospedeiro natural (controle) testados para criação de <i>Bracon hebetor</i> . Fenograma UPGMA por Distância Euclidiana Média	87
28 Pupas de <i>Bracon hebetor</i> criado sobre o hospedeiro natural (A), dieta artificial básica (B) e em dieta enriquecida com proteína e lipídios (C).....	93

ABREVIATURAS

PTC	1-phenyl-2-thiourea
Caseína-FITC	caseína fluoresceína isotiocianato
SBTI	Soybean trypsin inhibitor
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
DTT	DL-dithiothreitol
TLCK	N- α -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone
E-64	trans-epoxysuccinyl-L-leucyl-amido(4-guanidino butane
ZGGRMCA	carbobenzoxi-Gly-Gly-Arg-7-amido-4-metil cumarina
ZFRMCA	carbobenzoxi-Phe-Arg-7-amido-4-metil cumarina
BAPA	alfa-N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
Suc-AAF-MCA	Suc-Ala-Ala-Phe-7-amido-4-metil cumarina
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de Amônio
Substrato específico para cisteína proteinase	ϵ -NH ₂ -csb-C-MCA.

**CRIAÇÃO “*IN VITRO*” DE *Bracon hebetor* SAY, 1857 (HYM.:
BRACONIDAE): AVALIAÇÕES NUTRICIONAIS PARA O
APRIMORAMENTO DE DIETAS ARTIFICIAIS**

Autora: SANDRA REGINA MAGRO

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO POSTALI PARRA

RESUMO

Baseando-se em estudos da fisiologia do parasitóide larval *Bracon hebetor* Say (Hym.: Braconidae), incluindo-se análises morfológicas, ultra-estruturais e químicas das glândulas salivares além de estudos nutricionais, objetivou-se, nesse trabalho, definirem-se as exigências nutricionais do parasitóide, visando aprimorar uma dieta artificial para sua criação “*in vitro*”, que possibilitasse elevada viabilidade do ciclo total e alta porcentagem de formação de casulos em pupas. Assim, nos estudos iniciais, verificaram-se três instares para o desenvolvimento larval de *B. hebetor*, de forma semelhante ao inseto criado “*in vivo*”, porém com a duração da fase larval alongada quando o inseto foi criado em dieta artificial. Observações em microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV) demonstraram não haver deformação nas glândulas de seda dos insetos criados na dieta artificial. Foram encontradas baixas concentrações de proteína nas glândulas de seda dos insetos criados “*in vitro*”,

justificando assim a ausência de casulos para aqueles criados na dieta artificial (40% de holotecidos pupais de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lep.: Pyralidae), 20% de gema de ovo, 20% leite semi-desnatado, 10% de mistura de sais de Neisenheimer e 10% de água), que é menos rica em proteínas do que o hospedeiro natural. Estudos subsequêntes avaliaram a importância de componentes protéicos e lipídicos; assim, dentre os componentes protéicos testados, holotecidos pupais de *D. saccharalis* (65%) e soroalbumina (3%) foram os que proporcionaram melhores resultados para a criação “*in vitro*” de *B. hebetor* e, dentre os ácidos graxos, o concentrado de lipídios e o ácido linolênico proporcionaram incrementos significativos nas viabilidades larval e do ciclo total (ovo-adulto). A associação de holotecidos pupais de *D. saccharalis* (65%) e ácido linolênico (1%) levaram a um aumento de cerca de 120% na capacidade de formação de casulos, tendo como comparação aqueles insetos criados sobre a dieta básica, além de comparáveis taxas de parasitismo e paralisação do hospedeiro. Quando criado em dieta artificial (com holotecidos pupais de *D. saccharalis*), larvas de *B. hebetor* desenvolveram diferentes classes de tripsinas, distintas daquelas que são encontradas quando criada no hospedeiro natural; tripsina foi a principal enzima digestiva para o parasitóide criado nos dois sistemas (“*in vivo*” e “*in vitro*”). Como hemolinfas de lagartas de lepidópteros podem apresentar inibidores de tripsinas, devem ser utilizadas, em dieta artificial para *B. hebetor*, hemolinfas que não afetem a atividade enzimática do parasitóide. Assim, tem-se que a dieta aprimorada para criação de *B. hebetor* (65% de holotecidos pupais de *D. saccharalis*, 8,5% de hidrolisado de lactoalbumina, 8,5% de soro fetal bovino, 1% de ácido linolênico, 18% de gema de ovo), corrigiu inadequações encontradas quando o inseto foi criado na dieta básica, ou seja: insuficiente quantidade de proteína nas glândulas de seda; insuficiente produção de seda; reduzidas viabilidades da fase larval e do ciclo total e alongamento da duração do ciclo total. Desta forma, *B. hebetor* foi criado com sucesso em dieta artificial com 65% de holotecidos pupais e 1% de ácido linolênico, com cerca de 70% de viabilidade do ciclo total e com 70% de formação de casulos.

**“*IN VITRO*” REARING OF *Bracon hebetor* SAY, 1857 (HYM.:
BRACONIDAE): NUTRITIONAL EVALUATIONS FOR
IMPROVEMENT OF ARTIFICIAL DIETS**

Author: SANDRA REGINA MAGRO

Adviser: Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO POSTALI PARRA

SUMMARY

This work is intended to define the nutritional requirements of the larval parasitoid *Bracon hebetor* Say (Hym.: Braconidae) in order to improve an artificial diet for *in vitro* rearing with high survivorship rates and normal cocoon spinning behaviour, and several approaches were used to achieve these goals. Therefore, we analysed the parasitoid development, aspects of its digestive physiology and morphological and chemical changes induced on the salivary glands when *B. hebetor* was exposed to different rearing conditions. Three instars were verified for the larval development of *B. hebetor*, similarly to the insect reared *in vivo*, although with a longer larval stage duration when the insect was reared on artificial diet. Observations of the fine and ultrastructure of the silk glands from *in vivo*- and *in vitro*-reared insects was the same under transmission (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). Low protein concentrations were found in the silk glands of the “*in vitro*” reared insects, which

justifies the absence of cocoons for those reared on artificial diet, not as protein-rich as the natural host (40% pupal holotissues of *Diatraea saccharalis* (F.) (Lep.: Pyralidae), 20% egg yolk, 20% semi-skim milk, 10% Neisenheimer salt solution and 10% water). Further analysis of the role of proteins and lipids as diet components indicated that among the protein components tested, the pupal holotissues of *D. saccharalis* (65%) and serum albumin (3%) provided the best results for rearing *B. hebetor*. While the fatty acids, the lipid concentrate and the linolenic acid improved survivorship significantly. The association of the pupal holotissues of *D. saccharalis* (65%) and the linolenic acid (1%) led to a 120% increase in cocoon formation, as compared to those insects reared on the basic diet. Yet, parolization rates and parasitization capacity of females developing from this improved diet were similar from that of *in vivo*-reared females. *B. hebetor* larvae developed different trypsin classes when reared on artificial diets (with pupal holotissues of *D. saccharalis*), than those reared on the natural host; however, trypsin was the main digestive enzyme under both rearing systems (*in vivo* and *in vitro*). Since lepidopteran larvae hemolymph can show trypsin inhibitors, artificial diets for *B. hebetor* must use hemolymph which do not affect the enzyme activity of the parasitoid. Thus, the improved diet for rearing *B. hebetor* (65% pupal holotissues of *D. saccharalis*, 8.5% lactalbumin hydrolysate, 8.5% fetal bovine serum, 1% linolenic acid, 18% egg yolk), amended the inadequacies found when the insect was reared on the basic diet, that are: insufficient protein quantities in silk glands, insufficient silk production, reduced survivorship and arrestment of immature development. This improved diet yielded 70% survivorship with 70% of the larvae normally spinning their cocoons.

1 INTRODUÇÃO

Bracon hebetor Say (Hym.: Braconidae) é um ectoparasitóide gregário considerado importante agente de controle natural de vários lepidópteros-praga que atacam grãos armazenados (Keever *et al.* 1985; Prozell & Schöller, 1998). Um fator que contribui para o sucesso de *B. hebetor* como inimigo natural é a sua rápida taxa de crescimento e desenvolvimento (Baker & Fabrick, 2000).

A importância dos inimigos naturais, especialmente parasitóides, como agentes de controle natural tem estimulado o interesse em estudos dietéticos, visando a criação massal em dietas artificiais, como alternativa para redução dos custos de produção. Assim, pesquisas têm sido conduzidas em vários laboratórios, com o objetivo de desenvolver técnicas que permitam a criação de parasitóides em meios artificiais (produção "*in vitro*") (Parra & Cònsoli, 1992; Grenier, 1997; Cònsoli & Parra 1997a; 1999).

A produção "*in vitro*" de parasitóides tem avançado nos últimos anos e hoje já existem vários casos de sucesso de criação destes inimigos naturais em dietas artificiais (Cònsoli & Parra 1997a; 1999; 2002), sendo que os trabalhos estão concentrados principalmente em himenópteros endoparasíticos. Para o caso específico de *B. hebetor*, um ectoparasitóide, ainda são poucos os trabalhos relacionados à sua criação "*in vitro*" (Xie *et al.* 1989; Yazlovetsky *et al.* 1992; Magro, 2000; Magro & Parra 2004). Em 1998, pesquisas foram iniciadas nesta direção, no Laboratório de Biologia de Insetos da ESALQ/USP e determinaram um sistema para a criação deste ectoparasitóide, bem como uma dieta, podendo esse processo de criação "*in vitro*" ser extrapolado para outros ectoparasitóides (Magro, 2000). Apesar destes avanços, vários são ainda os problemas a serem solucionados para que a criação "*in vitro*" possa ser utilizada rotineiramente como um sistema de produção de inimigos naturais em larga escala. O desenvolvimento desta tecnologia requer conhecimentos sobre anatomia,

fisiologia e nutrição do parasitóide, bem como o entendimento da natureza das interações hospedeiro/parasitóide.

Dessa forma, este trabalho teve por objetivo realizar estudos básicos, envolvendo aspectos da fisiologia do parasitóide, baseados nas diferenças morfológicas, ultra-estruturais e químicas das glândulas salivares de *B. hebetor*, além de estudos nutricionais, buscando solucionar alguns aspectos das exigências nutricionais de parasitóides, visando aprimorar uma dieta artificial para sua criação "*in vitro*", cujo maior problema era a não formação de casulos pupais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Criação “*in vitro*” de parasitóides

Para a consolidação de programas de controle biológico com inimigos naturais, é necessária a obtenção de grande quantidade de agentes de controle com qualidade e baixo custo de produção (Grenier *et al.*, 1994). Assim, o emprego de dietas artificiais para a criação de inimigos naturais tem sido apontado como um sistema de produção que poderia aumentar a capacidade de produção desses insetos e sua utilização em programas de controle biológico (Simmonds, 1944; Grenier *et al.*, 1994).

A criação “*in vitro*” surgiu como alternativa ao sistema de produção convencional de inimigos naturais (criação “*in vivo*”), pois, nesse caso, prescindia-se da criação do hospedeiro natural ou alternativo, produzindo-se apenas a espécie desejada (inimigo natural) em dietas artificiais. Essa técnica foi inicialmente desenvolvida com o propósito de estudar aspectos relacionados à fisiologia, biologia e nutrição de parasitóides (Prell, 1915, citado por Cênsoli & Parra, 1997a; House & Barlow, 1964; Thompson, 1974, 1975, 1976, 1977), passando a ser intensamente estudada quando se verificou a possibilidade de utilizá-la em sistemas de produção massal de insetos para programas de controle biológico. O aperfeiçoamento destas técnicas de criação “*in vitro*” depende de estudos e conhecimento de fisiologia do parasitóide, nutrição, genética e comportamento (Thompson, 1986). Apesar de limitações, tecnologias de criação estão disponíveis e muitos parasitóides/predadores podem ser criados continuamente sobre meios artificiais (Guerra *et al.*, 1993; Thompson, 1999; Cênsoli & Parra, 2002).

Cênsoli e Parra (1997a) citaram Prell (1915) como o primeiro autor a criar um parasitóide, *Parasetigena agilis* (Robineau-Desvoidy) (Dip.: Tachinidae), em dieta artificial para estudos da sua biologia. Entretanto, o interesse pela utilização desta técnica de criação para produção de insetos para uso em programas de controle biológico começou a aumentar na década de 70. Os mesmos autores relataram que

técnicas “*in vitro*” já permitiram a criação de 71 espécies de parasitóides, obtendo-se adultos em 53 delas. As pesquisas estão concentradas nas ordens Diptera e Hymenoptera, com 16 e 55 espécies estudadas, respectivamente. A ordem Hymenoptera, no entanto, tem apresentado maior número de casos bem sucedidos.

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

Outros trabalhos relataram os sucessos e limitações na criação “*in vitro*” de endoparasitóides (Li, 1992; Volkoff *et al.* 1992; Nordlund *et al.*, 1997; Xie, *et al.*, 1997; Consoli & Parra, 1999) e alguns avanços também foram obtidos para ectoparasitóides (Thompson, 1975; Guerra, 1992; Guerra *et al.* 1993). Alguns autores não verificaram diferenças no comportamento geral dos insetos criados sobre dieta artificial. Assim,

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

C. grandis foi criado em cinco dietas artificiais por Rojas *et al.* (1996), que observou não haver diferença na razão sexual da progênie de fêmeas criadas tanto sobre o hospedeiro natural como em dieta artificial; apesar disto, o peso das pupas foi significativamente menor do que o padrão e as fêmeas produzidas "*in vitro*" produziram menos ovos. Estes resultados demonstraram haver uma correlação entre o peso das pupas e a fecundidade para este ectoparasitóide.

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

Magro & Parra (2004) constataram viabilidade total para *B. hebetor* de 40 e 70%, respectivamente para aqueles criados "*in vitro*" e "*in vivo*", sendo que os adultos foram semelhantes quanto ao tamanho e à capacidade de paralisação e parasitismo.

2.2. Eficiência de parasitóides criados “*in vitro*”

Embora existam diversas descrições de parasitóides criados em dietas artificiais, ainda são poucos os resultados aplicados de controle biológico. Entre os melhores resultados, destacam-se os obtidos para *T. dendrolimi* e *T. confusum* (Hym.: Trichogrammatidae) e *Anastatus japonicum* (Tokunaga) (Hym.: Eupelmidae). *T. dendrolimi* e *T. confusum*, produzidos em ovos artificiais e liberados para o controle de pragas do milho e de florestas, apresentando parasitismo semelhante ou até superior àquele encontrado em parasitóides produzidos “*in vivo*” [óvulos de *Antheraea pernyi* (Guérin-Ménéville) Lep.: Saturnidae] (Dai *et al.*, 1988); além de registros de resultados satisfatórios para *A. japonicum*, que parasitou 85,7% dos ovos de *Tessaratoma papillosa* (Drury) (Het.: Pentatomidae) em condições de campo, enquanto o parasitismo por parasitóides produzidos “*in vivo*” foi de 75% (Han *et al.*, 1990, citados por Li, 1992).

Rojas *et al.* (1997) descreveram a viabilidade do uso de dietas artificiais para a criação massal de *C. grandis*, uma vez que os parasitóides foram prontamente aptos ao parasitismo e controle da praga e os custos de produção drasticamente reduzidos. Testes de campo demonstraram a potencialidade deste agente de controle biológico quando criado “*in vitro*” (Morales-Ramos *et al.*, 1998); embora com redução no peso de pupas e na capacidade reprodutiva do parasitóide (Rojas *et al.*, 1996; Morales-Ramos *et al.*, 1998).

Resultados promissores, em laboratório, foram alcançados para outras espécies de *Trichogramma*. Esses parasitóides, quando criados “*in vitro*”, demonstraram capacidade de parasitismo e longevidade semelhantes àsquelas verificadas em insetos criados em ovos de hospedeiros naturais ou alternativos (Cônsoi, 1997; Nordlund *et al.*, 1997).

Na maioria dos casos, as avaliações da qualidade desses parasitóides foram realizadas com a utilização de indivíduos da primeira geração obtida em dietas artificiais, exceto para *T. dendrolimi* em que foi possível a criação “*in vitro*” por até 50 gerações consecutivas, sem que houvesse redução no desempenho do parasitóide. *C. grandis* apresentou redução significativa em sua fecundidade após a décima geração em dieta artificial (Dai *et al.*, 1985, citados por Li, 1992; Morales-Ramos *et al.*, 1998).

Grenier & De Clercq (2003), comparando diversos trabalhos, fizeram um levantamento de quais parâmetros morfológicos podem ser usados como indicativo da qualidade do inimigo natural (parasitóide ou predador) para utilização em programas de controle biológico, quando criados em dietas artificiais. Peso de pupa ou de adultos, são um bom indicativo do potencial para utilização da técnica de criação "*in vitro*" em benefício de programas de liberação de inimigos naturais para controle de pragas. Vários autores citam a correlação entre o peso de pupas e o de adultos e o tamanho dos adultos para avaliar a eficiência da dieta; em muitos casos de criação de predadores, adultos oriundos de dieta artificial apresentaram-se menores do que aqueles obtidos sobre suas presas. Os mesmos autores citaram que as principais anomalias observadas para parasitóides criados em meios artificiais são deformações nas asas e no abdômen, redução na longevidade e que a fecundidade é influenciada pelo tamanho das fêmeas.

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

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

Os insetos necessitam de dietas com alto conteúdo protéico, principal componente da dieta natural desses organismos, além de outros elementos nutricionais básicos, como carboidratos, lipídios (incluindo-se os esteróis), vitaminas e sais minerais (Dadd, 1985; Parra, 1991). De modo geral, as exigências nutricionais de parasitóides e predadores seguem os princípios estabelecidos por House (1961), assemelhando-se qualitativamente àquelas dos insetos pertencentes a outras ordens, entretanto, são espécies carnívoras, necessitando de uma dieta rica em proteínas (Grenier, 1997).

As dietas utilizadas na criação "*in vitro*" de parasitóides e predadores são

bastante variáveis, apresentando desde meios formulados a partir de homogeneizados derivados de pupas ou de tecidos de vertebrados até aqueles mais elaborados, nos quais todos os elementos adicionados são quimicamente conhecidos. Baseando-se no conhecimento da composição química de seus componentes, essas dietas podem ser divididas em três categorias básicas (Cônsoi & Parra, 1997a): dietas **oligídicas**, compostas por substâncias de natureza química indefinida ou incerta, como homogeneizado de tecidos de invertebrados ou vertebrados; dietas **merídicas**, compostas por elementos de composição química definida, mas com pelo menos um componente de natureza desconhecida; e dietas **holídicas**, que são aquelas quimicamente definidas.

Poucas dietas são quimicamente definidas (Grenier & De Clercq, 2003) e a maioria delas contém algum componente de insetos (extrato de ovo, hemolinfa, etc.) e ainda gema de ovo, leite, carne, entre outros componentes como soro bovino, proteína hidrolisada e óleos.

Vários parasitóides, entre eles: *A. japonicum*, *Dibrachys cavus* Walker (Hym.: Chalcididae), *B. hebetor*, *B. greeni* Ashmead (Hym.: Braconidae) e várias espécies do gênero *Trichogramma*, foram criados em dieta artificial composta basicamente de derivados de insetos (hemolinfa de lagartas ou holotecidos de pupas), gema de ovo, mistura de sais, leite semi-desnatado, soro fetal bovino, soro de albumina bovina e malte (em diferentes proporções para cada caso), tendo havido desenvolvimento completo de ovo (ou larvas neonatas) até adulto (Xie *et al.*, 1986; Li, 1992; Guerra, 1992; Parra & Cônsoi, 1992; Cônsoi & Parra, 1997b).

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

As proteínas ingeridas são degradadas enzimaticamente em aminoácidos, os quais são absorvidos na parede intestinal. Os aminoácidos asseguram, de uma parte, a manutenção do organismo (proteínas estruturais, enzimas), e de outra parte, seu crescimento (produção de novas substâncias celulares, descendentes). Do ponto de vista nutritivo, os aminoácidos são classificados em essenciais ou não essenciais. Todos os insetos que não apresentam simbioses precisam dos L-isômeros de 10

aminoácidos essenciais: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina (Dadd, 1985; Parra, 1999). House (1963), citando os trabalhos de Haidak (1937) e Butler (1943), descreveu os efeitos da falta de proteína na dieta de *Apis mellifera* L. (Hym.: Apidae), ocorrendo atraso em muitos processos fisiológicos podendo, inclusive, levar o inseto à morte. Em colméias privadas de pólen por longos períodos, as abelhas ficaram paralisadas, os pêlos caem, as asas tornaram-se quebradiças e a mortalidade foi alta.

Os açúcares (carboidratos) são necessários para a maioria dos insetos estudados até hoje, a fim de se obter um crescimento ótimo. O principal papel metabólico dos carboidratos é o suprimento de energia e, tem-se que sua deficiência causa baixa vitalidade (House, 1963). Os carboidratos podem ser convertidos em gorduras para o armazenamento e contribuir para a produção de aminoácidos; assim, os carboidratos, gorduras e proteínas são envolvidas em ciclos de reações produtoras de energia (Parra, 1999). Além do valor nutritivo e energético dos carboidratos, eles são fagoestimulantes. As enzimas digestivas disponíveis nos insetos hidrolisam este açúcar em monômeros (pequenas moléculas isoladas, como os monossacarídeos) que são, então, absorvidas pelo epitélio do intestino (Dadd, 1985). A hemolinfa contém, essencialmente, a trealose.

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

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

A utilização de gema de ovos de galinha é uma forma de se fornecer ao meio, lipídios. Ela apresenta, também, o colesterol e outros elementos como a colina e as vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis; contém protídeos, pequenas quantidades de glicídios e numerosos cátions (Grenier, 1986 citado por Volkoff, 1990).

Entre os lipídios, somente os esteróis são sempre exigidos, pois os artrópodes, diferentemente dos vertebrados, não são capazes de sintetizá-los a partir dos acetatos.

Os esteróis são utilizados pelos insetos como componentes da estrutura das células e eles contribuem na síntese reguladora do crescimento e na ecdise (Parra, 1991). Todos os insetos podem satisfazer suas necessidades de esteróis utilizando o colesterol presente na gema do ovo (Dadd, 1985).

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

2.4 Fatores que podem influenciar o desenvolvimento “*in vitro*”.

Além do fator nutricional, outros fatores podem afetar o desenvolvimento de insetos (parasitóides) que são criados em meios artificiais. Somando-se a importância na composição da dieta artificial, deve-se ter especial atenção para o desenvolvimento de dietas para parasitóides coinobiontes. Esses parasitóides podem regular a fisiologia do hospedeiro por meio de produtos derivados de secreções do sistema reprodutivo da fêmea, de secreções de teratócitos ou de sua própria larva, controlando o desenvolvimento do hospedeiro em benefício próprio (Vinson & Iwantsch, 1980; Beckage, 1985), além desses, outros fatores relacionados à consistência, pH e osmolaridade do meio artificial são importantes para o sucesso da criação “*in vitro*” (Cônoli & Parra, 1997a; 2002).

Secreções associadas ao aparelho reprodutor de fêmeas dos parasitóides, principalmente venenos e os vírus de poli-DNA (exclusivos de Braconidae e Ichneumonidae), servem para adequar o hospedeiro ao desenvolvimento imaturo do parasitóide, pela inibição do sistema imunológico do hospedeiro e/ou pela indução de síntese de proteínas específicas, que só surgem em sua hemolinfa após a injeção dessas substâncias (Harwood *et al.*, 1994; Pennacchio *et al.*, 1994). Na maioria dos casos, essas substâncias estão associadas ao controle endócrino do hospedeiro, mantendo-o no estágio de desenvolvimento mais adequado para o parasitóide (Guillot

& Vinson, 1972; Beckage, 1985; Tanaka, 1987). Contudo, em alguns casos, as alterações na composição química do hospedeiro, induzidas após seu parasitismo, podem estar relacionadas com a nutrição do inimigo natural.

A utilização de meios artificiais baseados na composição de aminoácidos da hemolinfa de larvas parasitadas do bicudo-do-algodoeiro resultou no melhor desenvolvimento de *C. grandis*, quando comparado àquele obtido em dietas formuladas com base na composição química de larvas não-parasitadas (Rojas *et al.*, 1996).

Os teratócitos constituem outro fator importante no desenvolvimento de alguns parasitóides. Estes são células derivadas da serosa do embrião que são liberadas no momento da eclosão da larva; apresentam hipertrofia ao longo de seu desenvolvimento, demonstrando atividade secretora intensa (Cônoli & Parra, 2002). Os teratócitos são mais comuns em endoparasitóides das famílias Ichneumonidae, Braconidae e Scelionidae. Strand *et al.* (1988) demonstraram a importância da inclusão dos teratócitos em dietas artificiais para o desenvolvimento *Telenomus heliothidis* Ashmead (Hymenoptera, Scelionidae). Essas células podem ser ainda responsáveis pela secreção de enzimas histolíticas que auxiliam o parasitóide *T. heliothidis* na digestão do hospedeiro (Strand *et al.*, 1986).

A determinação da consistência da dieta está relacionada à necessidade de troca gasosa por aqueles insetos que se desenvolvem diretamente sobre o meio artificial (Cônoli & Parra, 1997a); via de regra, se as trocas gasosas são realizadas por espiráculos, devem-se usar meios semi-sólidos; se via tegumento, utilizam-se meios líquidos ou semi-sólidos. Entretanto, a consistência do meio ou as condições abióticas exigidas pelo parasitóide podem ser variáveis durante seu desenvolvimento imaturo, seja pela fonte de alimento usada ao longo do ciclo larval (hemolinfa ou tecidos), seja pela utilização de sistemas respiratórios distintos pelos diferentes estágios de seu ciclo de vida. O desenvolvimento de ovo a pupa de *Microplitis croceipes* (Cresson) (Hym.: Braconidae) só foi obtido quando a dieta oferecida a esse parasitóide simulou as condições encontradas no hospedeiro natural, ou seja, as larvas de primeiro ínstar se alimentam exclusivamente de meio líquido (hemolinfa), alternando para um meio sólido (tecidos do hospedeiro) à medida que o hospedeiro é consumido. Essa situação foi reproduzida pelo oferecimento de uma dieta artificial na forma de sanduíche, em que a larva do parasitóide iniciava seu desenvolvimento em um meio líquido, passando a se

alimentar gradualmente em um meio semi-sólido (Hu & Vinson, 1998).

Características físico-químicas da dieta, como pH e pressão osmótica, são especialmente importantes para aqueles inimigos naturais que se desenvolvem no próprio meio artificial, como os endoparasitóides, podendo também influenciar o desenvolvimento dos parasitóides, por afetarem seu processo digestivo (Cônoli & Parra, 2002).

A pressão osmótica pode alterar o equilíbrio hidrostático dos tecidos, a hipo ou hipertrofia provocam a morte daqueles organismos que vivem imersos em seu meio alimentar.

O pH é outro fator importante porque muitos inimigos naturais digerem seu hospedeiro externamente ao trato digestivo (digestão pré-oral), produzindo e secretando enzimas digestivas sobre o substrato alimentar e reingerindo os nutrientes parcialmente digeridos (Cohen, 1995). Essas enzimas poderiam ter sua atividade de digestão drasticamente reduzida se expostas a um meio com pH fora dos limites para a atuação das enzimas que compõem o sistema digestivo do inimigo natural. O desenvolvimento de parasitóides é normalmente obtido quando o pH do meio artificial se encontra próximo àquele da hemolinfa do hospedeiro, estando normalmente entre 6,1 e 7,9 (Thompson, 1975; Strand & Vinson, 1985; Baker & Fabrick, 2000).

Apesar de alguns parasitóides suportarem variações extremas quanto ao pH e pressão osmótica de seu meio, a maioria requer valores próximos daqueles presentes em seus hospedeiros naturais. Parasitóides de Lepidoptera necessitam de meio artificial com pressão osmótica ao redor de 350 mOsm, mas algumas espécies se desenvolvem em meios com pressão osmótica entre 340 e 525 mOsm (Strand & Vinson, 1985; Cônoli & Parra, 1997a).

2.5 Formação de casulo e composição da seda

As sedas, em insetos, são formadas de proteína estrutural e, em himenópteros sua produção se dá nas glândulas salivares, que se tornam aptas para esta função apenas no final da fase larval, quando o inseto não se alimentará mais (Craig, 1997).

Prudhomme *et al.* (1985) descreveram que a alimentação por um certo período obrigatório em cada instar é fundamental para sobrevivência e ecdise bem sucedida; a

falta de alimento reduziu o peso de *Bombyx mori* (L.) (Lep.: Bombycidae) e também afetou drasticamente a glândula de seda. A falta de alimento durante os períodos de alimentação apresenta efeito similar; contudo, esses processos são reversíveis e a produção de seda é retomada quando as larvas são realimentadas; aquelas que ficam sem se alimentar produzem casulos pouco fibrosos, utilizando apenas a seda que havia sido depositada antes do período de inanição (Sehnal & Akai, 1990). Os mesmos autores relataram que em condições semelhantes, o conteúdo das glândulas de seda de *Galleria mellonella* L. (Lep.: Pyralidae) foi, provavelmente, utilizado como nutriente, uma vez que o peso da glândula foi reduzido e a seda gradativamente exaurida.

Magro (2000) verificou que *B. hebetor* criado sobre as dietas artificiais apresentou baixa capacidade de formação de casulo, variando de 20 a 70%, contra apenas 2% que não formaram casulos quando criados sobre a traça *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lep. Pyralidae - hospedeiro natural); este problema foi atribuído à deficiência protéica na dieta. Magro & Parra (2001) verificaram a falta de casulos nesta mesma espécie, quando criada sobre lagartas de lepidópteros não hospedeiros naturais.

Magro & Parra (2002) verificou que houve diferença no conteúdo protéico da glândula de seda de *B. hebetor*, quando criado em diferentes substratos. Sehnal & Akai (1990) citaram que, para *B. mori*, 93% dos aminoácidos que compõem a seda são glicina, alanina, serina e tirosina.

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

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção da população de *Bracon hebetor* Say (Hym. Braconidae)

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

Casais do ectoparasitóide individualizados em frascos cilíndricos de vidro (2,0cm de diâmetro x 4,5cm altura), providos de tampa de borracha, receberam diariamente uma lagarta de quinto instar de *A. kuehniella*, pois, segundo Serra (1992), é o instar preferido pelo parasitóide. Após 24 horas, as lagartas já paralisadas e parasitadas foram removidas dos frascos e transferidas para placas de Petri (6,0cm x 2,0cm), sendo mantidas nas condições controladas de temperatura ($25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($70 \pm 10\%$) e fotofase de 14 horas, até a emergência dos adultos.

Parte dos ovos obtidos foi transferida, com auxílio de um pincel, para a dieta artificial, segundo metodologia descrita por Magro & Parra (2004).

3.2 Preparo da dieta artificial para criação do parasitóide

Para a confecção da dieta artificial para criação “*in vitro*” de *B. hebetor* foram utilizados holotecidos pupais de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lep.: Pyralidae) (40%), gema de ovo (20%), leite semi-desnatado (20%), água destilada e mistura de sais de Neisenheimer (10% cada) e mais 20 microlitros/mL da dieta de anticontaminantes (Antibiotic-Antimicotic GIBCO BRL) - dieta artificial padrão - (Magro

2000). Todo o procedimento de preparo das dietas foi realizado em capela de fluxo laminar, mantendo-se as condições assépticas do meio.

Para a extração dos holotécidos pupais, pupas de 24 a 48 horas de *D. saccharalis*, criadas em dieta artificial segundo Parra & Mishfeldt (1992), foram submetidas a tratamento térmico (água aquecida a 60-62°C, durante 10 minutos), para evitar a melanização da hemolinfa pela ação das fenoloxidasas (Shapiro & Ignoffo, 1973). Em seguida, o material foi esterilizado superficialmente em solução de hipoclorito de sódio 2%, por 10 minutos, sendo posteriormente lavado por duas vezes consecutivas em água destilada.

Após este tratamento, as pupas foram colocadas dentro de uma seringa descartável de 15mL e comprimidas com o auxílio do êmbolo, sendo o líquido, oriundo do maceramento, coletado em recipiente adequado e centrifugado a 4.000 rpm por 3 minutos.

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

3.3 Estudo da glândula de seda de *B. hebetor*

3.3.1 Extração das glândulas e quantificação de proteína

Três lotes de cada tratamento ("*in vivo*" e "*in vitro*"), com trinta glândulas em cada um, foram extraídos por meio de uma incisão na região anterior do corpo do inseto. As extrações foram realizadas de quatro em quatro horas, no período de 72 a 116 horas para os insetos criados no hospedeiro natural (*A. kuehniella*) e de 72 a 148 horas para os insetos criados sobre a dieta artificial padrão (item 3.2), visando assim detectar o período de atividade secretora das larvas de final de ciclo, baseando-se em Magro *et al* (2002). As glândulas de cada tratamento, e das diferentes amostras foram armazenadas em 30 µl de solução tampão (NaCl 230mM – 460 mOsmolar), sendo, ao final de todas as coletas, maceradas e submetidas à quantificação de proteína pelo método de Bradford (1976), utilizando-se ovoalbumina como padrão.

As glândulas foram extraídas de insetos vivos, previamente anestesiados em gelo e imersos em solução tampão gelada.

3.3.2 Ultramorfologia da glândula salivar do ectoparasitóide larval *B. hebetor* criado “*in vivo*” e “*in vitro*”

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica NAP/MEPA da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Esalq/USP, Piracicaba / SP.

Larvas vivas de *B. hebetor*, de idade entre 96 horas e 120 horas (idades correspondentes ao período de formação de casulos) obtidas da criação dos insetos sobre o hospedeiro natural e dieta artificial, respectivamente, foram submetidas à remoção das glândulas de seda, com auxílio de estiletes e pinças de pontas finas e microscópio estereoscópico, sendo previamente anestesiadas em gelo e imersas em fixador Karnovsky (tampão fosfato de sódio 0,08M, pH 7,3; paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,1%). As glândulas foram extraídas por meio de uma incisão na região anterior do corpo do inseto.

Após a dissecação, as glândulas foram transferidas para recipientes contendo o mesmo fixador, onde permaneceram por um período mínimo de duas horas. Posteriormente, o material foi desidratado em gradiente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%), em banhos sucessivos de 15 minutos, sendo que em acetona 100%, foram dois banhos. A desidratação final foi realizada em aparelho de sacagem ao ponto crítico (Balzers Critical Point Dryer CPD 030) com CO₂. Após esta etapa, as glândulas foram fixadas em suportes metálicos (‘stub’), com auxílio de fita dupla face. Por meio de vaporizador (Sputtering Balzers Union Med SCD 010), as glândulas foram revestidas com uma fina camada de ouro e levadas ao MEV (Microscópio Eletrônico de Varredura) (Zeiss DMS 9404) com voltagem de aceleração de 15 KV, onde foram analisadas e fotografadas.

3.3.3 Ultra-estrutura da glândula salivar do ectoparasitóide larval *B. hebetor* criado “*in vivo*” e “*in vitro*”

O estudo ultra-estrutural do epitélio secretor da glândula salivar do ectoparasitóide *B. hebetor*, em microscopia eletrônica de transmissão, foi realizado no Instituto de Biologia da Unesp – Universidade Estadual Paulista de Rio Claro/SP e no Laboratório de Microscopia Eletrônica NAP/MEPA da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Esalq/USP, Piracicaba / SP.

O processo de remoção das glândulas foi semelhante ao descrito no item anterior. Após a fixação, o material foi lavado com solução tampão fosfato 0,1M, três vezes, por 15 minutos para cada banho. A seguir, o material foi pós-fixado com tetróxido de ósmio (OsO_4) a 2% em tampão cacodilato por duas horas no escuro, após o que se seguiu a lavagem em água destilada e a desidratação em gradiente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%), em banhos sucessivos de 15 minutos, sendo que em acetona 100% foram feitos dois banhos, em seguida o material foi “emblocado” em resina plástica “spurr”.

Cortes ultra-finos (cortes de 60-70nm – Reichert Ultracut E) foram montados em tela de cobre (200 mesh) e contrastados com acetado de uranila a 3% e citrato de chumbo. As observações foram realizadas ao MET (Microscópio Eletrônico de Transmissão) Zeiss EM 900, com corrente de 50 e 80 kV.

Cortes semi-finos (100-120nm), corados com azul de toluidina e observados em microscópio de luz, auxiliaram na localização do tecido a ser cortado.

3.3.4 Teste histoquímico

Foram realizados testes histoquímicos para a detecção de proteínas nas glândulas salivares de *B. hebetor*, para tanto, foi utilizada a técnica do Azul de Bromofenol (Lison, 1960; Gabe, 1976) para proteínas básicas.

Assim, as glândulas salivares foram fixadas em paraformaldeído 4% e e NaCl 0,9%, em tampão fosfato 10% (0,1M – pH 7,4) por 24 horas em geladeira. Os cortes, recolhidos em lâminas, foram corados com solução de Azul de Bromofenol à temperatura ambiente, durante duas horas, sendo em seguida banhados em solução

aquosa de ácido acético 0,5%, durante cinco minutos. A seguir, as lâminas foram diferenciadas em água destilada e secas à temperatura ambiente. Depois de secas foram diafanizadas em xilol e preparadas em Permount.

3.4 Seleção do hospedeiro alternativo e aspectos nutricionais

3.4.1 Exigências nutricionais do ectoparasitóide *B. hebetor* - aminograma comparado do hospedeiro e da dieta artificial.

A quantidade de proteína e as proporções de aminoácidos da dieta artificial padrão e das hemolinfas de lagartas de quinto ínstar de *A. kuehniella* (hospedeiro natural), *D. saccharalis*, *Heliothis virescens* (Fabricius), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lep.: Noctuidae) (lepidópteros criados rotineiramente no Laboratório de Biologia de Insetos, das quais será selecionada hemolinfa ou holotécidos pupais para a confecção de dietas artificiais) foram avaliados por meio de Bradford (1976), utilizando-se ovoalbumina como padrão, e comparados através de aminograma (hidrólise ácida). Para a extração da hemolinfa foram utilizadas lagartas sadias, criadas em dieta artificial, em atividade de alimentação. Após serem anestesiadas em gelo, cortou-se o quarto par de falsas pernas das lagartas, com tesoura de dissecação, sendo, a hemolinfa, coletada com o auxílio de uma seringa e depositada em eppendorff. Para evitar a melanização da hemolinfa, foi acrescentada, durante a extração, PTC (1-phenyl-2-thiourea). Para análise, foram utilizados 1mL de cada hemolinfa ou dieta.

3.4.2 Histoquímica do conteúdo intestinal do ectoparasitóide larval *B. hebetor* criado “*in vivo*” e “*in vitro*”

Foram realizados testes histoquímicos para a detecção de proteínas e lipídios no conteúdo intestinal das larvas de *B. hebetor*. Para tanto, foi utilizada a técnica de

Aneline Blue Black (Fisher, 1968) para contraste de proteínas e a de Sudan IV (Johansen, 1940) para contraste de lipídios.

Assim, os intestinos das larvas de *B. hebetor* criadas em dieta artificial e hospedeiro natural, em fase final de alimentação (85-95 horas e 70-80 horas, respectivamente) foram extraídos em fixador Karnovsky e mantidos no mesmo fixador por, pelo menos, duas horas. Em seguida, procedeu-se à desidratação em gradiente de álcool (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) em banhos sucessivos de 10 minutos, sendo que em álcool 100% foram feitos três banhos. O material foi mantido por duas horas em histo-resina + álcool, passando em seguida por resina de pré infiltração (durante a noite) e após “emblocado” em resina 100%.

O material foi cortado (3µm) em navalha de aço e aderido em lâminas de vidro, onde foram contrastados. As observações foram realizadas em microscópio óptico, com contraste de fase.

3.4.3 Caracterização das enzimas digestivas

Os estudos para determinação e caracterização das enzimas presentes no tubo digestivo de *B. hebetor* foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Insetos, no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, São Paulo/SP.

3.4.3.1 Preparo do homogeneizado intestinal de *B. hebetor*

Larvas de *B. hebetor* com idade de 80 e 94 horas (final do 3º ínstar), respectivamente alimentadas no hospedeiro natural *A. kuehniella* e na dieta artificial (50 larvas para cada tratamento), foram imobilizadas em gelo e dissecadas em solução de NaCl 230mM (460mOsmolar) gelada sob microscópio estereoscópico para isolar os tubos digestivos, que foram estocados a -18 °C até o momento da manipulação.

Os tubos digestivos foram homogeneizados em água bidestilada gelada utilizando-se Potter-Elvehjem. Em seguida, os respectivos homogeneizados foram centrifugados por 30 minutos a 20.000g a 4 °C em centrifuga Sorvall RC-5B. Os

sobrenadantes resultantes foram recolhidos e seus volumes foram ajustados para 1,0mL com auxílio de um balão volumétrico.

3.4.3.2 Ensaio enzimáticos

A detecção da atividade enzimática foi realizada incubando-se a mistura de reação em banho-maria termostatizado (30°C) por diferentes períodos de tempo. Controles sem enzima (brancos de substrato) e sem substrato (brancos de enzima) foram incubados do mesmo modo que os experimentais. A atividade observada foi expressa em nmoles de substrato ou ligação hidrolisada por minuto (mU, miliunidades).

A Tabela 1 resume os substratos e tampões utilizados e os produtos determinados para cada tipo de ensaio enzimático.

Para determinar a atividade enzimática de proteinases utilizou-se CaseínaFITC. Os ensaios enzimáticos utilizando CaseínaFITC foram realizados conforme descrito em Twining (1984). Para fins de cálculo, considerou-se que uma unidade de enzima é a quantidade que causa uma mudança na emissão de 1.000 unidades/60min.

Tabela 1 Condições de ensaio e métodos utilizados na determinação das atividades enzimáticas de homogeneizados intestinais de *Bracon hebetor* criado sobre o hospedeiro natural *Anagasta kuehniella* e em dieta artificial

Enzima	Substrato	Concentração	pH (faixa testada)	Substância ou grupo determinado	Referência
Amilase	Amido*	0,5%	5,5	Grupos redutores	Noelting & Bernfeld (1948)
Aminopeptidase	LpNa	1 mM	8,0	Nitroanilina	Erlanger <i>et al.</i> (1961)
Carboxipeptidase	ZGlyPhe	15 mM	8,0	Fenilalanina	Nicholson & Kim (1975)
Cys-proteinase	ϵ -NH ₂ SBCMCA	1 μ M	5,5	Metil-cumarina	Alves <i>et al.</i> (1996)
Dipeptidase	GlyLeu	5 mM	8,0	Leucina	Nicholson & Kim (1975)
Maltase	maltose	7 mM	5,5	Glicose	Dahlqvist (1968)
Tripsina	Z-FR-MCA	10 μ M	8,0	Metil-cumarina	Alves <i>et al.</i> (1996)
Quimotripsina	Suc-AAF-MCA	10 μ M	8,0	Metil-cumarina	Alves <i>et al.</i> (1996)

Os ensaios foram realizados a 30°C nos valores de pH indicados. Os tampões (50mM) usados foram: citrato-fosfato (pH 5,5 - 6,0) e Tris-HCl (pH 8,0). As incubações foram realizadas por, pelo menos, quatro diferentes períodos de tempo e as velocidades iniciais foram calculadas. Todos os ensaios foram feitos sob condições tais que a atividade foi proporcional ao tempo e à concentração de proteína. Uma unidade de atividade (U) é definida como a quantidade de enzima que catalisa a clivagem de 1 μ mol de substrato (ou ligação)/min. Tris: tris(hidroxymethyl)aminomethane
 *No substrato foi acrescentado NaCl para concentração final 10 mM.

3.4.3.3 Identificação das proteinases intestinais em *B. hebetor* – Cromatografias

Homogeneizados intestinais de insetos mantidos nos dois sistemas de criação (*in vivo* e *in vitro*) foram submetidos à uma cromatografia de troca iônica em coluna High Q, em sistema de baixa pressão (EconoSystem Bio Rad), equilibrada com tampão Tris HCl 20mM, pH 7,5 e eluídas em gradiente linear de NaCl de 0 a 0,6 M e, em seguida, NaCl 1M, no mesmo tampão. As frações resultantes foram ensaiadas com Caseína-FITC (caseína fluoresceína isotiocianato), na presença e ausência de ativadores e também com substratos sintéticos para cada classe de proteinases. Os compostos utilizados como ativadores ou inibidores foram: SBTI (Soybean trypsin inhibitor, tipo Kunitz – inibidor de tripsina) na concentração final de 17 μ M, Benzamidina (inibidor de tripsina) na concentração final de 500 μ M, Quimostatina (inibidor de quimotripsina) em concentração final de 100 μ M, EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid – agente quelante de cátions divalentes) na concentração final de 9 mM, DTT (DL-dithiothreitol – agente redutor) na concentração final de 4,5 mM, TLCK (N- α -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone – modificador irreversível de tripsina) na concentração final de 500 μ M, e E-64 (trans-epoxysuccinyl-L-leucyl-amido(4-guanidino butane) (inibidor de cisteína-proteinase) na concentração final de 40 μ M.

Visando detectar diferentes atividades de tripsina envolvidas na digestão de *B. hebetor* criados *in vivo* e *in vitro*, os homogeneizados intestinais foram submetidos ainda à cromatografia de troca iônica em coluna Resource Q em sistema FPLC (Pharmacia) e cromatografia hidrofóbica em coluna ResourcePhe em sistema FPLC (Pharmacia). Para o primeiro caso, a coluna foi equilibrada em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,4. Os homogeneizados foram diluídos 10 vezes no mesmo tampão. A atividade de tripsina foi eluída com de 25,0 mL de um gradiente de NaCl de 0 a 1,0 M no mesmo tampão descrito anteriormente. Frações de 0,4 mL foram coletadas. Aliquotas de 2,0 μ L destas frações foram incubadas com 200 μ L de uma mistura de ZGGRMCA (carbobenzoxi-Gly-Gly-Arg-7-amido-4-metil cumarina) 0,01 mM e tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5. Os ensaios foram incubados a 30°C por 16 horas. A reação foi interrompida pela adição de 40 μ L de ácido acético 30%. A emissão de fluorescência a 460 nm foi determinada com a utilização de um leitor de fluorescência Fluorocount (Packard, USA) com excitação a 380nm.

No segundo caso, onde os homogeneizados intestinais de *B. hebetor*, criados em dieta artificial ou em hospedeiro natural, foram submetidos à cromatografia hidrofóbica em coluna Resource_Phe em sistema FPLC (Pharmacia), a coluna foi equilibrada em tampão fosfato 0,05 M pH 6,6 contendo sulfato de amônio 1,7 M. Os homogeneizados foram diluídos 10 vezes no mesmo tampão. A atividade de tripsina foi eluída com de 25,0 mL de um gradiente decrescente de sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ de 1,7 a 0 M no mesmo tampão descrito anteriormente. Frações de 0,4 mL foram coletadas. As frações foram ensaiadas da mesma forma descrita anteriormente para as frações eluídas da cromatografia em coluna Resource Q.

3.4.3.4 Inibidores de proteinases presentes na hemolinfa de lepidópteros

A quantidade de proteína da dieta artificial padrão (item 3.2) e das hemolinfas de lagartas de quinto ínstar de *A. kuehniella* (hospedeiro natural), *Agrotis ipsilon* Hufnagel (Lep.: Noctuidae), *D. saccharalis*, *H. virescens*, *S. frugiperda* e *A. gemmatilis* (lepidópteros criados rotineiramente no Laboratório de Biologia de Insetos, dos quais será possível obter e selecionar hemolinfa ou holotécidos pupais para a confecção de dietas artificiais) foi determinada pelo método Bradford (1976), utilizando-se ovoalbumina como padrão. Para a extração da hemolinfa foram utilizadas lagartas sadias, criadas em dieta artificial, em atividade de alimentação. Após serem anestesiadas em gelo, cortou-se o quarto par de falsas pernas das lagartas, com tesoura de dissecação, sendo, a hemolinfa, coletada com o auxílio de uma seringa e depositada em eppendorff. Para evitar a melanização, foi acrescentada, durante a extração, PTC (1-phenyl-2-thiourea). Foram coletadas três amostras para cada espécie estudada, sendo cerca de 500µL para cada.

A caracterização da capacidade inibitória das hemolinfas dos diferentes lepidópteros sobre a atividade de tripsina presente no tubo digestivo de *B. hebetor* foi realizada no Laboratório de Bioquímica de Insetos, Instituto de Química/USP.

Amostras das hemolinfas e dos homogeneizados intestinais de *B. hebetor* foram rigorosamente diluídas de modo a apresentarem equivalência na quantidade de proteína. Após isso, as amostras foram misturadas em proporções iguais (10µL para cada) e pré-incubadas por um período de 15 minutos a 30°C, de maneira que se

estabelecesse um equilíbrio entre as proteinases e possíveis inibidores presentes nas hemolinfas. Após a pré-incubação as misturas foram ensaiadas em quatro diferentes períodos de tempo, com os substratos descritos na Tabela 1.

Os resultados de atividade enzimática dos homogeneizados intestinais de *B. hebetor* foram comparados com aquele onde se introduziu hemolinfa do hospedeiro natural. Para confirmação da presença de inibidores de tripsina nas hemolinfas testadas, estas foram utilizadas para ensaios de inibição sobre tripsina bovina (Sigma-Aldrich) e tripsina purificada de *Periplaneta americana* (L.) (Dictyoptera: Blattidae), segundo Lopes & Terra (2003), nas mesmas condições descritas acima e tendo como padrão de atividade enzimática a água e de inibição o SBTI (Soybean trypsin inhibitor, tipo Kunitz – inibidor de tripsina).

3.5 Avaliação dos instares larvais e do consumo de alimento para *B. hebetor*

Foram oferecidas ao ectoparasitóide *B. hebetor*, conforme metodologia descrita por Magro & Parra (2004), a dieta padrão básica (item 3.2) e a mesma acrescida de 100,0µL da solução estoque do corante “Amarante” 400ppm, obtendo-se a concentração final de 40ppm {Amarante (Dye) – 3-hidroxi-4-[(4-sulfo-1-naphthalenyl)azo]-2,7-naphthalenedissulfonic acid trissodium salt}. A leitura no Spectra-Max foi realizada no comprimento de onda de 523nm.

Os tratamentos foram mantidos em câmaras climatizadas com condições controladas de temperatura, umidade relativa do ar e fotofase (25±2°C; 70±10% e 14 horas, respectivamente). Ao final do período larval, nas duas condições de alimento (com e sem corante), foram coletas três repetições com 15 larvas em cada tratamento, para posterior análise do volume proporcional de dieta ingerida, por meio de leitura de absorbância (Specta Max Plus – 523nm). Previamente, foi elaborada uma curva padrão com diferentes concentrações das dietas com e sem Amarante, possibilitando correlacionar a absorbância com o volume da dieta. A curva observada para as amostras de dieta sem corante foi estabelecida como “branco”.

Para verificação dos instares de *B. hebetor*, lagartas de 5º instar de *A. kuehniella* foram submetidas ao parasitismo por um período de 4 horas. Após 24 horas, parte dos ovos do parasitóide foi transferida para dieta artificial padrão (item 3.2) e parte foi

mantida sobre o hospedeiro natural. Larvas foram amostradas seis horas após a eclosão e após, a cada 12 horas, tanto para aquelas criadas "*in vivo*", como para aquelas criadas "*in vitro*", sendo coletadas 50 larvas para o tempo de 6 e 12 horas, 35 larvas para 24 horas, 20 larvas para 36 horas e 15 larvas para as demais amostragens, com três repetições para cada uma delas. Após a coleta, estas foram pesadas em balança analítica e fixadas em álcool 70%, por um período mínimo de 24 horas. Findo esse procedimento, as larvas foram colocadas em fenol por 6 horas e, em seguida, montadas em Hoyer's. As medidas das mandíbulas dos insetos foram realizadas em microscópio com contraste de fase, utilizando-se do programa de captura e digitalização de imagens Zeiss. A metodologia para caracterização dos instares foi baseada em Cònsoli & Vinson (2002).

3.6 Comparação de dietas artificiais para a criação de *B. hebetor*

A dieta básica (item 3.2) acrescida de diferentes componentes (aminoácidos, fontes de proteínas) (Tabela 2), foi oferecida aos parasitóides em placas de Petri plásticas (2,0 x 1,0 cm), sendo colocados 150 µl do meio entre duas lâminas de parafilme (Parafilm®) distendido. Os ovos de *B. hebetor*, obtidos do parasitismo sobre *A. kuehniella*, foram transferidos para o parafilme com o auxílio de um pincel. O material foi acondicionado em câmara climatizada (temperatura: 25° ± 2° C; umidade relativa: 70±10%; fotofase: 14 horas) para o acompanhamento diário do desenvolvimento do ectoparasitóide.

Foram avaliados, para cada dieta, a viabilidade das fases de ovo, larva, pupa e do ciclo total (ovo-adulto) e a porcentagem de indivíduos com e sem casulo.

Cada tratamento (dieta) constou de cinco repetições (placas com 25 ovos), e todos os parâmetros foram avaliados simultaneamente para parasitóides criados sobre o hospedeiro natural (*A. kuehniella*), servindo como fonte de comparação (testemunha).

As médias de formação de casulo e viabilidade de *B. hebetor* criado nas diferentes dietas artificiais e sobre o hospedeiro natural foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Para análise de agrupamento ("cluster

Analysis”) foram utilizados os parâmetros: viabilidades larval e do ciclo total e porcentagem de formação de casulos, utilizando-se o programa Systat. As dietas selecionadas foram enriquecidas com diferentes fontes de ácidos graxos (Tabela 2 - continuação). Para esse novo grupo de dietas foram avaliados os mesmos parâmetros descritos anteriormente, selecionando-se a(s) melhores dietas para a criação de *B. hebetor*.

Para as dietas selecionadas, além dos parâmetros descritos anteriormente, foram avaliados a duração das fases de ovo, larva, pupa e ciclo total, razão sexual, capacidade de paralisação e parasitismo (agressividade), peso de pupas (72 horas após a liberação da mecônia) e longevidade dos adultos.

Para o teste de agressividade e longevidade dos adultos, um casal recém emergido de cada tratamento foi acondicionado em recipiente plástico de 150mL, com tampa, juntamente com 20 lagartas de 5º ínstar de *A. kuehniella*. Após 48 horas separou-se o casal e procedeu-se a contagem do número de lagartas paralisadas e parasitadas e do número de ovos depositados. De cada repetição foi retirada uma amostra de ovos (lagarta parasitada) para verificação da viabilidade da F1. Os adultos retirados dos recipientes foram mantidos nas mesmas condições de temperatura, umidade relativa do ar e fotofase anotando-se diariamente a mortalidade. Para cada tratamento (dietas) foram realizadas 15 repetições.

As médias de duração e viabilidade das fases e do ciclo total (ovo-adulto), de formação de casulo, agressividade, peso de pupas e longevidade de *B. hebetor* criado nas diferentes dietas artificiais e sobre o hospedeiro natural foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade e as médias de razão sexual foram comparadas pelo teste de χ^2 , 5% de probabilidade e 1GL.

Tabela 2 Composição das dietas artificiais utilizadas para criação “in vitro” de *Bracon hebetor*

Componentes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HTP* <i>D. saccharalis</i> (µL)	650	400	400	400	400	400	400	400	600	400	400	400	400	400
Gema de ovo (µL)	180	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Hidrolisado de lactoalbumina (µL)	85							85						
Soro fetal bovino (µL)	85							85						
Leite semi-desnatado (µL)		200	200	200	200	200	200	200	100	200	200	200	200	200
Água (µL)		100	100	100	100	100	100		100	100	100	100	100	100
Mistura de sais de Neisenheimer (µL) ¹		100	100	100	100	100	100			100	100	100	100	100
Caseína (concentração final)			0,20%							3%				
Soroalbumina (concentração final)				0,75%						3%				
Betaina (concentração final)					2%						0,40%			
Alanina (concentração final)						2%						0,40%		
Tirosina (concentração final)							2%							0,40%
Anticontaminantes (µL) ²	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

*HTP holotécidos pupais

¹ 7,5g de NaCl ; 0,1g KCl; 0,2gNaHCO₃/1litro de água destilada

² Penicilina, estreptomicina e anfotericina (Antibiotic-Antimycotic Gibco BRL)

Tabela 2 (continuação) Composição das dietas artificiais utilizadas para criação “in vitro” de *Bracon hebetor*

Componentes	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
HTP* <i>D. saccharalis</i> (µL)	650	400	400	400	400	650	650	650	400	400	400	400	400	400	400	400
Gema de ovo (µL)	180	200	200	200	180	180	180	180	200	200	200	200	200	200	200	200
Hidrolisado de lactalbumina (µL)	85				85	85	85	85								
Soro fetal bovino (µL)	85				85	85	85	85								
Leite semi-desnatado (µL)		200	200	200					200	200	200	200	200	200	200	200
Água (µL)		100	100	100					100	100	100	100	100	100	100	100
Mistura de sais de Neisenheimer (µL) ¹		100	100	100					100	100	100	100	100	100	100	100
Soroalbumina (concentração final)			3%										3%	3%	3%	3%
Caseína (concentração final)				3%												
Concentrado de lipídios (dilução final)	1000	1000	1000	1000				100				100				100
Ác. linolênico (µL) (1% do volume da dieta)					10				10				10			
Ác. linoleico (µL) (3% do volume da dieta)						30				30				30		
Ác. eicosatrienóico (µL) (2% do volume da dieta)							20				20				20	
Anticontaminantes (µL) ²	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

*HTP holotécidos pupais

¹ 7,5g de NaCl ; 0,1g KCl; 0,2gNaHCO₃/1litro de água destilada

² Penicilina, estreptomicina e anfotericina (Antibiotic-Antimycotic Gibco BRL)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo da glândula de seda de *Bracon hebetor* Say (Hym.: Braconidae)

4.1.1 Extração das glândulas e quantificação de proteína

Verificou-se, para parasitóides criados "*in vivo*", que o abandono do hospedeiro natural, *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lep.: Pyralidae) e conseqüente parada na alimentação ocorreu com 80-84 horas, podendo observar-se, nesse período, formação de expansões laterais ao corpo das larvas (Figura 1A-E); embora se tenha constatado o início do comportamento de produção da seda, os primeiros fios passaram a ser observados apenas oito horas após (88-92 horas) (Figura 1B-A). A confecção da seda continuou até a idade de 112-116 horas (Figura 1C-E) a partir da qual puderam ser observadas alterações no corpo dos insetos, com o início da diferenciação do tórax e abdômen. A mecônia foi liberada quando as larvas atingiram a idade de 120 horas aproximadamente.

Para os insetos criados na dieta artificial ("*in vitro*") verificou-se a tendência de início de abandono da dieta com 88-92 horas (Figura 1B-B), sendo visíveis também as expansões laterais no corpo das larvas. Esta movimentação continuou até 128-132 horas, quando foram observados alguns vestígios de seda, porém espalhados e não contínuos, recobrendo parte do substrato de desenvolvimento (Figura 1D-E). A liberação da mecônia só ocorreu cerca de 56 horas após o "abandono" do alimento, 16 horas a mais se comparada às 40 horas gastas para o mesmo processo na criação "*in vivo*" (84 – 124 horas).

Assim, observou-se que a duração da fase larval de *B. hebetor* foi alongada em cerca de 1 dia (24 horas) para os insetos criados na dieta artificial, com uma duração

de aproximadamente 144-148 horas comparada às 120-124 horas quando o inseto foi criado em seu hospedeiro natural, tendo como parâmetro a liberação da mecônia (eliminação de excrementos acumulados no trato digestivo durante o desenvolvimento larval) (Figuras 1D- A; 1E - B).

Magro & Parra (2004) observaram a tendência de aumento da fase larval de *B. hebetor* quando criados em dieta artificial, comparados àqueles criados sobre o hospedeiro natural. Valores semelhantes de duração da fase larval para esse parasitóide criado em traças hospedeiras foram observados por Magro & Parra (2001) e por Serra (1992), com valores de 4,6 a 6 dias.

A curva de quantidade de proteínas das glândulas extraídas dos insetos criados "*in vivo*" e "*in vitro*", no período de 72 a 116 horas e de 72 a 148 horas (respectivamente), demonstraram a mesma tendência, contudo em proporções menores para as glândulas dos insetos criados na dieta artificial (Figura 2).

Pôde-se observar um pico de proteínas entre 72 e 88 horas, possivelmente correspondente a alguma enzima ou propriedade salivar.

Quando as larvas do ectoparasitóide começam a abandonar o hospedeiro ou a dieta, com 80-84 horas e 88-92 horas, respectivamente para insetos criados "*in vivo*" e "*in vitro*", verificou-se uma tendência de redução na quantidade de proteína das amostras, correspondente à parada de alimentação e à mudança funcional da glândula, passando de glândula salivar para glândula de seda. Quatro e oito horas após essa redução na quantidade de proteínas das glândulas, verificou-se aumento progressivo no volume de proteína das glândulas, respectivamente para os insetos criados "*in vivo*" e "*in vitro*"; indicando o início da produção de seda.

O máximo de proteína acumulada nas glândulas foi de 5,03µg de proteína/µL da amostra com 92 a 100 horas de idade, para as extraídas de insetos criados na dieta natural (lagartas de *A. kuehniella*). Para as glândulas extraídas dos insetos criados na dieta artificial o valor máximo foi de 2,8 µg de proteína/µL da amostra, na idade de 120-124 horas.

Para os insetos criados "*in vivo*" o processo de secreção de seda aconteceu entre 84 e 112 horas, enquanto que na dieta foi entre 96 e 140 horas. Em ambos os casos, oito horas após, ocorreu a liberação da mecônia.

Figura 1A-Desenvolvimento de *Bracon hebetor* em hospedeiro natural e em dieta artificial (esquerda e direita, respectivamente) (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas). A e B com 72-76 h; C e D com 76-80 h; E e F com 80-84 h; G e H com 84-88 h (aumento 7X)

Figura 1B-Desenvolvimento de *Bracon hebetor* em hospedeiro natural e em dieta artificial (esquerda e direita, respectivamente) (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas). A e B com 88-92 h; C e D com 92-96 h; E e F com 96-100 h; G e H com 100-104 h (aumento 7X)

Figura 1C-Desenvolvimento de *Bracon hebetor* em hospedeiro natural e em dieta artificial, (esquerda e direita, respectivamente) (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas). A e B com 104-108 h; C e D com 108-112 h; E e F com 112-116 h; G e H com 116-120 h (aumento 7X).

Figura 1D-Desenvolvimento de *Bracon hebetor* em hospedeiro natural e em dieta artificial (esquerda e direita, respectivamente) (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas). A e B com 120-124 h - seta indica mecônia; C e D com 124-128 h; E com 128-132 h - seta indica seda; F com 132-136 h (aumento 7X)

Figura 1E-Desenvolvimento de *Bracon hebetor* em hospedeiro natural e em dieta artificial (esquerda e direita, respectivamente) (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas). A e B com 144-148 h (aumento 7X) - seta indica a mecônia; C e D com 246 horas (aumento 18X)

Figura 2-Quantificação de proteína das glândulas salivares de *Bracon hebetor* criado sobre o hospedeiro natural, *Anagasta kuehniella* ("in vivo") e em dieta artificial ("in vitro"), pelo método de Bradford (1976), durante o período de 72 a 148 horas

4.1.2 Ultramorfologia da glândula salivar e do aparelho digestivo do ectoparasitóide larval *B. hebetor* criado "in vivo" e "in vitro"

Larvas "maduras" de *B. hebetor*, em idade que corresponde ao início da secreção da seda, possuem intestinos que ocupam praticamente toda a cavidade do seu corpo. Na parte final do intestino médio há um par de túbulos finos e transparentes, os túbulos de Malpighi que, segundo Baker & Fabrick (2000), não são funcionais e correspondem à metade do tamanho do intestino (Figura 3). Nesta fase (96 horas de vida, para os criados "in vivo" e 120 horas para os criados "in vitro"), *B. hebetor* apresenta, na

cavidade corpórea, muitos grânulos brancos denominados cristais de urato (ou grânulos de urato), resultantes do mecanismo de excreção (Baker & Fabrick, 2000).

Em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível observar que lateralmente ao intestino, a partir da cavidade oral e acompanhando toda a extensão do intestino, encontram-se duas glândulas salivares (glândulas de seda) bem desenvolvidas (Figura 3A). Morfologicamente, não foram verificadas diferenças na anatomia externa dessas glândulas, tanto para insetos criados na dieta artificial ou no hospedeiro natural. Cada glândula é composta por uma porção secretora, localizada posteriormente e dividida em dois “ramos” (Figura 3B e 4) que podem, tanto terminar em forma de uma alça (U) como em fundo “cego”, como mostram as Figuras. Esses ramos fundem-se, formando o ducto simples (ou ducto lateral), que se dirige para o reservatório (R); essa região normalmente tem formato de “S”. Do reservatório parte o ducto lateral 2, que tem conexão direta com a cavidade oral. A conformação da glândula de seda de *B. hebetor* apresenta-se semelhante à de *Pachycondyla villosa* (F.) (Hym.: Formicidae) (Caetano *et al.*, 2002).

Figura 3-Intestino e glândulas salivares de *Bracon hebetor* criado no hospedeiro natural. A) i- intestino; gs- glândula de seda; B) R- reservatório; C) tm- túbulos de Malpighi. Observação em microscopia eletrônica de varredura (MEV), aumentos A=50X; B e C=35X

Figura 4-Esquema da glândula salivar de *Bracon hebetor*. **ds**- ducto simples (ou lateral); **ds2**- ducto simples (ou lateral); **R**- reservatório; **b**- bifurcação e **rs**- região secretora. Aumento 50X

4.1.3 Ultra-estrutura e histoquímica da glândula salivar do ectoparasitóide larval *B. hebetor* criado “*in vivo*” e “*in vitro*”

Observações em microscópio de luz de cortes semi-finos (0,7µm) das regiões anterior (armazenamento) e posterior (secretora) da glândula de seda de *B. hebetor*, criado sobre o hospedeiro natural *A. kuehniella* e em dieta artificial, possibilitaram visualizar características gerais das regiões (Figuras 5 e 8). Verificou-se que as glândulas de seda são formadas de uma camada unicelular, caracterizada pela presença de duas ou três células justapostas. Limitando externamente a glândula, encontra-se a membrana basal e, na luz, microvilosidades e secreção. Pôde-se verificar que na luz da glândula de seda, na região secretora, dos insetos criados sobre o hospedeiro natural (Figura 5b), há um alto volume de secreção (S) e algum acúmulo dela na região de armazenamento (Figura 5a). Por outro lado, naqueles insetos criados sobre a dieta artificial, foram constatados vestígios de seda (S) na região secretora (Figura 8b), sem nenhum acúmulo na região de armazenamento (Figura 8a).

Cortes ultra-finos (60-70nm) possibilitaram a observação detalhada das regiões descritas anteriormente, tanto para insetos criados sobre o hospedeiro natural, como sobre a dieta artificial.

De um modo geral, a membrana basal (mb) que limita externamente a glândula salivar, apresentou-se bastante delgada para ambos os tratamentos (“*in vivo*” e “*in vitro*”) (Figuras 6a e 9c). Em aumentos maiores (12.000X), verificaram-se duas linhas mais eletrodensas e uma intermediária de menor densidade. Essa estrutura trilaminar é chamada de unidade de membrana (Figura 6a, 7a) (Porter & Bonneville, 1973).

As células apresentaram núcleo grande, com nucléolos bem distintos (Figuras 6ab; 7b; 9ab; 10a). No citoplasma, foram observados os complexos de Golgi dispostos ao redor do núcleo, menos freqüentes na região proximal (armazenamento) (Figuras 6ab; 9d), intensificando-se na região secretora (Figuras 7b; 10a). O retículo endoplasmático rugoso (RER) é bem desenvolvido, formando arranjos no citoplasma (Figuras 6c; 7a; 9c; 10bc) que podem ser observados em toda a extensão da glândula, desde a região apical até a secretora. Em aumentos maiores (12.000-20.000X) os ribossomos e sua relação com as membranas do retículo endoplasmático podem ser bem observadas. Semelhante à membrana citoplasmática, as membranas do retículo

endoplasmático são trilaminares e, neste local, os ribossomos estão aderidos (Figura 9b).

Embora não se tenha observado diferença estrutural nas células das regiões de armazenamento e secretora, dos insetos criados "*in vivo*" e "*in vitro*", foi possível observar presença de secreção de seda na região de armazenamento das glândulas dos insetos criados sobre o hospedeiro natural ("*in vivo*"), e no citoplasma da região de secreção com intensa presença de complexo de Golgi (CG), retículo endoplasmático rugoso (RER) e mitocôndrias (M), indicativos de atividade secretora. Torna-se importante ressaltar que tais características foram igualmente observadas nas glândulas de seda daqueles insetos criados na dieta artificial, excluindo-se o grande volume de secreção, pois foram encontrados apenas vestígios de tal secreção. Nas avaliações do desenvolvimento de *B. hebetor* nas duas condições ("*in vivo*" e "*in vitro*"), foi possível detectar vestígios de seda, ainda que forma desorganizada, naqueles insetos oriundos de dieta artificial conforme observado no item 4.1.1 (Figura 1D-E).

Para observação da atividade secretora das glândulas de seda de *B. hebetor* criado "*in vivo*" e "*in vitro*", foram realizados cortes nas regiões do ducto simples (região de armazenamento) e na região secretora (Figura 4) e contrastados com Azul de Bromofenol (corante para proteína).

Imagens obtidas em microscopia óptica proporcionaram a observação dos mecanismos de secreção. Pôde-se verificar a presença de grandes núcleos e as cromatinas mais intensamente coradas, tanto nas regiões secretoras como na de armazenamento (Figura 11 e 12). Na região secretora foi possível detectar a presença de secreção no lúmen da glândula para insetos criados sobre o hospedeiro natural (Figura 11bcd) enquanto que para os criados na dieta artificial as secreções apresentaram-se menos intensas, porém presentes (Figura 12b).

O processo de secreção inicia-se na região distal da glândula (porção secretora) e é conduzida para a região proximal (armazenamento). A secreção é detectada primeiramente na porção periférica da glândula, próxima às microvilosidades, migrando, posteriormente, para o centro do lúmen (Silva-Zacarin *et al.*, 2003).

Esses resultados, associados à maior concentração de proteínas nas glândulas de seda dos insetos criados "*in vivo*" (5,03µg de proteína/µL da amostra), comparados aos criados "*in vitro*" (2,8 µg de proteína/µL da amostra), dão suporte à hipótese de

deficiência nutritiva da dieta. Acredita-se que em dieta nutricionalmente adequada, as glândulas serão estimuladas a produzir seda, uma vez que não apresentam deformações.

Figura 5-Região proximal do ducto simples (região de armazenamento) (A) e região secretora (B) da glândula de seda de *Bracon hebetor* criado no hospedeiro natural *Anagasta kuehniella*. Idade 96-100 horas (corte semi-fino). À direita observações em microscópio óptico, à esquerda esquema da glândula de seda

Figura 6-Região proximal do ducto simples (região de armazenamento) da glândula salivar de *Bracon hebetor* criado no hospedeiro natural, *Anagasta kuehniella*. Idade 96-100 horas (corte ultra-fino). A) **N**-núcleo; **nu**-nucléolo; **mi**-microvilosidades, **mb**-membrana basal; **S**-secreção; B) **N**-núcleo; **nu**-nucléolo; **CG**-complexo de Golgi; C) **M**-mitocôndria; **RER**-retículo endoplasmático rugoso. Observações em microscópio eletrônico de transmissão (MET)

Figura 7-Região secretora da glândula salivar de *Bracon hebetor* criado no hospedeiro natural, *Anagasta kuehniella*. Idade 96-100 horas (corte ultra-fino). A) mb-membrana basal; B) **N**-núcleo; **nu**-nucléolo; **CG**-complexo de Golgi; C) **mi**-microvilosidades; **S**-secreção; D) **m**-microvilosidades. Observações em microscópio eletrônico de transmissão (MET)

Figura 8-Região proximal do ducto simples (região de armazenamento) (A) e região secretora (B) da glândula salivar de *Bracon hebetor* criado em dieta artificial. Idade 120-124 horas (corte semi-fino). À direita observações em microscópio óptico, à esquerda esquema da glândula de seda

Figura 9-Região proximal do ducto simples (região de armazenamento) da glândula salivar de *Bracon hebetor* criado em dieta artificial. Idade 120-124 horas (corte ultra-fino). A) **N**-núcleo; **nu**-nucleólo; **mb**-membrana basal; B) **N**-núcleo; **nu**-nucleólo; **mi**-microvilosidades; C) **RER**-retículo endoplasmático rugoso; **mb**-membrana basal. Observações em microscópio eletrônico de transmissão (MET)

Figura 10-Região secretora da glândula salivar de *Bracon hebetor* criado em dieta artificial. Idade 120-124 horas (corte ultra-fino). A) **N**-núcleo; **nu**-nucléolo; **CG**-complexo de Golgi; **mb**-membrana basal; B) **RER**-retículo endoplasmático rugoso; **CG**-complexo de Golgi; C) **RER**-retículo endoplasmático rugoso; **M**-mitocôndria; **CG**-complexo de Golgi. Observações em microscópio eletrônico de transmissão (MET)

Figura 11-Cortes transversais, em microscópio óptico, da glândula de seda de *Bracon hebetor* criado no hospedeiro natural, contrastados com Azul de Bromofenol. A- região de armazenamento, BCD- secretora

Figura 12-Cortes transversais, em microscópio óptico, da glândula de seda de *Bracon hebetor* criado em dieta artificial, contrastados com Azul de Bromofenol. A e B – respectivamente região de armazenamento e secretora

4.2 Seleção do hospedeiro alternativo e aspectos nutricionais

4.2.1 Exigências nutricionais do ectoparasitóide *B. hebetor* - aminograma comparado do hospedeiro e da dieta artificial.

A análise de aminoácidos (aminograma) detectou a presença de 17 aminoácidos na hemolinfa do hospedeiro natural (*A. kuehniella*), na dieta artificial e nos quatro hospedeiros alternativos testados (exceto para *Diatraea saccharalis* (F.) (Lep.: Pyralidae) que não apresentou o aminoácido valina) (Tabela 3). Ácido aspártico e ácido glutâmico foram os aminoácidos encontrados em maiores proporções nas diferentes amostras, variando entre 13 e 16% do total.

Segundo Sehnal & Akai (1990), para *Bombyx mori* (L.) (Lep.: Bombycidae) os aminoácidos envolvidos na produção de seda são glicina, alanina, serina e tirosina. As análises mostraram haver uma equivalência nos três primeiros aminoácidos citados para os diferentes hospedeiros testados e para a dieta artificial; entretanto, tirosina foi encontrada em maiores porcentagens na hemolinfa de *A. kuehniella* (10%) e *D. saccharalis* (11%), hospedeiros que também apresentaram maiores porcentagens de indivíduos com casulos, respectivamente 98 e 78%, conforme Magro & Parra (2001) (vide resultados na Tabela 4). As demais amostras apresentaram aproximadamente a metade das proporções observadas em *A. kuehniella* e *D. saccharalis*, variando entre 5 e 6%. *D. saccharalis* apresentou, dentre todas as espécies estudadas, a maior similaridade com os dados observados no hospedeiro natural (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Proporção relativa (%) de aminoácidos presentes na hemolinfa de *Anagasta kuehniella* (hospedeiro natural), *Diatraea saccharalis*, *Anticarsia gemmatalis*, *Heliothis virescens*, *Spodoptera frugiperda* (hospedeiros alternativos) e dieta artificial, para a criação de *Bracon hebetor*

Aminoácidos	Hospedeiros					Dieta artificial
	<i>A. kuehniella</i>	<i>D. saccharalis</i>	<i>A. gemmatalis</i>	<i>H. virescens</i>	<i>S. frugiperda</i>	
Alanina	1,76	1,91	2,04	2,05	1,82	2,48
Arginina	4,82	6,36	6,59	5,06	5,17	5,55
Ác Aspártico	13,22	14,03	10,84	12,09	10,32	13,11
Glicina	3,53	3,26	3,68	5,01	3,52	3,52
Isoleucina	3,52	3,69	2,77	3,54	2,90	4,38
Leucina	7,88	5,99	5,32	6,79	5,77	7,88
Ac Glutâmico	15,19	15,78	16,87	16,23	15,07	16,08
Lisina	6,58	6,72	9,32	9,71	8,76	7,05
Cistina	1,64	1,11	2,33	1,96	1,66	3,51
Metionina	1,65	1,62	1,07	1,57	1,36	1,71
Fenilalanina	5,25	6,51	4,48	4,83	5,01	4,80
Tirosina	10,43	11,11	5,44	5,19	9,13	5,72
Treonina	5,22	5,59	7,23	5,88	6,63	6,15
Prolina	7,69	6,49	7,66	7,25	8,17	5,43
Valina	2,75	0,00	2,98	3,38	2,80	3,08
Histidina	5,80	6,09	6,69	5,12	7,21	3,15
Serina	3,06	3,75	4,69	4,33	4,72	6,41

Comparando os resultados da quantificação proteína e os dados obtidos por Magro & Parra (2001), constata-se que a quantidade de proteína existente no alimento afetou o desenvolvimento de *B. hebetor*, levando a baixas viabilidades de ciclo total para aqueles parasitóides criados em dietas com teores protéicos baixos, como as hemolinfas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lep.: Pyralidae) (69,2 mg/mL), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (151,5 mg/mL), *Heliothis virescens* (Fabricius) (75,5 mg/mL) (ambos Lep. Noctuidae) e a dieta artificial padrão (108,9 mg/mL). Nesses

casos as viabilidades oscilaram entre 10% e 40% (Figura 13; Tabela 4). Corroborando tais conclusões, apenas 40% das pupas de *B. hebetor* apresentaram casulo protetivo nesses substratos (Figura 14, Tabela 4), devido, provavelmente, à deficiência protéica do alimento. Entretanto, quando criado sobre o hospedeiro natural (391,3 mg/mL), *B. hebetor* apresentou viabilidade de 90% e mais de 90% das pupas formaram casulo. Embora *D. saccharalis* não seja hospedeiro natural desse parasitóide, proporcionou viabilidade do ciclo total de 76% e 78% das pupas formaram casulo (Figuras 13, 14; Tabela 4). Esse fato pode ser explicado pela alta concentração de proteína que ocorre na hemolinfa de *D. saccharalis* (329,4 mg/mL).

De modo geral, nos trabalhos de criação “*in vitro*”, as dietas contendo componentes derivados de insetos têm sido aquelas que proporcionam os melhores resultados, devido, provavelmente, à presença de fatores de crescimento necessários ao desenvolvimento de parasitóides. Em muitos casos, tem sido possível a utilização de tecidos derivados de insetos não-hospedeiros, como, por exemplo, o uso de hemolinfa de lagartas ou pupas de lepidópteros [*Galleria mellonella* (L.) (Lep.: Pyralidae), *Manduca sexta* (L.) (Lep.: Sphingidae) e *Antheraea pernyi* (Guérin-Méneville) (Lep.: Saturniidae)] para a criação *in vitro* dos parasitóides do bicudo-do-algodoeiro, *Bracon mellitor* Say (Hym.: Braconidae) e *Catolaccus grandis* (Burks) (Hym.: Pteromalidae) (Guerra, 1992). Esse fato sugere que alguns dos fatores de crescimento necessários ao desenvolvimento de parasitóides são comuns para várias espécies, podendo ser encontrados em insetos de diferentes ordens (Cônsoi & Parra, 2002). Essas substâncias químicas também estão presentes nos diferentes estágios de desenvolvimento do hospedeiro, ou seja, em ovos, larvas e pupas, uma vez que vários parasitóides de ovos foram criados em dietas contendo hemolinfa de larvas ou pupas (Cônsoi & Parra, 1996a, 1997a,b). No entanto, a qualidade do hospedeiro como fonte nutricional para o desenvolvimento do parasitóide em dietas artificiais pode variar com o estágio em que ele se encontra no momento da coleta da hemolinfa/holotécidos, o que pode reduzir a sobrevivência do parasitóide no meio artificial (Cônsoi & Parra, 2000). Ainda, Og & Stanley-Samuelson (1992) ressaltaram a ocorrência de modificações na composição da hemolinfa de um inseto à medida que este continua seu desenvolvimento, podendo haver variações nas concentrações de ácidos graxos (tecidos de armazenamento de energia), conforme as lagartas se desenvolvem, coincidindo com o máximo armazenamento no final de desenvolvimento.

Figura 13-Correlação entre a quantidade de proteína existente em hospedeiros alternativos, natural e dieta artificial e a viabilidade do ciclo total de *Bracon hebetor* (temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$; UR do ar de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas)

Figura 14-Correlação entre a quantidade de proteína existente em hospedeiros alternativos, natural e dieta artificial e a porcentagem de parasitóides (*Bracon hebetor*) que formaram casulo (temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas)

Tabela 4. Duração (dias) e viabilidade do ciclo total (ovo-adulto) e porcentagem de formação de casulos de *Bracon hebetor*, criado em diferentes hospedeiros/substratos com variação na concentração de proteína (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas)

Hospedeiro	[proteína] mg/mL	Duração do ciclo (ovo-adulto) dias*	Viabilidade* (ovo-adulto) %	Formação de casulo %*
<i>A. kuehniella</i>	391,3 $\pm$ 31,40	12,87 $\pm$ 0,08	90,00 $\pm$ 4,47	98
<i>D. saccharalis</i>	329,4 $\pm$ 40,50	13,24 $\pm$ 0,15	76,00 $\pm$ 5,10	78
<i>H. virescens</i>	75,5 $\pm$ 4,50	13,44 $\pm$ 0,25	9,99 $\pm$ 5,48	43
Dieta artificial	108,9 $\pm$ 51,44	16,66 $\pm$ 0,21	43,07 $\pm$ 4,70	40
<i>S. frugiperda</i>	151,5 $\pm$ 37,20	12,52 $\pm$ 0,31	21,99 $\pm$ 9,16	25
<i>A. gemmatalis</i>	69,2 $\pm$ 9,30	12,28 $\pm$ 0,21	27,99 $\pm$ 9,69	30

*Dados obtidos de trabalho preliminar (Magro & Parra, 2001)

4.2.2 Histoquímica do conteúdo intestinal do ectoparasitóide larval *B. hebetor* criado “*in vivo*” e “*in vitro*”

Cortes semi-finos (3 μm) do aparelho digestivo de *B. hebetor* possibilitaram a observação do conteúdo ingerido, podendo-se verificar que aqueles que se alimentaram na dieta artificial (Figura 15B) continham material mais fino, pouco granuloso e sem vesículas grandes (apenas pequenas); por outro lado, aqueles que se alimentaram sobre o hospedeiro (lagartas de 5º instar de *A. kuehniella*) continham grandes vesículas no lúmen (Figura 15A). Quando os cortes foram contrastados para proteína e lipídios, verificou-se significativa diferença entre aqueles insetos criados na dieta artificial e no hospedeiro, sendo observada alta concentração de lipídios naqueles criados “*in vivo*” (Figura 15E). A criação “*in vitro*” proporcionou alta proporção de proteína (Figura 15D) com pequenas vesículas de lipídios (Figura 15F).

Canavoso *et al* (2001) descreveram que a maioria dos insetos exige uma dieta rica dos ácidos graxos poli-insaturados e relataram que, segundo vários autores, tanto

o ácido linolênico como o linoléico satisfazem adequadamente essa necessidade. Entretanto, a exigência de ácidos graxos essenciais pode diferir substancialmente de espécie para espécie. Para Hymenoptera parasítica, a aquisição desses ácidos graxos se dá pela ingestão do seu hospedeiro. O ectoparasitóide coinobionte *Euplectrus separatae* (Hym.: Eulophidae) parasita lagartas de *Pseudaletia separata* Walker (Lep.: Noctuidae) e cresce ingerindo sua hemolinfa que contém alta concentração de lipídios, acrescida pela injeção de veneno da fêmea antes do parasitismo (Nakamatsu & Tanaka, 2003; 2004). Norullahoğlu *et al* (2004) trabalhando com o parasitóide coinobionte, *Apanteles galleriae* Wilkinson (Hym.: Braconidae) pesquisaram a quantidade de lipídios presente no hospedeiro e no parasitóide e verificaram que a quantidade total de ácidos graxos presente nas larvas do parasitóide foi significativamente maior do que aquela observada para lagartas hospedeiras parasitadas ou não. Para este caso, não foi verificado efeito do veneno no aumento da proporção de lipídios na hemolinfa do hospedeiro e os ácidos palmítico, palmitoleico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico representaram 68% do total de ácidos graxos em lagartas de *Achroia grisella* (F.) (Lep.: Pyralidae).

Assim, fica caracterizada a importância dos componentes protéicos e lipídicos para o desenvolvimento do ectoparasitóide larval *B. hebetor* em dietas artificiais, buscando aproximar o sistema “*in vitro*” daquele representado pelas lagartas hospedeiras (sistema “*in vivo*”).

Figura 15-Cortes do intestino médio de *Bracon hebetor* criado "in vivo" (A) e "in vitro" (B). Cortes C e D contrastados para proteína e E e F contrastados para lipídios, respectivamente para insetos criados "in vivo" e "in vitro". As setas indicam as vesículas de lipídios

4.3 Caracterização das enzimas digestivas de *B. hebetor*

4.3.1 Ensaios enzimáticos

A atividade de algumas enzimas digestivas foi investigada em homogeneizados intestinais de *B. hebetor* (Tabela 5), tanto para insetos criados sobre o hospedeiro natural quanto para os criados em dieta artificial.

Observa-se que as atividades das enzimas testadas distribuem-se na fração solúvel dos homogeneizados (sobrenadante), ou em alguns casos, as atividades estão distribuídas tanto na fração solúvel como na fração de membrana (sedimento). É interessante notar que a atividade de aminopeptidase localiza-se predominantemente na fração de membrana, conforme descrito para vários insetos (Terra & Ferreira, 1994).

Dentre as proteinases testadas, foram encontradas atividades de tripsina, determinada pela hidrólise de ZFRMCA e BAPA, quimotripsina quantificada pela hidrólise de Suc-AAF-MCA e cisteína proteinase quantificada pela hidrólise de ϵ -NH₂-csb-C-MCA. Tripsina foi principalmente localizada na fração solúvel, sendo esta enzima mais ativa sobre Z-FR-MCA do que sobre BAPA; assim, o primeiro foi escolhido como substrato para tripsina para as demais determinações. Quimotripsina e cisteína proteinase são encontradas na porção solúvel ou distribuídas igualmente entre a porção solúvel e a de membrana, respectivamente.

Os ensaios foram realizadas em pelo menos quatro períodos diferentes de tempo e as razões iniciais de hidrólise foram calculadas. Uma unidade de atividade (U) é definida como a quantidade de enzima que catalisa a clivagem de 1 μ mol de substrato ou ligação por minuto. BAPA: alfa-N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida.

Tabela 5. Atividade de diferentes enzimas digestivas presentes no intestino médio de *Bracon hebetor*

Enzima	Atividade (mU/inseto)		Atividade (mU/inseto)	
	(hospedeiro)		(dieta)	
	Sobrenadante	Sedimento	Sobrenadante	Sedimento
Amilase	4	2	3	3
Maltase	1	0,5	0,3	2
Aminopectidase	0,6	2	1	2
Carboxipeptidase	0,7	0,3	0,1	4
Dipeptidase	5	0,8	1	0,1
Tripsina (ZFRMCA)	6600	1000	6650	200
Tripsina (BAPA)	2	0,1	2	0,1
Quimotripsina	16	2	5	2
Cys-proteinase	2	2	0,5	6
Caseína FITC	0,3	0,05	0,3	0,04

4.3.2 Identificação das proteinases intestinais em *B. hebetor* - Cromatografias

As frações resultantes da cromatografia de troca iônica em coluna High Q, em sistema de baixa pressão, realizada com amostras de homogeneizado intestinal de *B. hebetor*, criado sobre o hospedeiro natural e em dieta artificial, foram ensaiadas com um substrato protéico fluorescente – caseínaFITC– e com o substrato sintético fluorescente: Z-FR-MCA (mais específico para tripsina, nas condições ensaiadas). O tampão utilizado nos ensaios foi Tris-HCl 100mM pH 8,0. Outros substratos sintéticos

como Suc-AAF-MCA (específico para serina-proteinases, como quimotripsina) e ϵ -NH₂-csb-C-MCA (específico para cisteína-proteinases) não foram utilizados nesta análise pelo fato dos materiais apresentarem pouca atividade sobre esses dois compostos em experimentos anteriores ao de cromatografia.

Analisando-se os perfis de atividade sobre caseínaFITC, nota-se a presença de três picos (picos 1, 2 e 3) (Figura 16), sendo o pico 1 majoritário em atividade em relação aos demais; para *B. hebetor* criado na dieta destacaram-se dois picos (Figura 18). O perfil de atividade sobre Z-FR-MCA mostra um grande pico de atividade (pico 4) (Figuras 17 e 19), cuja área coincide com os picos 1 e 2 sobre caseínaFITC. A presença de SBTI inibe praticamente toda a atividade enzimática sobre ambos os substratos utilizados (tanto para inseto criados “*in vivo*” como para aqueles criados “*in vitro*”), sugerindo a ocorrência de pelo menos três populações de serina-proteinases do tipo tripsina no tubo digestivo de *B. hebetor* criado sobre hospedeiro e duas naqueles criados em dieta artificial. A presença de benzamidina provoca uma diminuição de aproximadamente 20% da atividade proteolítica sobre caseínaFITC, e de cerca de 80% na atividade sobre Z-FR-MCA. Esta diferença significativa de inibição das atividades sobre um substrato protéico (caseínaFITC) e sobre Z-FR-MCA, o qual apresenta apenas dois resíduos de aminoácidos por benzamidina (inibidor competitivo de tripsina), deve estar relacionada às diferenças de afinidade em relação aos diferentes substratos, sendo esta maior, quanto maior o substrato (Figuras 16, 17, 18 e 19). A presença de quimostatina ocasiona alguma alteração nos perfis de atividade sobre caseínaFITC. No entanto, a atividade de quimotripsina determinada nas preparações de *B. hebetor* alimentado sobre o hospedeiro e em dieta artificial é baixa, sendo estas variações menos significativas em relação às verificadas com a utilização de outros inibidores, que indicam que a atividade majoritária corresponde a enzimas do tipo tripsina. Quando E-64 é acrescentado ao ensaio com Z-FR-MCA nota-se uma diminuição geral da atividade de cerca de 60% nos insetos criados no hospedeiro natural, o que poderia evidenciar a presença de cisteína-proteinases, visto que esse substrato pode ser clivado por essa classe de enzimas (Cristofaletti *et al.*, 2003). Nos insetos criados em dieta a diminuição da área do mesmo pico é menor. Entretanto, o mesmo fenômeno não é observado sobre caseínaFITC. Como citado anteriormente, observou-se baixa atividade sobre ϵ -NH₂-csb-C-MCA utilizando-se homogeneizados intestinais de *B. hebetor*, se esta é comparada a atividades específicas de outros

insetos, sobre este substrato. Em seu trabalho, Novillo *et al.* (1997) mostraram que E-64, conhecido inibidor irreversível de cisteína-proteinases, foi capaz de inibir a hidrólise de três substratos sintéticos (comumente usados para tripsina) e de dois substratos protéicos (azocaseína e azoalbumina) por enzimas semelhantes à tripsina em várias lagartas de lepidópteros. A baixa atividade sobre o substrato específico para cisteína proteinases e o conjunto de dados de inibição: inibição por SBTI, benzamidina e TLCK (modificador químico de tripsina), indicam que a atividade proteolítica majoritária no intestino de *B. hebetor* deve-se a enzimas do tipo tripsina e que estas são inibidas por E-64. As diferenças de inibição por E-64, verificadas nas atividades sobre o substrato protéico e sobre o substrato sintético devem estar relacionadas a diferenças de afinidades, como discutido anteriormente para a inibição de benzamidina. Testes preliminares realizados na presença de pepstatina e de homogeneizados intestinais de *B. hebetor* não mostraram efeito sobre a atividade proteolítica de *B. hebetor* sobre caseínaFITC, indicando a ausência de aspártico-proteinases no tubo digestivo desse inseto. Essas observações estão de acordo com os resultados obtidos por Baker & Fabrick (2000).

Os mecanismos de digestão e absorção podem determinar se um substrato alimentar será ou não utilizado com sucesso pelo inimigo natural (Yazlovetsky, 1992 citado por Cònsoli & Parra, 2002). Essa característica foi evidenciada na tentativa de se criar *Podisus maculiventris* (Say) (Het.: Pentatomidae) em dietas artificiais previamente desenvolvidas para a criação de crisopídeos e parasitóides que apresentavam proteínas de origem bacteriana [*Acinetobacter calcoaceticus* (Beijerinck)] como principal fonte protéica (Sumenkova & Yazlovetsky, 1992). A inabilidade desse predador em digerir as proteínas foi atribuída à reduzida taxa de hidrólise das enzimas em suas glândulas salivares ou em seu tubo digestivo. Estudos subseqüentes demonstraram a ocorrência de enzimas do tipo catepsina nas glândulas salivares de ninfas de *P. maculiventris* e *Perillus bioculatus* (Fabr.) (Het.: Pentatomidae), enquanto enzimas do tipo tripsina são as comumente identificadas em outras espécies de Heteroptera predadores (Cohen, 1993).

Assim, a determinação das propriedades das enzimas envolvidas no processo digestivo, associada à estimativa da taxa de hidrólise de nutrientes de peso molecular elevado (proteínas, polissacarídeos, ácidos nucléicos), permite avaliar a taxa de absorção de tais nutrientes, o que facilita a identificação de componentes alternativos

que sejam metabolizados e absorvidos durante o processo digestivo do inimigo natural (Yazlovetsky, 1992, citado por Cnsoli & Parra, 2002).

Figura 16-Cromatografia de troca iônica em coluna High Q de homogeneizado intestinal de *Bracon hebetor* criado sobre o hospedeiro natural. Substrato para proteinase total: CasFITC

Figura 17-Cromatografia de troca iônica em coluna High Q de homogeneizado intestinal de *Bracon hebetor* criado sobre o hospedeiro natural. Substrato para tripsina: ZFRMCA

Figura 18-Cromatografia de troca iônica em coluna High Q de homogeneizado intestinal de *Bracon hebetor* criado na dieta artificial. Substrato para proteinase total: CasFITC

Figura 19-Cromatografia de troca iônica em coluna High Q de homogeneizado intestinal de *Bracon hebetor* criado na dieta artificial. Substrato para tripsina: ZFRMCA

4.3.3 Inibidores de proteinases presentes na hemolinfa de lepidópteros

A hemolinfa é, via de regra, o principal componente de uma dieta artificial para parasitóides (Xie *et al.*, 1986; Li, 1992; Guerra, 1992; Parra & Cònsoli, 1992; Cònsoli & Parra, 1997b). Assim, o conhecimento da presença ou ausência de inibidores para enzimas digestivas desses parasitóides, passa a ser um elemento essencial para a seleção desse componente.

Ensaio realizados a partir da hemolinfa de *A. kuehniella*, *D. saccharalis*, *H. virescens*, *S. frugiperda*, *A. gemmatilis* e *A. ipsilon* na presença de substrato específico para tripsina e de enzima digestiva do parasitóide *B. hebetor*, proporcionaram o reconhecimento da “qualidade” da hemolinfa visando a sua seleção para o aprimoramento de dietas artificiais (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito da hemolinfa de diferentes espécies de lepidópteros (lagartas), na atividade enzimática tripsina (ZFRMCA), em homogeneizados intestinais de *Bracon hebetor* criado sobre o hospedeiro natural, *Anagasta kuehniella* e em dieta artificial

Tratamentos	Tripsina (ZFRMCA) %			
	Hospedeiro		Dieta	
	Atividade mU/inseto	%	Atividade mU/inseto	%
<i>Anagasta kuehniella</i>	5737 ± 328	100 ab	8529 ± 241	100 b
<i>Diatraea saccharalis</i>	5933 ± 216	103 a	8226 ± 229	96 b
<i>Spodoptera frugiperda</i>	5170 ± 602	90 ab	8173 ± 168	96 b
<i>Heliothis virescens</i>	4725 ± 179	82 ab	8221 ± 474	96 b
<i>Anticarsia gemmatilis</i>	4772 ± 381	83 ab	8490 ± 136	99,5b
<i>Agrotis ipsilon</i>	4324 ± 291	75 b	11717 ± 698	137,4a

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

Não houve diferença estatística para inibição da tripsina digestiva de *B. hebetor* quando esta foi incubada junto a diferentes hemolinfas de lepidópteros (Tabela 6) (considerando como controle o hospedeiro natural, *A. kuehniella*), tanto para os insetos criados “*in vivo*” como “*in vitro*”, com exceção dos valores observados para a atividade de tripsina do homogeneizado intestinal de *B. hebetor* criado na dieta artificial, na presença de hemolinfa de *A. ipsilon*. Contudo, em termos percentuais, observou-se que quando os insetos são criados sobre seu hospedeiro natural (*A. kuehniella*), ocorrem reduções de 10 a 25% da atividade de tripsina, na presença das hemolinfas de *H. virescens*, *A. gemmatalis* e *A. ipsilon*. Quando se compara esse resultado com aqueles obtidos em insetos que foram criados em dieta artificial (com 40% de holotécidos pupais de *D. saccharalis*) observa-se uma pequena variação no efeito inibitório das hemolinfas sobre a hidrólise de ZFRMCA (menor que 4%) e uma ativação de 37% na presença da hemolinfa de *A. ipsilon*. Esse fato evidencia a presença de tripsinas de diferentes especificidades, quando o inseto é submetido a uma alimentação diferente da padrão. A separação parcial das diferentes atividades de tripsina foi obtida pela utilização de cromatografia de troca iônica e cromatografia hidrofóbica, em coluna Resource Q e Resource_Phe, respectivamente, em sistema de alta pressão. Na cromatografia em Resource Q foram observados três picos de atividade sobre ZGGRMCA para insetos criados no hospedeiro e quatro picos de atividade sobre o mesmo substrato, para aqueles criados na dieta artificial (Figura 20). Já na cromatografia hidrofóbica, houve a separação de muitos picos diferentes de atividade de tripsina na amostra com os homogeneizados intestinais de *B. hebetor* criado em dieta artificial, comparados aos picos de atividade presentes na amostra de homogeneizado intestinal de *B. hebetor* criado sobre o hospedeiro (Figura 21), reforçando os indícios anteriores de que há uma alteração do padrão de tripsinas expressas com a alteração da dieta alimentar.

O efeito inibitório das hemolinfas dos diferentes lepidópteros foi testado sobre tripsina bovina e tripsina purificada de *Periplaneta americana* (L.), utilizando-se ZGGRMCA como substrato. A tripsina bovina foi inibida principalmente pelas hemolinfas de *H. virescens*, *A. gemmatalis* e *A. ipsilon*, enquanto que a tripsina de *P. americana* foi inibida pela presença de todas as hemolinfas, em taxas semelhantes à observada quando se utilizou SBTI (Tabela 7).

Pesquisas recentes relatam a presença de inibidores de enzimas digestivas na hemolinfa de insetos (Jiang & Kanost, 2000).

Tabela 7. Efeito da hemolinfa de diferentes espécies de lepidópteros (lagartas), na atividade enzimática tripsina (ZGGRMCA), na presença de tripsinas bovina e purificadas de *Periplaneta americana*

Tratamentos	Tripsina (ZGGRMca) %			
	Bovina		<i>P. americana</i>	
	Atividade mU/mL	%	Atividade mU/mL	%
Controle (água)	5910500	100	41300	100
Controle (SBTi)	50150	0,85	984	2,4
<i>Anagasta kuehniella</i>	8164050	138	15548	37,7
<i>Diatraea saccharalis</i>	8458250	143	1684	4,1
<i>Spodoptera frugiperda</i>	5935800	100	2980	7,2
<i>Heliothis virescens</i>	1573400	26	2172	5,3
<i>Anticarsia gemmatilis</i>	5209250	88	12789	31
<i>Agrotis ipsilon</i>	1929750	33	1943	4,7

Figura 20-Atividade enzimática de homogeneizados intestinais de *Bracon hebetor* criado sobre o hospedeiro natural (*Anagasta kuehniella*) e em dieta artificial, resultante de cromatografia Resource Q, submetidos ao substrato ZGGRMca – específico para enzimas do tipo tripsina

Dentre todas as espécies estudadas, desconsiderando o hospedeiro natural, a espécie *D. saccharalis* foi a que apresentou maior concentração de proteína em sua hemolinfa (Tabela 8), resultando em maior viabilidade (76,0%) e maior porcentagem de formação de casulos (78%) (dados descritos por Magro & Parra, 2001) e dessa forma, associado à ausência de inibidores de tripsina para o parasitóide, a hemolinfa de lagartas de 5º instar de *D. saccharalis* foi selecionada como principal elemento para a composição das dietas artificiais a serem testadas para *B. hebetor*.

De modo geral, nos trabalhos de criação “*in vitro*”, as dietas contendo componentes derivados de insetos têm sido as que proporcionam os melhores resultados, devido, provavelmente, à presença de fatores de crescimento necessários ao desenvolvimento de parasitóides. Em muitos casos, tem sido possível a utilização de tecidos derivados de insetos não-hospedeiros, como, por exemplo, o uso de hemolinfa de lagartas ou pupas de lepidópteros (*G. mellonella*, *M. sexta* e *A. pernyi*)

para a criação *in vitro* dos parasitóides do bicudo-do-algodoeiro, *B. mellitor* e *C. grandis* (Guerra, 1992). Esse fato sugere que alguns dos fatores de crescimento necessários ao desenvolvimento de parasitóides são comuns para várias espécies, podendo ser encontrados em insetos de diferentes ordens (Cônsoli & Parra, 2002). Essas substâncias químicas também estão presentes nos diferentes estágios de desenvolvimento do hospedeiro, ou seja, em ovos, larvas e pupas, uma vez que vários parasitóides de ovos foram criados em dietas contendo hemolinfa de larvas ou pupas (Cônsoli & Parra, 1996b, 1997a,b). No entanto, a qualidade do hospedeiro como fonte nutricional para o desenvolvimento do parasitóide em dietas artificiais pode variar com o estágio em que ele se encontra no momento da coleta da hemolinfa/holotécidos, o que pode reduzir a sobrevivência do parasitóide no meio artificial (Cônsoli & Parra, 2000).

Figura 21-Atividade enzimática de homogeneizados intestinais de *Bracon hebetor* criado sobre o hospedeiro natural (*Anagasta kuehniella*) e em dieta artificial, resultante de cromatografia hidrofóbica Resource_Phe, submetidos ao substrato ZGGRMca – específico para enzimas do tipo tripsina

Tabela 8. Concentração de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) na hemolinfa de seis espécies de lepidópteros (método de Bradford, 1976)

Tratamentos	Concentração de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
<i>Anagasta kuehniella</i>	$391,3 \pm 31,40$
<i>Diatraea saccharalis</i>	$329,4 \pm 40,50$
<i>Spodoptera frugiperda</i>	$151,5 \pm 37,20$
<i>Heliothis virescens</i>	$75,5 \pm 4,50$
<i>Anticarsia gemmatilis</i>	$69,2 \pm 9,30$
<i>Agrotis ipsilon</i>	$224,4 \pm 57,20$

4.4 Avaliação dos ínstaras larvais e do consumo de alimento para *B. hebetor*

Foram caracterizados 3 ínstaras para o desenvolvimento larval de *B. hebetor*, definidos pelo comprimento das mandíbulas do parasitóide (Figuras 22 e 23).

Insetos criados sobre o hospedeiro natural tiveram o 1º ínstar larval nas primeiras 24 de alimentação. A partir desse período, as observações indicaram início do 2º ínstar larval, com duração de 12 horas. O 3º ínstar iniciou-se 36 horas após a eclosão das larvas, e com 60 horas ocorreu o início do abandono do hospedeiro, correspondendo, portanto, a 24 horas de duração. Nesse período, o parasitóide acumulou 93,3% do peso adquirido durante toda a fase larval (Tabela 9 e Figura 24). Para aqueles insetos criados sobre a dieta artificial, o desenvolvimento foi alongado, observando-se já no 1º ínstar um alongamento de 12 horas, comparando-se aos criados sobre o hospedeiro natural, o 2º ínstar iniciou-se somente 36 horas após a eclosão, com duração de 12 horas (Figura 23). O início do terceiro ínstar ocorreu 48 horas após a eclosão das larvas (12 horas após aqueles insetos que foram criados sobre o hospedeiro natural), sendo observado o início do abandono da dieta apenas 84 horas após a eclosão, com uma duração média de 36 horas (12 horas a mais que aqueles criados no hospedeiro natural).

Observou-se que os insetos criados sobre o hospedeiro natural apresentaram ganho de peso mais rápido do que aqueles que se desenvolveram em dieta artificial, sendo detectado que após 24 da eclosão, aqueles criados “*in vivo*” já apresentavam 6,7% do seu peso final, enquanto que os desenvolvidos “*in vitro*” responderam por 1,7%, ou seja, 4 vezes menores do que os provenientes do controle. O maior ganho de peso ocorreu entre 36 e 48 horas, quando os parasitóides criados sobre o hospedeiro natural, passaram de 25% para 96% do peso final. A fase larval foi completada 60 horas após a eclosão, quando o peso larval chegou a 2,25mg. Resposta semelhante foi observada para os insetos criados na dieta artificial; contudo, o tempo de ingestão foi maior do que o relatado anteriormente. Para este caso, os insetos passaram dos 18% observados com 36 horas, para 86%, 60 horas após a eclosão. Os insetos criados na dieta artificial atingiram o peso máximo, 72 horas após a eclosão (2,93mg) e, 12 horas após, quando já não se alimentavam mais, chegaram a perder 5% do peso (Figura 24), sendo que os insetos criados na dieta artificial apresentaram-se mais pesados do que aqueles criados no hospedeiro natural. O alongamento do ciclo para insetos criados em dietas artificiais, pode demonstrar, por um lado, inadequação ou deficiência nutricional da dieta e, por outro, adaptação dos insetos à nova fonte nutricional. Esses dados se correlacionam com os observados no item 7.3, onde se verificou que para adaptação dos parasitóides sobre a dieta básica (holotecidos pupais de *D. saccharalis*) houve o “desenvolvimento” de diferentes tripsinas caso este que pode, em parte, explicar o alongamento do ciclo, particularmente no primeiro ínstar, podendo ser atribuído a um “custo adaptativo”.

Apesar do alongamento da fase larval, comparando-se entre as dietas, o desenvolvimento de *B. hebetor* não foi alterado pela presença do corante (Figura 25). Baseado no valor de absorbância obtido a partir da leitura em Spectra Max Plus (523nm), pôde-se calcular e demonstrar que *B. hebetor* consome em média 3,77 μ L de dieta artificial, valor aproximadamente 1,9 vezes maior que o volume final de seu intestino (2 μ L), em 84 horas (tempo da duração de larvas recém eclodidas até o abandono da dieta – início da pré-pupa) de alimentação contínua.

Comparando-se o consumo de amarante (tendo em vista que todo o corante ingerido é retido no todo digestivo dos insetos) e o peso final das larvas (2,93mg), tem-se que cerca de 20% do ingerido é perdido por transpiração [não há perda por fezes,

haja vista que os himenópteros parasíticos apresentam intestino cego, liberando os excrementos apenas após a pupação (mecônia)].

Esse resultado, além de dar a indicação do volume ideal de dieta a ser oferecido por número de ovos inoculados nas dietas artificiais, também permite concluir que aqueles insetos criados sobre o hospedeiro natural, que se alimentam por 60 horas consecutivas sobre lagartas de 5º ínstar de *A. kuehniella*, considerando o mesmo fluxo de alimentação, têm maior aproveitamento do alimento ingerido, pois, proporcionalmente em relação ao tempo, eles ingerem 2,69uL de hemolinfa (o peso observado foi de 2,25mg); outra consideração a ser feita é que a hemolinfa de *A. kuehniella* tem 391,3µg de proteína/µL de amostra, com relação aos 108,9µg observados na dieta artificial.

Assim, é possível concluir que a duração do ciclo também pode estar associada à qualidade da dieta artificial. O aumento na duração da fase larval, com conseqüente maior período de ingestão, parece indicar uma dieta de baixa qualidade nutricional.

Figura 22-Mandíbulas de *Bracon hebetor*, utilizadas para determinação dos ínstares de larvais do parasitóide. Preparação fenol e Hoyer's, observações em microscópio óptico. Detalhe indica a medida em µm

Figura 23-Médias dos comprimentos (μm) das mandíbulas de *Bracon hebetor*, em diferentes tempos de amostragem, para insetos criados “*in vivo*” (A) e “*in vitro*” (B) (temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas). O conjunto de dados, dentro das elipses, representa os respectivos instares larvais

Tabela 9_Comprimento da mandíbula (intervalo de variação) e razão de crescimento de *Bracon hebetor* criado em dieta artificial e sobre o hospedeiro natural (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas)

Ínstares	Hospedeiro natural		Dieta artificial	
	Mandíbula (comprimento μm)	razão	Mandíbula (comprimento μm)	razão
1	29,5 $\pm$ 0,58 (20,8 – 36,3)	-	30,80 $\pm$ 0,65 (26,6 – 36,9)	-
2	50,42 $\pm$ 0,84 (47,2 – 55,5)	1,71	41,91 $\pm$ 0,63 (38,7 – 45,7)	1,33
3	61,99 $\pm$ 0,99 (56,4 – 68,5)	1,59	60,59 $\pm$ 0,37 (55,8 – 66,54)	1,45
R²		100%		100%

Figura 24-Ganho acumulado de peso (%) durante o desenvolvimento larval de *Bracon hebetor* criado em dieta artificial (“*in vitro*”) e sobre o hospedeiro natural (“*in vivo*”) (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas)

Figura 25-Dieta artificial para a criação de *Bracon hebetor*. A e B – com e sem corante “Amarante”, respectivamente

4.5 Comparação de dietas artificiais para a criação de *B. hebetor*

Comparando-se hemolinfa (conforme seleção realizada nos itens 4.3.3) e holotécidos pupais de *D. saccharalis* para a criação de *B. hebetor* em dieta artificial, verificou-se que não houve efeito do componente de inseto na viabilidade do ciclo total e na porcentagem de casulos formados (Tabela 10). Para outros casos estudados houve efeito da idade das pupas quando estas foram utilizadas para a criação “*in vitro*” de *Trichogramma* sp. (Cônoli, 1997); por outro lado, Consoli & Parra (2002) citaram que em diversos casos, o componente de inseto adotado na dieta artificial para parasitóides pode ser obtido de uma espécie não hospedeira do inimigo natural.

Como na presente pesquisa não houve variação entre os componentes de insetos (holotécidos ou hemolinfa), optou-se, nos demais testes experimentais, pela utilização de holotécidos pupais (hnp) de *D. saccharalis*, pela facilidade de manuseio e obtenção.

Tabela 10. Efeito do componente de inseto utilizado na dieta sobre a viabilidade do ciclo total (ovo-adulto) e a formação de casulos em *Bracon hebetor* (temperatura de 25±2°C; UR do ar de 70±10% e fotofase de 14 horas)

Tratamento*	Viabilidade ciclo total (%)	Formação de casulo (%)
Dieta A	41,9 ± 4,27 NS	48,8 ± 7,75 NS
Dieta B	45,5 ± 8,07 NS	41,3 ± 9,93 NS

*Composição das dietas A – 65% holotécidos pupais de *D. saccharalis*; 18% de gema de ovo; 8,5% de soro fetal bovino e 8,5% de hidrolisado de lactalbumina. B – idem a dieta A, substituindo-se holotécidos pupais por hemolinfa de lagartas de 5º instar de *D. saccharalis*. Médias comparadas pelo Teste *t* (P<0,05).

Quando foram adicionadas diferentes fontes protéicas na dieta básica (item 3.2 – Tabela 2) para a criação “*in vitro*” de *B. hebetor*, observou-se efeito no desenvolvimento larval e na capacidade de formação de casulos pelo parasitóide.

Dessa forma constatou-se que 3% de soroalbumina (dieta 11), 0,4% de alanina ou betaína (respectivamente para as dietas 13 e 12) e 8,5% de hidrolisado de lactoalbumina e de soro fetal bovino (dieta 8) proporcionaram viabilidades larvais ente 55% e 60% e portanto semelhantes àquela observada quando os insetos foram criados “*in vivo*”, com 87,3% (Tabela 11). Quando *B. hebetor* foi criado na dieta básica (dieta 2- com 40% de holotecdos pupais de *D. saccharalis*, 20% de gema de ovo, 20% de leite semi-desnatado, 10% de mistura de sais de Neisenheimer e 10% de água) observou-se viabilidade da fase larval de 25,6%. Este valor foi significativamente menor do que aqueles observados no controle (hospedeiro natural) e na dieta 11, sendo estatisticamente semelhante ao demais.

As avaliações para o ciclo total (ovo-adulto) apresentaram a mesma tendência. Assim, verificou-se semelhança nos resultados quando os insetos foram criados sobre o hospedeiro natural (lagartas de 5º ínstar de *A. kuehniella*), com 71,5%, e as dietas 11, 12 e 13, que apresentaram respectivamente valores de 51,6; 47,9 e 46,5% de viabilidade para o ciclo total. Contudo, desses resultados, apenas o controle e as dietas 11 e 13 diferiram dos resultados observados quando o parasitóide foi criado na dieta básica, com viabilidade do ciclo total de 21,8%.

Dessa forma tem-se que dietas enriquecidas com diferentes fontes de proteína, tais como soroalbumina (dieta 11), betaína (dieta 12), ou com o aminoácido alanina (dieta 13) proporcionaram maiores viabilidades ao desenvolvimento do ectoparasitóide *B. hebetor*, melhorando significativamente os resultados obtidos quando os insetos foram criados na dieta básica (40% holotecdos pupais de *D. saccharalis*, 20% de gema de ovo, 20% de leite semi-desnatado, 10% de mistura de sais de Neisenheimer e 10% de água – dieta 2).

Quanto à formação de casulos, verificou-se semelhança entre as dietas, sendo todas estatisticamente inferiores aos 96,4% observados quando os insetos foram criados no hospedeiro natural (Tabela 11). Entretanto pôde-se observar superioridade numérica quando *B. hebetor* foi criado nas dietas 1, 10 e 11, com 48,7; 49,2 e 51,6% de pupas com casulo, respectivamente. Assim, essas dietas proporcionaram aumento variável entre 60 e 69% na capacidade de formação de casulo, em relação à dieta básica (dieta 2), que originou 30,6% dos insetos com casulos.

Analisando-se a importância das diferentes fontes de proteína testadas na porcentagem de formação casulos, verificou-se que a dieta 1 (65% de holotecdos

pupais de *D. saccharalis*, 8,5% de soro fetal bovino e 8,5% de hidrolisado de lactoalbumina) proporcionou resultado semelhante àquela que continha apenas 60% de holotecidos pupais de *D. saccharalis* e 10% de leite semi-desnatado (dieta 9). Ainda constatou-se que quando soro fetal bovino e hidrolisado de lactoalbumina foram acrescidos a uma dieta com 40% de holotecidos pupais de *D. saccharalis* (dieta 8), não houve incremento na capacidade de formação de casulos. Essa associação reforça a hipótese da importância nutricional do componente de insetos nas dietas para este ectoparasitóide.

Betaína, na concentração final de 2% foi tóxica para o desenvolvimento de *B. hebetor*, pois nessa concentração não foi observada formação de casulos e a viabilidade do ciclo total foi de apenas 7,8% (dieta 5). Caseína e soroalbumina em baixas concentrações (0,20 e 0,75%, respectivamente para as dietas 3 e 4) e alanina (0,4% da concentração final – dieta 13) levaram a resultados semelhantes aos observados na dieta 2 (dieta básica), com baixa viabilidade e pequeno percentual de formação de casulos.

As dietas 6 e 7, que apresentavam em sua composição 2% (concentração final) dos aminoácidos alanina e tirosina, respectivamente (Tabela 2), embora com elevada porcentagem de eclosão das larvas do parasitóide, levaram a 100% de mortalidade larval. Provavelmente, nessa concentração esses aminoácidos foram tóxicos, já que na concentração de 0,4% (dietas 13 e 14, respectivamente) promoveram o desenvolvimento de *B. hebetor* (Tabela 11).

A análise de agrupamento ("cluster Analysis"), que levou em consideração a viabilidade larval e do ciclo total e a porcentagem de formação de casulo, proporcionou a distinção de três "clados" (ramos) (Figura 26), sendo um composto pelas dietas 2 (básica), 3, 4 e 14 com valores de 30 a 39% de formação de casulos e viabilidade larval reduzida (20 a 36%); o segundo grupo foi composto pelas dietas enriquecidas com hidrolisado de lactoalbumina e soro fetal bovino (8,5% cada), 0,4% de betaína ou alanina (dietas 8, 12 e 13, respectivamente), que apresentaram reduzida porcentagem de formação de casulo (menor que 20%), porém incremento significativo na viabilidade larval e do ciclo total (Tabela 10). O terceiro grupo (dietas 1, 11 e 10) apresentaram cerca de 50% de pupas com casulo, sendo 65% de holotecidos pupais, hidrolisado de lactoalbumina, soro fetal bovino, soroalbumina e caseína suas principais fontes protéicas.

Alanina e tirosina são aminoácidos importantes para a formação de seda (Sehnal & Akai, 1990); contudo, a adição desses componentes em doses elevadas (2% da concentração final) comprometeu a viabilidade dos parasitóides e na concentração de 0,4% não alterou o percentual de casulos de seda formados. Por outro lado, os dados observados nessa pesquisa assemelham-se aos obtidos por Gomes (2002) que quantificou proteínas em pupas do parasitóide *Trichogramma pretiosum* Riley (Hym.: Trichogrammatidae) e verificou que pupas oriundas de meios artificiais enriquecidos com caseína apresentaram até 18% mais proteína, comparadas àquelas oriundas da dieta considerada padrão (sem caseína), levando inclusive à maior porcentagem de emergência e de adultos normais. No mesmo trabalho, a autora comparou hemolinfa e holotécidos pupais, presentes nas dietas artificiais, no aproveitamento de aminoácidos pelo parasitóide e constatou que os holotécidos pupais de *Mamestra brassicae* (L.) (Lep.: Noctuidae) foram mais eficientes do que sua hemolinfa, levando à maior porcentagem de absorção de 16 aminoácidos.

De modo geral, a viabilidade do ciclo total (ovo-adulto) de *B. hebetor* foi baixa para todas as dietas artificiais testadas; entretanto, houve indícios de aumento na porcentagem de indivíduos que formaram casulos quando a dieta continha maior proporção de holotécidos pupais e outras fontes de proteína, como caseína e soroalbumina que demonstraram tendência de aumento na porcentagem formação de seda em *B. hebetor*, indicando que podem ser componentes importantes para a elaboração de novas dietas para a criação “*in vitro*” desse parasitóide.

As dietas contendo soroalbumina, caseína e maior concentração de holotécidos pupais associados a hidrolisado de lactoalbumina e soro fetal bovino foram selecionadas para novos testes acrescentando-se fontes de ácidos graxos, como concentrado de lipídios (nome comercial – “Chemically defined lipid concentrate” – Gibco/Invitrogen), ácido linolênico (Sigma), ácido eicosatrienóico (nome comercial – “cis-11,14,17-eicosatrienoic acid” – Sigma) e ácido linoléico (nome comercial – “Linoleic acid – water soluble” / Sigma).

Figura 26-Fenograma obtido da análise de agrupamento para dietas e hospedeiro natural (controle) testados para criação de *B. hebetor*. Fenograma UPGMA por Distância Euclidiana Média

Tabela 11. Viabilidade (%) das fases de ovo, larva, pupa e ciclo total e porcentagem de formação de casulo de *Bracon hebetor* criado em diferentes dietas artificiais e sobre o hospedeiro natural *Anagasta kuehniella* (temperatura de 25±2°C; UR do ar de 70±10% e fotofase de 14 horas)

Tratamentos	Viabilidade			Formação de	
	ovo	larva	pupa	ciclo total	casulo (%)
Controle (hospedeiro)	81,95±8,06 ab	87,28±8,25 a	100,00±0,00 a	71,53±8,72 a	96,35±2,32 a
Dieta 11 (3% soroalbumina)	93,42±6,58 ab	60,36±10,42 ab	91,42±4,96 a	51,55±6,95 ab	51,57±10,31 b
Dieta 10 (3% caseína)	94,76±1,77 ab	40,94±4,10 bcd	98,00±2,00 a	38,02±2,83 bcd	49,17±7,92 b
Dieta 1 (65% htp, 8,5% sfb e hla)	96,31±2,30 ab	43,78±5,27 bcd	100,00±0,00 a	42,16±4,27 bcd	48,77±6,00 b
Dieta 9 (60% htp)	70,19±8,43 b	49,51±9,31 bcd	94,17±3,63 a	32,73±2,35 bcde	46,00±3,63 b
Dieta 14 (0,4% tirosina)	100,00±0,00 a	36,47±7,62 bcd	96,00±2,40 a	35,01±9,00 bcd	39,76±9,31 b
Dieta 3 (0,2% caseína)	93,25±3,43 ab	21,35±3,77 de	98,00±8,16 a	19,51±4,50 def	34,33±12,95 bc
Dieta 4 (0,75% soroalbumina)	87,94±5,80 ab	26,72±4,72 bcde	97,14±2,86 a	22,83±4,35 cdef	32,95±11,73 bc
Dieta 2 (básica)	89,53±5,54 ab	25,61±4,40 cde	95,00±5,00 a	21,78±4,11 cdef	30,57±9,12 bc
Dieta 13 (0,4% alanina)	98,86±1,14 a	55,00±11,67 abcd	85,42±11,97 a	46,45±13,18 ab	23,51±3,95 bc
Dieta 12 (0,4% betaina)	97,78±2,22 a	57,04±6,52 abc	85,88±6,92 a	47,90±2,51 abc	20,68±6,65 bc
Dieta 8 (40% htp, 8,5% sfb e hla)	84,47±4,35 ab	56,22±5,32 abc	90,87±3,13 a	43,15±6,18bcd	14,58±5,71 bc
Dieta 5 (2% betaina)	89,39±2,45 ab	37,87±7,17 bcd	22,95±10,04 b	7,78±3,20 ef	0,0±0,00 c
Dieta 7 (2% tirosina)	93,91±2,67 ab	0,0±0,00 e	-	0,0±0,00 f	-
Dieta 6 (2% alanina)	85,79±9,06 ab	0,0±0,00 e	-	0,0±0,00 f	-

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Siglas: htp- holotécidos pupais de *D. saccharalis*; sfb- soro fetal bovino; hla- hidrolisado de lactalbumina.

Tabela 12. Viabilidade (%) das fases de ovo, larva, pupa e ciclo total e porcentagem de formação de casulo de *Bracon hebetor* criado em diferentes dietas artificiais e sobre o hospedeiro natural, *Anagasta kuehniella* (temperatura de 25±2°C; UR do ar de 70±10% e fotofase de 14 horas)

Tratamentos	Viabilidade				Formação de casulo (%)	
	ovo	larva	pupa	ciclo total		
Controle (hospedeiro)	85,20±4,83 a	91,80±4,48 a	100,00±0,00 a	78,21±6,18 a	96,70±2,65 a	
Dieta 19 (65% htp, 1% linolênico)	89,40±3,74 a	77,80±6,89 abc	95,75±3,23 a	66,60±9,41 ab	67,50±8,27 ab	
Dieta 22 (65% htp, 1% CL-)	97,20±1,53 a	49,25±10,65 bcdef	97,75±2,08 a	46,79±9,31 bcde	64,00±2,90 bc	
Dieta 27 (3% sa, 1% linolênico)	92,67±1,83 a	73,67±8,18 abcd	84,67±3,77 a	57,80±8,83 abc	40,33±3,14 bcd	
Dieta 17 (3% sa, 0,1% CL)	97,60±1,43 a	68,40±3,62 abcde	85,20±7,63 a	56,88±7,04 abc	38,20±10,07 bcd	
Dieta 21 (65% htp, 0,05% eico)	95,60±2,82 a	45,20±2,94 def	85,40±7,98 a	36,90±5,67 bcdef	34,60±8,21 bcd	
Dieta 18 (3% caseína, 0,1% CL)	98,00±1,18 a	69,60±6,46 abcd	81,20±6,67 a	55,38±2,89 abcd	33,60±4,73 bcd	
Dieta 29 (básica, 0,05% eico)	95,67±1,98 a	63,66±2,61 abcde	93,33±6,67 a	56,84±6,82 abcd	33,33±6,67 bcd	
Dieta 20 (65% htp, 0,3% linolênico)	88,80±3,48 a	51,00±3,11 bcdef	75,20±8,02 ab	34,06±5,68 bcdef	32,60±7,16 bcd	
Dieta 30 (básica, 1% CL)	95,33±2,08 a	46,33±10,18 cdef	100,00±0,00 a	44,17±9,31 bcde	32,00±13,92 bcd	
Dieta 16 (básica, 0,1% CL)	100,00±0,00 a	71,40±3,44 abcd	87,60±5,35 a	62,55±5,71 abc	31,20±4,29 cd	
Dieta 2 (básica)	89,40±5,54 a	25,20±4,39 f	95,00±5,00 a	21,40±4,11 def	30,40±9,12 d	
Dieta 15 (65% htp, 0,1% CL)	100,00±0,00 a	66,80±3,90 abcde	91,60±2,94 a	61,19±5,24 abc	28,00±7,80 d	
Dieta 26 (básica, 1% CL)	94,40±2,83 a	49,80±6,38 bcdef	72,20±9,81 ab	33,94±6,34 cdef	24,80±8,60 d	
Dieta 25 (básica, 0,05% eico)	95,20±3,05 a	54,20±3,15 bcde	88,20±7,26 a	45,51±5,30 bcde	22,80±5,03 d	
Dieta 23 (básica, 1% linolênico)	95,60±1,72 a	79,40±5,25 ab	75,60±4,59 ab	57,39±4,28 abc	20,20±2,72 d	
Dieta 28 (3% sa, 0,3% linolênico)	94,66±2,54 a	36,33±11,22 ef	46,00±9,27 b	15,82±5,24 ef	13,33±9,33 d	
Dieta 24 (básica, 0,3% linolênico)	95,20±3,05 a	54,20±5,58 bcde	11,80±6,20 c	6,09±2,74 f	22,60±4,98 d	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Siglas: htp- holotécidos pupais de *D. saccharalis*; CL- concentrado de lipídios; sa- soroalbumina; eico- ácido eicosatrienóico.

Assim verificou-se que a adição de 0,1% de concentrado de lipídios (diluição de 1000X), nas três dietas selecionadas e também na dieta básica (2), proporcionou aumento significativo na viabilidade larval, sendo da ordem de 70% (dietas 15, 16, 17 e 18) e estatisticamente semelhantes ao controle (criação sobre o hospedeiro natural). Dado semelhante foi observado na dieta 23 (dieta básica acrescida de 1% de ácido linolênico); entretanto, a formação de casulos foi reduzida e não diferiu daquela observada quando os insetos foram criados sobre a dieta básica (dieta 2), com 30,4% (Tabela 12).

Os melhores resultados foram observados nas dietas que apresentaram conjugação de fontes protéicas como soroalbumina e, principalmente, alta concentração de holotécidos pupais de *D. saccharalis*, com ácido linolênico, ácido eicosatrienóico (uma variação do ácido linolênico) e o concentrado de lipídios (dietas 19, 27, 21 e 22).

Para as dietas 19 (65% de holotécidos pupais, 8,5% de soro fetal bovino e de hidrolisado de lactoalbumina e 1% de ácido linolênico) e 27 (3% de soroalbumina e 1% de ácido linolênico) verificou-se elevada viabilidade larval e do ciclo total, em torno de 70 e 60%, respectivamente, e semelhantes estatisticamente ao observado no controle com 91,8% de viabilidade larval e 78,2% de viabilidade do ciclo total.

Quanto à formação de casulos verificou-se que a dieta 19 apresentou 67,5% de pupas com casulo, sendo estatisticamente semelhante aos 96,7% observados quando os insetos foram criados sobre o hospedeiro natural. Por comparação pôde-se constatar aumento de 122% na capacidade de formação de casulos em relação à dieta básica (Tabela 12, Figura 28).

Pela análise de agrupamento (avaliando-se os parâmetros de viabilidade larval e do ciclo total e a porcentagem de formação de casulos), verificou-se que as dietas 19 e 22 apresentaram baixo grau de encadeamento com as demais dietas, caracterizando a superioridade dessas em relação às demais (Figura 27).

Figura 27-Fenograma obtido da análise de agrupamento para dietas e hospedeiro natural (controle) testados para criação de *Bracon hebetor* . Fenograma UPGMA por Distância Euclidiana Média

Dessa forma, conclui-se que os ácidos graxos, tais como o ácido linolênico e concentrado de lipídios, associados à maior concentração de holotecidos pupais de *D. saccharalis* proporcionaram significativos aumentos na viabilidade da fase larval, do ciclo total (ovo-adulto) e na porcentagem de formação de casulos para *B. hebetor* criado em meios artificiais.

Avaliando-se a duração do ciclo total (ovo-adulto) dos insetos criados sobre o hospedeiro natural e nas dietas artificiais selecionadas, constatou-se aumento significativo para aqueles oriundos da dieta básica, ou seja, duração de 13,3 dias

comparados aos 11 dias verificados no controle (hospedeiro natural). As dietas 19 e 22 (enriquecidas respectivamente com ácido linolênico e concentrado de lipídios) apresentaram valores intermediários (12,3 e 12,6 dias, respectivamente) não diferindo do controle e da dieta 2. Observando-se os dados constata-se que esse aumento na duração do ciclo total foi decorrente tanto do alongamento da fase larval (cerca de 1 dia) como do da fase pupal, com cerca de 12 horas a mais para aqueles criados nas dietas 19 e 22 e de mais um dia para os criados na dieta básica (Tabela 13).

Assim, mais uma vez, fica demonstrada uma significativa melhora, em termos nutricionais, das dietas para a criação "*in vitro*" de *B. hebetor*, com um maior percentual de formação de casulos e redução no tempo de desenvolvimento do parasitóide.

De modo geral, a dieta artificial não afetou o peso das pupas-fêmeas, que apresentaram 1,6mg para aquelas desenvolvidas em lagartas de 5º instar de *A. kuehniella* e 1,55; 1,58 e 1,5mg, respectivamente, para as dietas 19, 22 e 2. Já o peso dos machos foi afetado pelo alimento ingerido, sendo que apenas aqueles que se desenvolveram sobre a dieta 19 apresentaram similaridade com o controle (Tabela 14). Ficou caracterizado também que pupas que originarão fêmeas são significativamente mais pesadas do que aquelas que originarão machos. Esse resultado coincide com os relatados para outros insetos, como lepidópteros, onde as pupas de fêmeas são mais pesadas que as dos machos (Slansky & Scriber, 1985). O peso de pupas é um fator importante quando se buscam padrões de qualidade de inimigos naturais criados em laboratório, sobre dieta artificial ou hospedeiros alternativos (Grenier & De Clercq, 2003; Wittmeyer & Coudron, 2001; Dindo *et al*, 1999).

Quando os adultos emergidos foram comparados quanto à agressividade sobre seu hospedeiro natural, não se verificou diferença estatística na capacidade de paralisação ou de parasitismo de lagartas de 5º instar de *A. kuehniella*. Assim, observou-se que, no controle, houve 79,5% em média de paralisação das lagartas expostas e 17,6% de parasitismo, comparados com 69; 72,8 e 75,5% de paralisação para fêmeas oriundas das dietas 2, 19 e 22, respectivamente. O parasitismo observado para as dietas testadas foi em média de 15%. Esses valores coincidem com os observados por Magro & Parra (2001), sendo que os autores observaram que aproximadamente 80% das lagartas de 5º instar de *A. kuehniella* foram paralisadas por *B. hebetor* criado sobre os hospedeiros naturais (*A. kuehniella* e *Corcyra cephalonica* Stainton) (Lep. Pyralidae), sendo que dessas, cerca de 20% foram parasitadas. Magro

& Parra (2004) verificaram valores muito próximos aos observados nessa pesquisa; contudo, naquela ocasião algumas dietas apresentaram-se menos promissoras. Segundo Morril (1942) as fêmeas de *B. hebetor* começam a introduzir o ovipositor em lagartas hospedeiras logo após a emergência, com o propósito de paralisá-las, antes de iniciarem a oviposição. Este procedimento, que resulta na paralisação motora das lagartas facilitando a oviposição, possibilita ao parasitóide alimentar-se da hemolinfa que exsuda do corpo do hospedeiro (Beard, 1972). Doult (1959) verificou que as fêmeas desse parasitóide, antes de iniciarem a oviposição, procuram paralisar todas as lagartas hospedeiras que houver na proximidade e Soliman (1940) (citado por Serra, 1992) verificou que o número de indivíduos que uma fêmea paralisa em 24 horas varia em função da temperatura, sendo que para 20 lagartas de *A. kuehniella* oferecidas por fêmea, em média foram paralisadas 7, 9 e 14 lagartas respectivamente para as temperaturas de 20, 24 e 32°C. Aparentemente, as dietas artificiais testadas não afetaram esse comportamento biológico de *B. hebetor*.

Em média, *B. hebetor* criado “*in vivo*” depositou 4,2 ovos por lagarta parasitada. Parasitóides criados em meios artificiais (“*in vitro*”) depositaram 3,4; 3,6 e 3,9 ovos por lagarta parasitada, respectivamente, para aqueles insetos criados nas dietas 22, 2 e 19; sendo que as alíquotas de ovos amostradas, da progênie dos insetos criados “*in vivo*” e “*in vitro*”, apresentaram viabilidades de 94,6% para o controle, 90,1% para a dieta 19 e 91,3% para as dietas 2 e 22. Para ambos os casos (número de ovos/lagarta e viabilidade da progênie), os dados não diferem estatisticamente daquele observado no controle. Serra (1992) descreveu que, em média, fêmeas de *B. hebetor* depositam 3,88 ovos/lagarta em 24 horas de parasitismo, na temperatura de 25°C (teste com lagartas individualizadas), podendo chegar até a 11,3 ovos/lagarta.

Fêmeas criadas nas diferentes dietas artificiais apresentaram-se menos longevas do que aquelas criadas sobre o hospedeiro natural, nessa condição de ensaio. Assim, verificou-se que aquelas criadas em lagartas de *A. kuehniella* apresentaram longevidade de 8,8 dias, em média, enquanto que as criadas nas dietas 19, 2 e 22 apresentaram longevidades de 7,5; 7,3 e 6,9 dias, respectivamente. Para machos verificou-se que apenas aqueles oriundos da dieta 22 (4,1 dias) diferiram do controle, que apresentou longevidade de 6,0 dias. As dietas 19 e 2 originaram machos com longevidade de 4,8 dias, em média (Tabela 15). Magro & Parra (2002) verificaram que a longevidade dos machos, para essa mesma espécie, foi de 8 dias para insetos

criados sobre o hospedeiro natural e entre 4 a 6 dias para aqueles insetos criados em dietas artificiais; para fêmeas, os autores observaram longevidade de cerca de 35 dias; naquele ensaio, os autores ofereceram lagartas diariamente aos parasitóides.

A razão sexual observada para os insetos provenientes das dietas artificiais 19, 22 e 2 foram respectivamente 0,61; 0,55 e 0,58 e no controle (0,54) sem diferirem pelo teste de χ^2 , ao nível de 5% de probabilidade e 1GL. Os valores correspondem àqueles observados por Serra (1992) e por Magro (2000). Dessa forma, as dietas não afetaram a razão sexual do parasitóide.

Todas as dietas testadas (exceto aquelas com elevadas concentrações de betaína, alanina ou tirosina – dietas 5, 6 e 7) possibilitaram o desenvolvimento total do parasitóide, em maior ou menor escala. Os resultados obtidos com a criação “*in vitro*” de *B. hebetor*, proporcionaram avanços nas técnicas de criação de insetos, pois, muito claramente, o parasitóide se apresentou como um modelo que possibilitou, através de respostas claras (formação ou não formação de casulos), definir e reconhecer quais são os nutrientes importantes para o desenvolvimento de um inimigo natural, em meios artificiais. Dentre todas as alternativas testadas, *B. hebetor* adaptou-se a uma dieta contendo proteína (holotecidos pupais de *D. saccharalis*-65% ou soroalbumina-3%) e lipídios (ácido linolênico ou concentrado de lipídios -1%); este meio possibilitou à formação de casulos de forma semelhante aos insetos criados no hospedeiro natural e com viabilidade do ciclo também muito próxima. Os estudos foram conduzidos por apenas uma geração, embora com resultados bastante consistentes. Assim, é possível que, ao longo de gerações sucessivas em dieta artificial, haja uma maior adaptação ou seleção de insetos mais adaptados às fontes protéicas disponíveis, passando a produzir ainda mais seda, aumentando a proporção de casulos formados e a viabilidade do ciclo biológico de *B. hebetor*.

Tabela 13. Duração (dias) das fases de ovo, larva, pupa e ciclo total de *Bracon hebetor* criado em diferentes dietas artificiais e sobre o hospedeiro natural, *Anagasta kuehniella* (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas)

Tratamentos	Duração (dias)			
	ovo	larva	pupa	ciclo total
Controle	$1,52\pm 0,01$ a	$4,83\pm 0,10$ b	$5,36\pm 0,04$ b	$11,00\pm 0,82$ b
Dieta 19	$1,49\pm 0,03$ a	$5,73\pm 0,03$ a	$5,75\pm 0,04$ b	$12,33\pm 0,55$ ab
Dieta 22	$1,57\pm 0,03$ a	$5,57\pm 0,05$ a	$5,76\pm 0,07$ b	$12,66\pm 0,65$ ab
Dieta 2	$1,58\pm 0,01$ a	$5,67\pm 0,10$ a	$6,55\pm 0,11$ a	$13,33\pm 0,22$ a

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

Tabela 14. Peso (mg) de pupas de *Bracon hebetor* criado em diferentes dietas artificiais e sobre o hospedeiro natural, *Anagasta kuehniella* (72 horas após a liberação da mecônia) (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas)

Tratamentos	peso (mg)	
	macho	fêmea
Controle	$1,36\pm 0,003$ aB	$1,60\pm 0,004$ aA
Dieta 19	$1,33\pm 0,003$ aB	$1,55\pm 0,005$ aA
Dieta 22	$1,18\pm 0,004$ bB	$1,58\pm 0,003$ aA
Dieta 2	$1,03\pm 0,002$ cB	$1,50\pm 0,005$ aA

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 15. Longevidade (dias) de adultos de *Bracon hebetor* criado em diferentes dietas artificiais e sobre o hospedeiro natural, *Anagasta kuehniella* (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas)

Tratamentos	Longevidade (dias)	
	macho	fêmea
Controle	$6,00\pm 0,61$ a	$8,82\pm 0,22$ a
Dieta 19	$4,8\pm 0,25$ ab	$7,50\pm 0,31$ b
Dieta 2	$4,8\pm 0,25$ ab	$7,30\pm 0,26$ b
Dieta 22	$4,1\pm 0,18$ b	$6,90\pm 0,31$ b

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

Figura 28-Pupas de *Bracon hebetor* criado sobre o hospedeiro natural (A), dieta artificial básica (B) e em dieta enriquecida com proteína e lipídios (C)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Bracon hebetor Say (Hym.: Braconidae) foi criado em dieta artificial à base de holotécidos pupais de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lep.: Pyralidae) (40%), gema de ovo (20%) e leite semi-desnatado (10%), com viabilidade em torno de 30% e com adultos aptos ao parasitismo. Entretanto, quando criados em dieta artificial (*in vitro*), cerca de 70% das pupas não formaram casulos protetivos. Observações em microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV) demonstraram não haver deformação nas glândulas de seda dos insetos criados na dieta artificial. Quantificações de proteína (Bradford, 1976) de amostras das glândulas de seda de insetos criados nos dois sistemas (*in vivo* e *in vitro*) mostraram menor concentração de proteína (2,8µg de proteína/µL da amostra) para aquelas glândulas extraídas de insetos criados na dieta artificial, enquanto que observou-se 5,03µg de proteína/µL da amostra para as glândulas extraídas do controle (criação sobre o hospedeiro natural). Esses resultados sugeriram a necessidade do aprimoramento da dieta a partir de estudos bioquímicos, morfológicos, ultra-estruturais para definir os nutrientes que possibilitassem a formação de casulos.

Estudaram-se, então, as enzimas envolvidas no processo digestivo de *B. hebetor*, verificando-se ser a tripsina a principal delas, corroborando as observações de Baker & Fabrick (2000). Esse estudo foi fundamental, visando à seleção de hemolinfa e/ou holotécidos pupais (principal componente das dietas artificiais) para o aprimoramento da referida dieta, uma vez que hemolinfas de lepidópteros apresentam inibidores de tripsinas e, a hemolinfa do inseto selecionado, não deveria afetar a atividade enzimática de *B. hebetor*. Outro aspecto relevante a ser considerado para a seleção da hemolinfa para compor a dieta artificial, foi a proporção de proteína, pois foi verificada uma estreita correlação entre a sobrevivência de *B. hebetor* e a capacidade

de formação de casulos com a quantidade de proteína existente nas hemolinhas dos hospedeiros natural e alternativos. Os resultados indicaram a hemolinfa de lagartas de 5º instar de *D. saccharalis* como a mais adequada para confecção da dieta artificial para *B. hebetor*.

B. hebetor apresentou 3 instares larvais, tanto no hospedeiro natural como na dieta artificial, sendo a duração da fase larval alongada quando o inseto foi criado em dieta artificial. O consumo de dieta foi de 3,77µL de dieta artificial durante seu ciclo e o ganho de peso foi acentuado no último instar larval, tanto para insetos criados “*in vivo*” como para aqueles criados “*in vitro*”. Esses dados indicam que a qualidade da dieta afeta a duração do ciclo, havendo necessidade de maior tempo de consumo para conversão em energia e tecidos de crescimento. Como o primeiro instar foi alongado em cerca de 12 horas, pôde-se inferir que isto se deva a um maior “custo metabólico” para adaptação à dieta artificial, uma vez que ficou caracterizado o desenvolvimento de diferentes classes de tripsinas para a digestão do meio artificial. Quando se estudou a histoquímica do conteúdo intestinal do parasitóide criado nos dois sistemas (“*in vivo*” e “*in vitro*”), verificou-se que aquele resultante da ingestão da hemolinfa do hospedeiro natural apresentou-se com várias vesículas de lipídios; o conteúdo intestinal referente aos insetos que se alimentaram na dieta artificial, apresentaram-se pouco espessos e com vesículas pequenas espalhadas pela cavidade intestinal.

Assim, foram realizados ensaios com diferentes dietas artificiais para a criação de *B. hebetor*. As dietas foram baseadas na análise de aminoácidos da hemolinfa do hospedeiro natural, acrescentando-se ainda outras fontes de proteína e lipídios na sua composição. A princípio, o melhor resultado foi obtido quando se aumentou a proporção de holotecdos pupais à dieta artificial, além de caseína ou soroalbumina, que elevaram a formação de casulos para cerca de 50%. A adição de mistura de lipídios proporcionou maior viabilidade do ciclo total, sendo que a associação de uma maior concentração de holotecdos pupais de *D. saccharalis* (65%) e de ácido linolênico (1%) possibilitou bons resultados para a criação “*in vitro*” de *B. hebetor*, com 76% de viabilidade larval e 66% de viabilidade do ciclo total, sendo que 67,5% das pupas formaram casulos protetivos.

B. hebetor se comportou como um ótimo modelo para estudos de criação de parasitóides “*in vitro*”. Foram desenvolvidos diferentes estudos, de forma multi e

interdisciplinar, possibilitando a detecção de “pontos chaves” para o aprimoramento da dieta artificial.

A definição dos componentes a serem adicionados às dietas, em função das análises morfológicas e ultra-estruturais e de estudos bioquímicos permitiram aprofundar os estudos nutricionais e conseguir desenvolvimento biológico e viabilidades comparáveis àqueles dos insetos criados no hospedeiro natural. O problema da formação de casulos, objetivo básico da pesquisa, também foi superado. Portanto, os objetivos foram alcançados e os resultados poderão servir de modelo para estudos com outros ectoparasitóides. Como os resultados foram obtidos apenas para a primeira geração, é provável que haja uma seleção de indivíduos adaptados à dieta ao longo das gerações, levando a resultados ainda superiores àqueles observados nesse trabalho.

6 CONCLUSÕES

- *Bracon hebetor* Say (Hym.: Braconidae) pode ser criado em dieta artificial com uma viabilidade do ciclo total (ovo-adulto) de 70% e com cerca de 70% das pupas formando casulos e, portanto, com características biológicas e comportamentais semelhantes às do inseto criado no hospedeiro natural;
- Holotecidos pupais de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lep. Pyralidae) (65%) e soroalbumina (3%) são as proteínas que proporcionaram melhores resultados para a criação “*in vitro*” de *B. hebetor*;
- Ácidos graxos (concentrado de lipídios e ácido linolênico) proporcionam incrementos significativos na viabilidade larval e do ciclo total (ovo-adulto) para *B. hebetor* criado em meios artificiais;
- A associação de holotecidos pupais de *D. saccharalis* (65%) e ácido linolênico (1%) proporcionam um aumento de cerca de 120% na capacidade de formação de casulos, tendo como comparação aqueles insetos criados sobre a dieta básica (40% holotecidos pupais de *D. saccharalis*, 20% gema de ovo, 20% leite semi-desnatado, 10% mistura de sais de Neisenheimer);
- *B. hebetor* apresenta três instares larvais, sendo a fase larval alongada em 1,5 dia quando criado na dieta artificial;
- A razão sexual não é afetada para insetos criados na dieta artificial;

- O consumo de dieta por *B. hebetor* é de 3,77 μ L durante a fase larval;
- Tripsina é a principal enzima digestiva para *B. hebetor* criado nos dois sistemas (“*in vivo*” e “*in vitro*”);
- Quando criado em dieta artificial (com holotécidos pupais de *D. saccharalis*), larvas de *B. hebetor* desenvolvem diferentes classes de tripsinas, distintas daquelas encontradas quando ele é criado no hospedeiro natural;
- Hemolinfas de lagartas de lepidópteros podem apresentar inibidores de tripsinas;
- Devem ser utilizadas, em dieta artificial para *B. hebetor*, hemolinfas que não afetem a atividade enzimática do parasitóide;
- Observações em microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV) demonstraram não haver deformação nas glândulas de seda dos insetos criados na dieta artificial;
- A dieta aprimorada para criação de *B. hebetor* (65% de holotécidos pupais de *D. saccharalis*, 8,5% de hidrolisado de lactoalbumina, 8,5% de soro fetal bovino, 1% de ácido linolênico, 18% de gema de ovo) corrigiu inadequações encontradas quando o inseto foi criado na dieta básica (40% de holotécidos pupais de *D. saccharalis*, 20% de gema de ovo, 20% leite semi-desnatado, 10% de mistura de sais de Neisenheimer e 10% de água), ou seja:
 - Insuficiente quantidade de proteína nas glândulas de seda;
 - Insuficiente quantidade de seda (formação de casulos);
 - Reduzidas viabilidades da fase larval e do ciclo total (ovo-adulto);
 - Alongamento do ciclo total (ovo-adulto);
 - Menor peso de pupas (para machos);

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, L. C.; ALMEIDA, P. C.; FRANZONI, L.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. Synthesis of N α -protected aminoacyl 7-amido-4-methyl-coumarin amide by phosphorous oxychloride and preparation of specific fluorogenic substrates for papain. **Peptide Research** v. 9, p. 92-96, 1996.
- BAKER, J.E.; FABRICK, J.A. Host hemolymph proteins and protein digestion in larval *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, p.937-946, 2000.
- BEARD, R.L. Effectiveness of paralyzing venom and its relation to host discrimination by braconid wasps. **Annals of the Entomological Society of America**. v.65, n.1, p.90-93, 1972.
- BECKAGE, N.E. Endocrine interactions between endo-parasitic insects and their hosts. **Annual Review of Entomology** v. 30, p. 371-413, 1985.
- BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-154, 1976.
- CAETANO, F.H.; JAFFÉ, C.; ZARA, F.J. **Formigas: biologia e anatomia**. Araras/SP: Gráfica e Editora Topázio, 2002. 131p.
- CANAVOSO, L.E.; JOUNI, Z.E.; KARNAS, K.J.; PENNINGTON, J.E.; WELLS, M.A. Fat metabolism in insects. **Annual Review of Nutrition** v.21, p. 23-46, 2001.
- CHAPMAN, R.F. **The Insects, structure and function**. New York: American Elsevier, 1969. 819 p.

- COHEN, A.C. Organization of digestion and preliminary characterization of salivary trypsin-like enzymes in a predaceous heteropteran, *Zelus renardii*. **Journal of Insect Physiology**, v.39, p.823-829, 1993.
- COHEN, A.C. Extra-oral digestion in predaceous terrestrial Arthropoda. **Annual Review of Entomology**, v.40, p. 85-103, 1995.
- CÔNSOLI, F.L. Criação *in vitro* de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 e *T. pretiosum* Riley, 1879 (Hym.: Trichogrammatidae): desenvolvimento de um ovo artificial e aprimoramento de dietas artificiais. Piracicaba, 1997. 153 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- CÔNSOLI, F. L.; PARRA, J.R.P. Biology of *Trichogramma galloi* and *T. pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) reared *in vitro* and *in vivo*. **Annals of the Entomological Society of America**, v.89, n.6, p. 828-834, 1996a.
- CÔNSOLI, F.L.; PARRA J.R.P. Comparison of hemolymph and holotissues of different species of insects as diet components for *in vitro* rearing of *Trichogramma galloi* Zucchi and *T. pretiosum*. **Biological Control** v.6, p. 401-406, 1996b.
- CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P. Produção ‘*in vitro*’ de parasitóides: criação de *Trichogramma galloi* e *T. pretiosum* no Brasil. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Eds.). **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997a. cap. 10, p. 259-302.
- CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P. Development of an oligidic diet for *in vitro* rearing of *Trichogramma galloi* Zucchi and *Trichogramma pretiosum* Riley. **Biological Control**, v.8, p. 172-176, 1997 b.
- CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P. *In vitro* rearing of parasitoids: constraints and perspectives. **Trends in Entomology**. v. 2, p. 19-32, 1999.
- CÔNSOLI, F.L.; PARRA J.R.P. Effect of the age of the pupal holotissues on the nutritional quality of artificial diets for *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** v.29, p. 555-563, 2000.

- CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P. Criação *in vitro* de parasitóides e predadores In: PARRA, J.R.P.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BOTELHO, P.S.M; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil, parasitóides e predadores**. Barueri: Manole, 2002. cap. 15, p. 249-271.
- CÔNSOLI, F.L.; VINSON, B. Larval development and feeding behavior of the wing dimorphics of *Melittobia digitata* Dahms (Hymenoptera: Eulophidae). **Journal of Hymenoptera Research**. v. 11, n. 2, p.188-196, 2002.
- CRAIG, C.L. Evolution of arthropod silks. **Annual Review of Entomology**, v.42, p. 231-267, 1997.
- CRISTOFOLETTI, P. T.; RIBEIRO, A. F.; DERAISON, C.; RAHBÉ, Y. and TERRA, W. R. Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, p. 14-24, 2003.
- DADD, R.H. Nutrition: Organisms. In. KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Eds.) **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. Pergamon Press, 1985. v. 4, p. 313-390.
- DAHLQVIST, A. Assay of intestinal disaccharidases. **Analytical Biochemistry**, v. 22, p. 99-107, 1968.
- DAI, K.J.; ZHANG, L.W.; MA, Z.J.; ZHONG, L.S.; ZHANG, Q.K.; CAO, A.; XU, K.; LI, Q; GAO, Y. Research and utilization of artificial host egg for propagation of parasitoid *Trichogramma*. **Les Colloques de l' Inra**, v.43, p.311-318, 1988.
- DINDO, M.L.; FARNET, R.; SCAPOLATEMPO, M.; GARDENGHI, G. *In vitro* rearing of the parasitoid *Exorista larvarum* (L.) (Diptera: Tachinidae) on meat homogenate-based diets. **Biological Control**, v.16, p. 258-266, 1999.
- DOUTT, R.L. Distribution of eggs by *Microbracon* (Hymenoptera: Braconidae). **Ecology**, v.40, n.2, p.302-303, 1959.
- ERLANGER, B. F.; KOKOVSKI, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, p.271-278, 1961.

- FISHER, D.B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**, v.16,p.92-96, 1968.
- GABE, M. **Histological techniques**. New York: Springer Verlag, 1976, 1106p.
- GOMES, S.M. Criação *in vitro* de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hym.: Trichogrammatidae): aspectos nutricionais e bioquímicos. Piracicaba, 2002. 95 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- GRENIER, S. Desenvolvimento e produção *in vitro* de *Trichogramma*. In. PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Eds.) **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. cap. 9, p. 235-258.
- GRENIER, S.; DE CLERCQ, P. Comparison of artificially vs. naturally reared natural enemies and their potential for use in biological control In: VAN LENTEREN, J.C. (Ed.). **Quality control and production of biological control agents; Theory and testing procedures**. Cambridge/USA: CABI Publishing, 2003. cap. 9, p. 115-131.
- GRENIER, S.; GREANY, P.D.; COHEN, A.C. Potential for mass release of insect parasitoids and predators through development of artificial culture techniques. In: ROSEN, D. (Ed.). **Pest management in the subtropics: Biological control - A Florida perspective**. Andover: Intercept, 1994. p.181-205.
- GUERRA, A.A. *In vitro* rearing of *Bracon mellitor* and *Catolaccus grandis* with different insect hemolymph-based diets. **Southwestern Entomologist**, v.17, n.2, p.123-126, 1992.
- GUERRA, A.A.; MARTINEZ, S. An *in vitro* rearing system for the propagation of the ectoparasitoid *Catolaccus grandis* **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.72, p. 11-16, 1994.
- GUERRA, A.A.; ROBACKER, K.M.; MARTINEZ, S. 'In vitro' rearing of *Bracon mellitor* and *Catolaccus grandis* with artificial diets devoid of insect components. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.68, p. 303-307, 1993.
- GUILLOT, F.S.; VINSON S.B. The role of the calyx and poison gland of *Cardiochiles nigriceps* in the host-parasitoid relationship. **Journal of Insect Physiology**, v.18, p.1315-1321, 1972.

- HARWOOD, S.H.; GROSOVSKY S.J.; COWLES E.A; DAVIS J.W.; BECKAGE N.E. An abundantly expressed hemolymph glycoprotein isolated from newly parasitized *Manduca sexta* larvae is a polydnavirus gene product. **Virology**, v.205, p.382-392, 1994.
- HOFFMAN, J.D.; IGNOFFO C. M.; DICKERSON W.A.. 'In vitro' rearing of the endoparasitic wasp, *Trichogramma pretiosum*. **Annals of Entomological Society of America**, v.68, n.2, p. 335-336, 1974.
- HOUSE, H.L. Insect nutrition. **Annual Review of Entomology**, v.6, p. 13-20, 1961.
- HOUSE, H.L. Nutritional disease. In: STEINHAUS, E.A. (Ed.). **Insect Pathology and Advanced Treatise**. New York: Academic Press, 1963, cap.4, p. 133-160.
- HOUSE, H.L.; BARLOW J.S. Effects on the parasitoid *Agria affinis* (Fall.) (Diptera: Sarcophagidae) of small molecules in diets. **Journal of Insect Physiology**, v.10, p.255-260, 1964.
- HU, J.S.; VINSON S.B.. The *in vitro* development from egg to prepupa of *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) in an artificial medium: importance of physical factors. **Journal of Insect Physiology**, v.44, p.455-461, 1998.
- JIANG, H.; KANOST, M.R. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, p.95-105, 2000.
- JOHANSEN, D.A. **Phant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940, 108p.
- KEEVER, D.W.; ARBOGAST, R.T.; MULLEN, M.A. Population trends and distributions of *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) and lepidopterous pests in commercially stored peanuts. **Environmental Entomology**, v.14, n.6, p.722-725, 1985.
- LI, L. *In vitro* rearing of parasitoids of insect pests in China. **Korean Journal Applied Entomology** v. 31, n.3, p.241-246, 1992.
- LISON, L. **Hitochimie et cytochimie animals: principles and methods**. Paris: Gauthier – Villars, 1960, 842p. v.1, 2.

- LOPES, A.R.; TERRA, W.R. Purification, properties and substrate specificity of a digestive trypsin from *Periplaneta americana* (Dictyoptera) adults. **Insect Biochem. Mol. Biol.** v.33, p.407-415, 2003.
- MAGRO, S.R. Criação "*in vitro*" do ectoparasitóide larval *Bracon hebetor* Say, 1857 (Hymenoptera: Braconidae). Piracicaba, 2000. 78p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MAGRO, S.R.; CAETANO, F.H.; PARRA, J.R.P. Caracterização da glândulas salivar de *Bracon hebetor* Say criado "*in vivo*" e "*in vitro*". In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 19., Manaus, 2002. **Resumos**. Manaus, AM: SEB, 2002, p.36.
- MAGRO, S.R.; PARRA, J.R.P. Biologia do ectoparasitóide *Bracon hebetor* Say, 1857 (Hymenoptera: Braconidae) em sete espécies de lepidópteros. **Scientia Agrícola**, v.58 n. 4 p. 693-698, 2001.
- MAGRO, S.R.; PARRA, J.R.P. Criação *in vitro* de *Bracon hebetor*. In: PARRA, J.R.P.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BOTELHO, P.S.M; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil, parasitóides e predadores**. Barueri: Manole, 2002. cap. 16, p. 277-293.
- MAGRO, S.R.; PARRA, J.R.P. Comparison of artificial diets for rearing *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, v.29, p. 341-347, 2004.
- MORALES RAMOS, J.A.; ROJAS, M.G.; COLEMAN, R.J.; KING, E.G. Potential use of *in vitro*-reared *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae) for biological control of the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Biological and Microbial Control**, v.91, n.1, p.101-109, 1998.
- MORRILL Jr., A.W. Notes on the biology of *Microbracon hebetor*. **Journal of Economic Entomology**, v.35, n.4, p.593-594, 1942.
- MULLINS, D. E. Chemistry and physiology of the hemolymph. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. Pergamon Press, 1985. v. 3, p. 355-400.

- NAKAMATSU, Y.; TANAKA, T. Venom of ectoparasitoid *Euplectrus* sp near *plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae) regulates the physiological state of *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae) host as a food resource. **Journal of Insect Physiology**, n.49, p. 149-159, 2003.
- NAKAMATSU, Y.; TANAKA, T. Venom of *Euplectrus separatae* causes hyperlipidemia by lyses of host fat body cells. **Journal of Insect Physiology**, n.50, p. 267-275, 2004.
- NICHOLSON, J. A.; KIM, Y. S. A one-step L-aminoacid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 63, p. 110-117, 1975.
- NOELTING, G.; BERNFELD, P. Sur les enzymes amylotiques. III. La β -amylase: dosage d'activité et controle de l'absence d' α -amylase. **Helv. Chim. Acta.**, v. 31, p. 286-290, 1948.
- NORDLUND, D.A.; WU, Z.X.; GREENBERG, S.M. *In vitro* rearing of *Trichogramma minutum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) for ten generations, with quality assessment comparisons of *in vitro* and *in vivo* rearing adults. **Biological Control**, v.9, p. 201-207, 1997.
- NORULLAHOĞLU, Z.Ü.; UÇKAN, F.; SAK, O.; ERGIN, E. Total lipid and fatty acid composition of *Apanteles galleriae* and its parasitized host. **Physiology, Biochemistry and Toxicology**, v.9, n.5, p.1000-1006, 2004.
- NOVILLO, C.; CASTAÑERA, P.; ORTEGO, F. Inhibition of digestive trypsin-like proteases from larvae of several lepidopteran species by the diagnostic cysteine protease inhibitor E-64. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, p. 247-254, 1997.
- OG, C.L.; STANLEY-SAMUELSON, D.W. Phospholipid and triacylglycerol fatty acid compositions of the major life stages and selected tissues of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.101B, p.345-351, 1992.
- PARRA, J.R.P. Consumo e utilização de alimentos por insetos In: PANIZZU, A.R.; PARRA, J.R.P.; (Eds.) **Ecologia nutricional de insetos e suas aplicações no manejo de pragas**. CNPq / Ed. Manole, 1991. cap. 2, p. 9-65.

- PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: FEALQ, 1999, 137p.
- PARRA J.R.P.; CÔNSOLI, F.L. In vitro rearing of *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879. **Ciência e Cultura**, v.44, n.6, p. 407-409, 1992.
- PARRA, J.R.P.; MISHFELDT, L.H. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. In: ANDERSON, T.E.; LEPPLA, N.C. (Ed.). **Advances in insect rearing for research and pest management**. Colorado: Westview Press, 1992, p.195-209.
- PENNACCHIO, F.; VINSON S.B.; TREMBLAY, E.; OSTUNI, A. Alteration of ecdysone metabolism in *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera, Noctuidae) larvae induced by *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera, Braconidae) teratocytes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.24, p.383-394, 1994.
- PORTER, K.R.; BONNEVILLE, M.A. **Fine structure of cells and tissues**. USA: Lea & Febiger, 1973. 204p.
- PROZELL, S; SCHÖLLER, M. Insect fauna of a bakery, processing organic grain and applying *Trichogramma evanescens* Westwood. **Integrated Protection of Stored Products IOBC Bulletin**. v.21, n.3, p.39-44, 1998.
- PRUDHOMME, J.C.; COUBLE, P.; GAREL, J.P.; DAILLIE, J. Silk synthesis In: KERKUT, G.A.; L.I. GILBERT (Eds.) **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. Vol10. Pergamon Press.1985, p. 571-594.
- ROJAS, M.G.; MORALES-RAMOS, J.A.; KING, E.G. In vitro rearing of boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) ectoparasitoid *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae) on meridic diets. **Biological and Microbial Control**. V.89, n.5, p.1095-1104, 1996.
- ROJAS, M.G.; MORALES-RAMOS, J.A.; KING, E.G. Reduction of cost for mass propagating *Catolaccus grandis* by the use of artificial diet. In: BELTWIDE COTTON CONFERENCES. New Orleans, 1997. Proceedings. v.2. p.1197-1199.

- SEHNAL, F.; AKAY, H. Insect silk gland: their types, development and function, and effects of environmental factors and morphogenetic hormones on them. **International Journal Insect Morphology and Embryology**, v.19, n.2, p.79-132, 1990
- SERRA, H. J. P. Bioecologia do ectoparasito *Habrobracon hebetor* (Say, 1836) (Hymenoptera: Braconidae) em *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae). Piracicaba, 1992. 91p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SHAPIRO, M.; IGNOFFO, C.M. Growth of *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) cells adapted to various culture media. **Annals of Entomological Society of America**, v.66, p.270-273, 1973.
- SILVA-ZACARIN, E.C.M.; MORAES, R.L.M.S.; TABOGA, S.R. Silk formation mechanisms in the larval salivary glands of *Aphis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Biosciences** v. 28, n.6, p. 753-764, 2003.
- SIMMONDS, F.J.. The propagation of insect parasites on unnatural hosts. **Bulletin of Entomological Research**, v.35, p.219-226, 1944.
- SLANSKY, F.Jr.; SCRIBER, J.M. Food consumption and utilization In: KERKUT, G.A.; L.I. GILBERT (Ed.). **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. Pergamon Press, 1985. v10, p. 88-163.
- STRAND, M.R.; MEOLA S.M.; VINSON S.B. Correlating pathological symptoms in *Heliothis virescens* eggs with development of the parasitoid *Telenomus heliothidis*. **Journal of Insect Physiology**, v.32, p.389-402, 1986.
- STRAND, M.R.; VINSON, S.B. In vitro culture of *Trichogramma pretiosum* on an artificial medium. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.39, p.203-209, 1985.
- STRAND, M.R.; VINSON, S.B.; NETTLES JR, W.C.; XIE, Z.N.. In vitro culture of the egg parasitoid *Telenomus heliothidis*: the role of teratocytes and medium consumption in development. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.46, p.71-78, 1988.

- SUMENKOVA, V.V.; YAZLOVETSKY, I.G.. A simple artificial nutritional diet for the predaceous bug *Podisus maculiventris* (Hemiptera, Pentatomidae) **Zoologicheskii Zhurnal**, v.12, p.52-57, 1992.
- TANAKA, T.. Calyx and venom fluids of *Apanteles kariyai* (Hymenoptera, Braconidae) as factors that prolong larval period of the host, *Pseudaletia separata* (Lepidoptera, Noctuidae) **Annals of Entomological Society of America**, v.80, p.530-533, 1987.
- TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 109B, p. 1-62, 1994.
- THOMPSON, S.N. Aspects of amino acid metabolism and nutrition in the ectoparasitoid wasp, *Exeristes roborator*. **Journal of Insect Physiology**, v.20, p.1515-1528, 1974.
- THOMPSON, S.N. Defined meridic and holidic diets and aseptic feeding procedures for artificially rearing the ectoparasitoid *Exeristes roborator* (Fabricius). **Annals of Entomological Society of America**, v.68, n.2, p.220-226, 1975.
- THOMPSON, S.N. The amino acid requirements for larval development of the hymenopterous parasitoid *Exeristes roborator*. **Annals of Entomological Society of America**, v.69, p.835-838, 1976.
- THOMPSON, S.N. Lipid nutrition during larval development of the parasitic wasp, *Exeristes roborator*. **Journal of Insect Physiology**, v.23, p.579-583, 1977.
- THOMPSON, S.N. Nutrition and *in vitro* culture of insect parasitoids. **Annual Review of Entomology**, v.31, p. 197-219, 1986.
- THOMPSON, S.N. Nutrition and culture of entomophagous insects. **Annual Review of Entomology**, v.44, p. 561-592, 1999.
- TWINING, S.S. Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. **Analytical Biochemistry**, v. 143, p. 30-34, 1984.
- VINSON, S.B.; IWANTSCH G.F. Host suitability for insect parasitoids. **Annual Review of Entomology**, v.25, p.397-419, 1980.

- VOLKOFF, A.N.M. Recherches de base pour l'elaboration d'un milieu artificiel brut assurant le development de *Trissolcus basalis* (Woll) (Hymenoptera: Scelionidae), parasitoid oophage de *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae). 1990, 116 p. Le Titre de Docteur de L'Institut National Polytechnique de Toulouse.
- VOLKOFF, N.; VINSON, S.B.; WU, Z.X.; NETTLES Jr.; W.C. *In vitro* rearing of *Trissolcus basalis* (Hym.: Scelionidae) an egg parasitoid of *Nezara viridula* (Hem.: Pentatomidae). **Entomophaga**, v.37, n.1, p. 141-148, 1992.
- WITTMAYER, J.L.; COUDRON, T.A. Life table parameters, reproductive rate, intrinsic rate of increase and realized cost of rearing *Podisus maculiventris* (Say) (Heteroptera: Pentatomidae) on an artificial diet. **Journal of Economic Entomology**, v.94, p. 1344-1352, 2001.
- XIE, Z.; LI, L.; XIE, Y. *In vitro* culture of *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae). **Chinese Journal of Biological Control**, v.5, n.2, p. 49-51, 1989.
- XIE, Z.N., NETTLES JR.; W.C., MORRISON R.K., IRIE K.; VINSON S.B. Effect of oviposition stimulants and diets on the growth and development of *Trichogramma pretiosum* in vitro. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.42, p.119-124, 1986.
- XIE, Z.N.; WU, Z.X.; NETTLES Jr, W.C.; SALDAÑA, G.; NORDLUND, D.A. *In vitro* culture of *Trichogramma* spp. on artificial diets containing yeast extract and ultracentrifuged chicken egg yolk but devoid of insect components. **Biological Control**, v.8, p. 107-110, 1997.
- YAZLOVETSKY, I.G.; NEPONNYASHAYA, A.M.; AGEEVA, L.I. Optimization of the artificial nutritional diet for the larvae of *Bracon hebetor* (Hymenoptera, Braconidae). **Zoologicheskii Zhurnal** v.71, n.10, p.134-138, 1992.