CRIAÇÃO "IN VITRO" DOS PARASITÓIDES DE OVOS *Trichogramma pretiosum* RILEY, 1879 E *T. galloi* ZUCCHI, 1988 (HYM.: TRICHOGRAMMATIDAE).

FERNANDO LUÍS CONSOLI

Biólogo

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO POSTALI PARRA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Área de Concentração – Entomologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo – Brasil

Dezembro – 1993

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

C755c Cônsoli, Fernando Luís
 Criação "in vitro" dos parasitóides de ovos
 Trichogramma pretiosum Riley, 1879 e *T. galloi*
 Zucchi, 1988 (Hym.: Trichogrammatidae). Pira-
 cicaba, 1993.
 112p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia

1. Controle biológico. 2. Inseto parasitóide
3. Tricogramatideo - Criação "in vitro" 4. Trico-
gramatideo - Dieta artificial I. Escola Superior
de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 595.79

CRIAÇÃO "IN VITRO" DOS PARASITÓIDES DE OVOS *Trichogramma pretiosum* RILEY, 1879 E *T. galloi* ZUCCHI, 1988 (HYM.: TRICHOGRAMMATIDAE).

Autor: FERNANDO LUÍS CÔNSOLI

Aprovada em:

03/02/1994 Comissão

julgadora:

- Dr. José Roberto Postali Parra

ESALQ/USP

- Dr. Antônio Ricardo Panizzi

EMBRAPA-CNPSO

- Dr. Enrico de Beni Arrigoni

COPERSUCAR

Dr. José Roberto Postali Parra
Orientador

Aos meus pais,

ERCÍDIO e MARIA,

e irmãos,

JOSÉ AUGUSTO, MARIA DE LOURDES, LUCIMAR E LUCIANO,

que me mostraram o sentido de união e trabalho da família,
e que por muitas vezes abdicaram dos seus próprios anseios
para me proporcionar a melhor educação possível. A eles
devo o lugar que ocupo atualmente,

OFEREÇO E DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Roberto Postalli Parra, professor associado do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, pela incontestável orientação, confiança, apoio e incentivo na condução deste trabalho e pelo exemplo de dedicação e profissionalismo;

Ao Dr. Benedito Ferreira do Amaral Filho, professor doutor do Departamento de Zoologia da UNICAMP, responsável pela minha iniciação na área de Entomologia, por toda a sua confiança, amizade e ensinamentos;

Ao Dr. Avelino R. de Oliveira, professor titular do Departamento de Bioquímica da UNICAMP, pelo incentivo em momentos decisivos;

Aos professores do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, pelo incentivo e ensinamentos recebidos;

Ao Dr. Roberto Antônio Zucchi, professor associado do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, pela identificação das espécies de parasitóides utilizadas e pelas sugestões recebidas durante a realização deste trabalho;

Ao Dr. Sérgio Batista Alves, professor associado do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, por permitir a utilização do seu laboratório no início da condução deste trabalho;

Ao Dr. Luís Carlos Marchini, professor do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, e ao Eng. Agr. Gerberson A. de Mendonça, aluno do CPG em Entomologia da ESALQ/USP, pelo fornecimento das lagartas e pupas de *Bombyx mori*;

À Eng^a Agr^a Renata Chiarini Monteiro, aluna do Curso de Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ/USP, pelas sugestões e pela valiosa colaboração nos trabalhos desenvolvidos;

Ao Dr. Lewis Joel Greene, Coordenador do Centro Interdepartamental de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP e, ao Gilberto João Padovan, técnico especializado do referido Centro, pela orientação e auxílio nas análises de aminoácidos livres;

Ao Dr. Raul Machado Neto, professor do Departamento de Zoologia da ESALQ/USP, e à Eng^a Agr^a Rosana Bessi, aluna de pós-graduação do referido Departamento, pelas análises de eletroforese;

Ao Biólogo Heraldo Negri de Oliveira, funcionário do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, pela amizade e pelo excelente trabalho fotográfico;

À Analista de Sistemas **Regina Célia B. de Moraes**, pela paciência e pelo valioso auxílio na ilustração gráfica deste trabalho;

Aos funcionários do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, pela atenção dispensada, especialmente à **Neide, Solange e Cibele**, pela paciência, orientação, colaboração e amizade durante o curso;

Ao **CNPq** e **FAPESP** pela concessão de bolsa de estudos durante a realização do Curso de Pós-Graduação e pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho;

As bibliotecárias da Prefeitura do Campus da USP, em Piracicaba, **Kátia M.P. de Andrade** e **Eliana M.G. Sabino**, pela amizade e revisão das referências bibliográficas;

As auxiliares de bibliotecário, da Biblioteca Central da ESALQ/USP, **Luzia Fátima S. Possato** e **Silvana Cristina N. Oliveira** pelo empenho profissional e amizade;

Ao meu irmão **Luciano** pela convivência, amizade e paciência;

Aos amigos **Edson, Regina, Renata, Silvia e Teresinha** pela sinceridade, paciência, incentivo e companheirismo;

A todos os colegas do CPG em Entomologia, especialmente ao **Alcides** e **José Eduardo** pela convivência no decorrer do curso.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvi
 1. INTRODUÇÃO	 01
 2. REVISÃO DE LITERATURA	 03
CRIAÇÃO DE PARASITÓIDES "IN VITRO"	03
2.1 Estimulantes e substratos para oviposição	03
2.2 Técnicas de incubação extra-uterina	07
2.3 Crescimento e desenvolvimento "in vitro" – Diptera	08
2.4 Crescimento e desenvolvimento "in vitro" – Hymenoptera	14
2.5 Utilização de anticontaminantes	24
 3. MATERIAL E MÉTODOS	 25
3.1 Criação dos insetos hospedeiros	25
3.1.1 Criação de <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie, 1850)	25
3.1.2 Criação de <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner, 1818	26
3.1.3 Criação de <i>Diatraea saccharalis</i> (Fabr., 1794)	26
3.1.4 Criação de <i>Bombyx mori</i> L., 1758	27
3.2 Manutenção de populações de <i>Trichogramma galloi</i> Zucchi, 1988 e <i>T. pretiosum</i> Riley, 1879	27
3.3 Coleta dos componentes de insetos utilizados nas dietas artificiais	28
3.3.1 Coleta da hemolinfa	28
3.3.2 Coleta de holotécidos pupais	28
3.4 Criação de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i> "in vitro"	29
3.4.1 Desenvolvimento da dieta artificial	29
3.4.1.1 Avaliação da necessidade da solução de leite em pó como componente das dietas artificiais	29

3.4.1.2 Determinação de proporção ideal dos componentes da dieta artificial	29
3.4.1.3 Determinação do volume ideal da dieta	32
3.4.1.4 Efeito de substratos para a colocação das dietas	32
3.4.1.5 Efeito dos diversos componentes de insetos no desenvolvimento das dietas artificiais	33
3.5 Desempenho dos insetos produzidos "in vitro" x "in vivo"	33
3.5.1 Avaliações morfológicas	34
3.5.2 Avaliações biológicas	35
3.5.3 Preferência hospedeira de <i>T. galloi</i>	36
3.6 Análise de aminoácidos	37
3.7 Análise de proteínas totais através de eletroforese	39
3.8 Análise estatística	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Desenvolvimento da dieta artificial	40
4.1.1 Avaliação da necessidade da solução de leite em pó como componente das dietas artificiais	40
4.1.2 Determinação da proporção ideal dos componentes da dieta artificial	42
4.1.3 Determinação do volume ideal da dieta	48
4.1.4 Efeito de substratos para a colocação das dietas artificiais	50
4.1.5 Efeito dos diversos componentes de insetos no desenvolvimento das dietas artificiais	52
4.2 Desempenho dos insetos produzidos "in vivo" e "in vitro"	57
4.2.1 Biologia e parasitismo de <i>T. pretiosum</i>	57
4.2.2 Biologia e parasitismo de <i>T. galloi</i>	62
4.2.3 Tamanho de adultos de <i>T. pretiosum</i> e <i>T. galloi</i>	70
4.2.4 Deformação de adultos de <i>T. pretiosum</i> e <i>T. galloi</i>	75
4.2.5 Preferência hospedeira de <i>T. galloi</i>	77
4.3 Análise de aminoácidos	81
4.4 Análise de proteínas totais através de eletroforese	84

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
6. CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXOS	109

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº		PAGINA
01	Composição das dietas artificiais utilizadas na criação "in vitro" de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i> .	30
02	Crescimento e desenvolvimento de <i>T. pretiosum</i> criado em dietas artificiais. Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase 14 horas.	41
03	Duração média do período ovo-adulto, viabilidade larval e pupal de <i>T. pretiosum</i> criado em dietas artificiais compostas por diferentes componentes de insetos. Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase 14 horas.	54
04	Duração média e viabilidade do período ovo-adulto de <i>T. pretiosum</i> criado "in vivo" e "in vitro". Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase 14 horas.	58
05	Número médio de ovos de <i>H. virescens</i> e <i>A. kuehniella</i> parasitados e porcentagem de fêmeas de <i>T. pretiosum</i> criadas "in vivo" e "in vitro", que efetuaram o parasitismo. Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa $60\pm 10\%$ e fotofase 14h.	60
06	Longevidade média (dias), observada e estimada, de fêmeas de <i>T. pretiosum</i> , criadas "in vivo" e "in vitro", parasitando ovos de <i>H. virescens</i> e <i>A. kuehniella</i> . Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa $60\pm 10\%$ e fotofase 14h.	60
07	Duração média e viabilidade do período ovo-adulto de <i>T. galloi</i> criado "in vivo" e "in vitro". Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase 14 horas.	64

- 08 Número médio de ovos de *D. saccharalis* e *A. kuehniella* parasitados e porcentagem de fêmeas de *T. galloi*, criadas "in vivo" e "in vitro", que efetuaram o parasitismo. Temperatura $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase 14h. 67
- 09 Longevidade média (dias), observada e estimada, de fêmeas de *T. galloi*, criadas "in vivo" e "in vitro", parasitando ovos de *D. saccharalis* e *A. kuehniella*. Temperatura $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase 14h. 70
- 10 Dimensões (μ) da tibia posterior e da cápsula genital e relação entre o comprimento da tibia (CT)/ comprimento da cápsula genital (CCG) de fêmeas de *T. pretiosum* criadas "in vivo" e "in vitro". 72
- 11 Dimensões (μ) da tibia posterior e da cápsula genital e relação entre o comprimento da tibia (CT)/ comprimento da cápsula genital (CCG) de fêmeas de *T. galloi* criadas "in vivo" e "in vitro". 73
- 12 Número de ovos de *D. saccharalis* e *A. kuehniella* parasitados por *T. galloi*, criado "in vivo" e "in vitro", em testes de livre escolha. Temperatura $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase 14 horas. 80
- 13 Composição ($\mu\text{mol/ml}$) de aminoácidos livres dos diversos componentes de insetos utilizados nas dietas artificiais de *T. galloi* e *T. pretiosum*, e dos ovos dos hospedeiros naturais e alternativo. 82
- 14 Proporção (%) entre os aminoácidos livres dos diversos componentes de insetos utilizados nas dietas artificiais de *T. galloi* e *T. pretiosum*, e dos ovos dos hospedeiros naturais e alternativo. 83

- 15 Análise comparativa entre os diversos componentes de insetos utilizados nas dietas artificiais e os ovos de *D. saccharalis* hospedeiro natural de *T. galloi*. 85
- 16 Análise comparativa entre os diversos componentes de insetos utilizados nas dietas artificiais e os ovos de *H. virescens* hospedeiro natural de *T. pretiosum* . 86

FIGURA Nº	LISTA DE FIGURAS	PÁGINA
01	Ilustração da colocação dos ovos do parasitóide na dieta artificial. A- ovo do hospedeiro superparasitado; B- liberação dos ovos do parasitóide do interior do ovo do hospedeiro; C- colocação da dieta artificial; D- lâmina escavada no interior da placa de Petri.	31
02	Representação das medições da cápsula genital (A) e tibia (B) de fêmeas de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i> , criadas "in vivo" e "in vitro" (CCG e LCG= comprimento e largura da cápsula genital; CT= comprimento da tibia).	35
03	Viabilidade larval e pupal de <i>T. pretiosum</i> , criado em diversas dietas artificiais, com diferentes proporções de hemolinfa, gema-de-ovo, soro fetal bovino, homogeneizado de ovos e emulsificante. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase 14h.	44
04	Porcentagem de pupas e adultos normais de <i>T. pretiosum</i> obtidos em diversas dietas artificiais, com diferentes proporções de hemolinfa, gema-de-ovo, soro fetal bovino e homogeneizado de ovos. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 14h.	44
05	Duração média do período ovo-adulto de <i>T. pretiosum</i> criado em diversas dietas artificiais, com diferentes proporções de hemolinfa, gema-de-ovo, soro fetal bovino e homogeneizado de ovos. Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase 14h.	45
06	Viabilidade larval e pupal de <i>T. galloi</i> , criado em diversas dietas artificiais, com diferentes proporções de hemolinfa, gema-de-ovo, soro fetal bovino, homogeneizado de ovos e emulsificante. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase 14h.	47

- 07 Porcentagem de pupas e adultos normais de *T. galloi* obtidos em diversas dietas artificiais, com diferentes proporções de hemolinfa, gema-de-ovo, soro fetal bovino e homogeneizado de ovos. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 14h. 47
- 08 Viabilidade larval e pupal de *T. galloi* criado em diversos volumes de dieta artificial, composta de hemolinfa, gema-de-ovo e soro fetal bovino. Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase 14h. 49
- 09 Porcentagem de pupas e adultos normais de *T. galloi* criado em diversos volumes de dieta artificial, composta de hemolinfa, gema-de-ovo e soro fetal bovino. Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase 14 h. 51
- 10 Duração média do período ovo-adulto de *T. galloi* criado em diversos volumes de dieta artificial, composta de hemolinfa, gema-de-ovo e soro fetal bovino. Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase 14h. 51
- 11 Ilustração do desenvolvimento ovo-adulto de *T. pretiosum* e *T. galloi* criados "in vitro". A- larvas; B- pré-pupas (acúmulo corpos de urato); C- pupas recém-formadas; D- pupas no final de desenvolvimento; E- adulto recém-emergido; F.1 e F.2- *T. pretiosum* e *T. galloi* parasitando ovos de *H. virescens* e *D. saccharalis* respectivamente. 53
- 12 Porcentagem de pupas e adultos normais de *T. pretiosum* criado em dieta artificial contendo diferentes componentes de insetos. Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase 14h. 55
- 13 Viabilidade larval e pupal de *T. galloi* criado em dietas artificiais contendo diferentes componentes de insetos. Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase 14 horas. 58

- 14 Porcentagem de pupas e adultos normais de *T. galloi* criados em dieta artificial contendo diferentes componentes de insetos. Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase 14h. 58
- 15 Parasitismo acumulado e parasitismo médio diário de ovos de *H. virescens* por *T. pretiosum*, criado "in vivo" e "in vitro". Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa $60\pm 10\%$ e fotofase 14h. 61
- 16 Parasitismo acumulado e parasitismo médio diário de ovos de *A. kuehniella* por *T. pretiosum*, criado "in vivo" e "in vitro". Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa $60\pm 10\%$ e fotofase 14h. 63
- 17 Curvas de sobrevivência de fêmeas de *T. pretiosum* criadas "in vivo" e "in vitro", parasitando ovos de *H. virescens*. Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa $60\pm 10\%$ e fotofase 14h. Valores calculados pela distribuição de Weibull. 65
- 18 Curvas de sobrevivência de fêmeas de *T. pretiosum* criadas "in vivo" e "in vitro", parasitando ovos de *A. kuehniella*. Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa $60\pm 10\%$ e fotofase 14h. Valores calculados pela distribuição de Weibull. 68
- 19 Parasitismo acumulado e parasitismo médio diário de ovos de *D. saccharalis* por *T. galloi*, criado "in vivo" e "in vitro". Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa $60\pm 10\%$ e fotofase 14h. 69
- 20 Parasitismo acumulado e parasitismo médio diário de ovos de *A. kuehniella* por *T. galloi*, criado "in vivo" e "in vitro". Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa $60\pm 10\%$ e fotofase 14h. 71
- 21 Curvas de sobrevivência de fêmeas de *T. galloi* criadas "in vivo" e "in vitro", parasitando ovos de *D. saccharalis*. Temperatura

- 25±1°C; umidade relativa 60±10% e fotofase 14h. Valores calculados pela distribuição de Weibull. 74
- 22 Curvas de sobrevivência de fêmeas de *T. galloi* criadas "in vivo" e "in vitro", parasitando ovos de *A. kuehniella*. Temperatura 25±1°C; umidade relativa 60±10% e fotofase 14h. Valores calculados pela distribuição de Weibull. 76
- 23 Esquema da estrutura normal do aparelho reprodutor de fêmeas de *T. pretiosum* e *T. galloi*. 78
- 24 Deformações de asas e abdome de adultos de *T. pretiosum* e *T. galloi* criados "in vitro". A- adulto normal; B- abdome volumoso; C- asas infladas; D- asas dobradas; E- asas enroladas; F- asas atrofiadas. 79
- 25 Eletrofotograma dos diversos componentes de insetos utilizados nas dietas artificiais de *T. galloi* e *T. pretiosum*, e de ovos dos hospedeiros naturais e alternativo. (1= ovos de *D. saccharalis*; 2= ovos de *H. virescens*; 3= ovos de *A. kuehniella*; 4= lagartas de *H. zea*; 5= lagartas de *B. mori*; 6= pupas de *B. mori*; 7= pupas de *D. saccharalis* e 8= pupas de *A. gemmatilis*). A seta indica o sentido do deslocamento no gel de poliacrilamida. 84

CRIAÇÃO "IN VITRO" DOS PARASITÓIDES DE OVOS *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 E *T. galloi* Zucchi, 1988 (HYM.: TRICHOGRAMMATIDAE).

Autor: FERNANDO LUÍS CONSOLI

Orientador : Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO POSTALI PARRA

RESUMO

Pesquisadores de países desenvolvidos buscam, atualmente, a criação de inimigos naturais em dietas artificiais para permitir a otimização de alguns programas de Controle Biológico, que, ainda hoje, apresentam algumas limitações. Assim, a criação "in vitro" de inimigos naturais permitiria a utilização de sistemas de criação menos dispendiosos, devido à eliminação de diversas etapas do processo convencional de criação, principalmente aquelas relacionadas a produção dos hospedeiros naturais ou alternativos. Essa pesquisa teve por objetivo desenvolver uma dieta artificial para a criação "in vitro" de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 e *T. pretiosum* Riley, 1879. Para o desenvolvimento dessas dietas foram determinadas as proporções ideais de cada um dos seus componentes e a qualidade nutricional da hemolinfa e dos holotécidos pupais de diferentes espécies de insetos, como um dos principais componentes das dietas artificiais. Os resultados indicaram variações nas exigências nutricionais das duas espécies de parasitóides estudadas, originando dietas com diferentes proporções. A hemolinfa de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) foi a mais adequada para a criação desses parasitóides "in vitro". Foi possível criar ambos os parasitóides em meio artificial até a fase adulta, sendo este, o primeiro relato de criação "in vitro" de *T. galloi*. Foi essencial a presença de gema-de-ovo e de concentrações de hemolinfa superiores a 40% para o completo desenvolvimento de *T. galloi* e *T. pretiosum*. A inclusão de homogeneizado de ovos de *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) à dieta artificial de *T. pretiosum* aumentou a sua viabilidade larval e pupal e o número de pupas e adultos normais formados. Volumes de dieta artificial entre 3µl e 4µl foram adequados ao desenvolvimento e crescimento de *T. galloi* criado em dieta artificial, utilizando-se lâminas escavadas como substrato para o acondicionamento da dieta artificial. Os insetos criados "in vitro" apresentaram menor

capacidade de parasitismo e menor longevidade em relação àqueles criados em ovos dos hospedeiros naturais e alternativo. Ocorreram deformações de asas e abdome de *T. galloi* e *T. pretiosum* criados em dietas artificiais, apesar desses insetos apresentarem aparelho reprodutor normal e tamanho semelhante ao dos insetos criados "in vivo". A preferência hospedeira de *T. galloi* criado em dieta artificial, foi semelhante à do inseto criado em ovos do hospedeiro natural. As análises de proteínas e de aminoácidos livres dos diversos componentes (ovos, hemolinfa e holotécidos pupais) de insetos, utilizados na confecção das dietas artificiais, indicaram diferenças nas frações protéicas e na quantidade de aminoácidos livres para cada um destes componentes. Essas diferenças foram responsáveis pelas variações nos valores biológicos de ambos os parasitóides, quando criados em diferentes dietas artificiais.

"IN VITRO" REARING OF THE EGG PARASITIDS *Trichogramma pretiosum* RILEY,
1879 AND *T. galloi* ZUCCHI, 1988 (HYM.: TRICHOGRAMMATIDAE).

Author: FERNANDO LUÍS CONSOLI

ADVISER: Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO POSTALI PARRA

SUMMARY

The objective of this study was to develop an artificial diet for "in vitro" rearing of *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 and *T. pretiosum* Riley, 1879. For developing such diets, the ideal proportions of each of their components and the nutritional quality of the hemolymph and of the holotissues of different insect species were determined as one of the main components of the artificial diets. The results obtained indicated variations in the nutritional requirements of the two parasitoid species under study which originated diets with different proportions. The hemolymph of *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) proved to be the most adequate for "in vitro" rearing of those parasitoids. It was possible to rear both insects up to the adult stage on an artificial medium and this is the first report on "in vitro" rearing of *T. galloi*. The presence of egg yolk and of hemolymph concentrations over 40% were essential for full development of *T. galloi* and *T. pretiosum*. The inclusion of *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) egg juice in the *T. pretiosum* diet increased the larval and pupal viability as well as the number of normal pupae and adults formed. Volumes of artificial diet between 3 μ l and 4 μ l proved to be adequate for the development and growth of *T. galloi* reared on artificial diets using excavated slides as a container. Insects reared "in vitro" showed lower longevity and parasitism capacity as compared with those reared on natural and alternative host eggs. Wing and abdominal malformations occurred in *T. galloi* and *T. pretiosum* reared on artificial diets, although they presented normal reproductive organs and a similar size to that of insects reared "in vivo". The host preference of *T. galloi* reared on artificial diet was similar to that of the insect reared on natural host eggs. The analyses of proteins and free aminoacids of the various insect components (eggs, hemolymph and pupal holotissues) used in preparing the artificial diets indicated the differences in protein

fractions and in the amount of free aminoacids for each of these components, respectively. Such differences were due to the differences in biological values of both parasitoids when reared on different artificial diets.

1. INTRODUÇÃO

O Controle Biológico Aplicado tem sido utilizado com bastante frequência nos últimos anos para o controle de pragas agrícolas, através de liberações inundativas (PARRA, 1992). Neste caso, os parasitóides são criados em grandes quantidades (criações massais), sobre o hospedeiro natural ou sobre hospedeiros alternativos.

Um exemplo clássico de produção de um inimigo natural, sobre hospedeiros alternativos, é a multiplicação de espécies de *Trichogramma* em ovos de diversas traças. Este parasitóide de ovos é um dos insetos mais estudados, atualmente, no mundo (KING, 1991) e, no Brasil, as primeiras liberações desses insetos foram realizadas nos Estados do Rio de Janeiro e Sergipe em 1948 (MORAES *et al.*, 1983). Desde 1984, o Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) vem estudando este agente para o controle de diversas pragas agrícolas (PARRA *et al.*, 1987), ao lado da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), que tem desenvolvido pesquisas, especialmente, para o controle de pragas do milho (SÁ & PARRA, 1992) e do tomateiro (HAJI, 1992).

No entanto, devido ao grande número de etapas necessárias para a produção "in vivo" de um inimigo natural, utilizando hospedeiros naturais ou alternativos, os custos de produção e, especialmente, de mão-de-obra, podem ser elevados.

Por este motivo, o desenvolvimento de técnicas para a criação de parasitóides "in vitro" tem recebido, em países desenvolvidos, atenção especial na última década, sendo que a maior parte dos estudos concentra-se nas Ordens Diptera e Hymenoptera (CAMPADELLI & DINDO, 1987; MELLINI, 1975; THOMPSON, 1988). Já foram obtidos resultados promissores com 37 espécies de parasitóides "in vitro", sendo que 25 espécies, representando principalmente a Ordem Hymenoptera, completaram seu desenvolvimento (BRATTI, 1990).

Esta técnica de produção é ideal para a criação em larga escala de inimigos naturais, pois permite que se prescindia da criação dos hospedeiros. O domínio dessa técnica permitirá definir as exigências nutricionais dos parasitóides, além de ampliar os

conhecimentos sobre as relações existentes entre hospedeiro e parasitóide (GREANY, 1986; GRENIER *et al.*, 1986; THOMPSON, 1986).

Apesar de problemas relacionados aos aspectos fisiológicos da interação hospedeiro:parasitóide e fatores relacionados ao desenvolvimento do substrato alimentar artificial, países como a China produzem, atualmente, cerca de 48-50 milhões de *Trichogramma* por dia, utilizando um sistema semi-automatizado de produção "in vitro". Estes parasitóides são liberados de forma inundativa para o controle de diversas pragas agrícolas naquele país, com bastante sucesso e redução significativa dos custos de produção (DAI *et al.*, 1992; YE & WANG, 1992).

Esse trabalho teve por objetivo desenvolver uma dieta artificial, que permita a criação "in vitro" de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 e *T. pretiosum* Riley, 1879, parasitóides importantes de inúmeras pragas agrícolas no Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

CRIAÇÃO DE PARASITÓIDES "IN VITRO"

2.1. Estimulantes e substratos para oviposição

ARTHUR *et al.* (1969) foram os primeiros autores a relatarem a presença de componentes químicos na hemolinfa de insetos, que estariam estimulando a oviposição de um parasitóide. Trabalhando com o parasitóide pupal *Itopectis conquisitor* (Say) (Hym.: Ichneumonidae), os autores isolaram da hemolinfa de pupas de *Galleria mellonella* (Stainton) (Lep.: Pyralidae) a fração responsável pela indução da oviposição. Determinaram um peso molecular ao redor de 7.000 daltons para esta fração, indicando que o componente ativo poderia ser de caráter protéico, possivelmente um polipeptídeo.

Na tentativa de identificação dessa molécula, ARTHUR *et al.* (1972) investigaram a capacidade de indução da oviposição de *I. conquisitor* por vários componentes químicos presentes na hemolinfa de insetos. Após ser dissolvido em água destilada, cada componente tinha o seu pH ajustado em torno de 7,0, com o auxílio de soluções de HCl ou NaOH, e era colocado em "tubos" de "parafilm" (35 x 7mm). Os melhores resultados foram obtidos quando da utilização dos aminoácidos alanina, em altas concentrações, ou arginina, em baixas concentrações, adicionados individualmente à serina. O aminoácido lisina apresentou eficiência em um amplo intervalo de concentrações, sendo a treonina o único aminoácido ineficaz. Excetuando-se a serina, a forma levógira dos aminoácidos demonstrou ser a mais adequada. Estes autores ainda determinaram o efeito do pH na oviposição de *I. conquisitor*. Utilizando soluções de l-serina e l-arginina, verificaram que a faixa de pH ideal para a oviposição encontrava-se entre 6,5-9,0. Relataram ainda o efeito dos íons Na^+ e Mg^{+2} (estimulantes), Ca^+ e P^{+4} (inibidores) e K^+ (indiferente).

Em trabalho subsequente, HEGDEKAR & ARTHUR (1973) avaliaram a eficiência na indução do parasitismo de *I. conquisitor*, utilizando hemolinfa de insetos

pertencentes a várias Ordens, sendo encontrada resposta apenas para os integrantes de Lepidoptera, Hymenoptera, Coleoptera e Trichoptera.

Os primeiros trabalhos sobre a indução e/ou coleta de ovos de *Trichogramma* foram conduzidos por RAJENDRAM & HAGEN (1974), que adaptaram técnicas utilizadas na alimentação de insetos predadores, para verificar o comportamento de parasitismo de *Trichogramma californicum* Nagaraja & Nagarkatti (Hym.: Trichogrammatidae). Assim, utilizaram uma solução de parafina:vaselina (3:1) para a encapsulação das soluções testes. O processo de encapsulação consistiu na adição de 0,5g da mistura parafina:vaselina com 13ml da solução teste, aquecida a uma temperatura próxima ao ponto de fusão da parafina (48°C), o que permitiu a obtenção de uma película de parafina, de 2mm de espessura, envolvendo a solução teste utilizada. As esferas foram obtidas através da imersão de uma pipeta Pasteur dentro da solução, sendo esta, posteriormente, colocada em contato com a superfície de uma tira de "parafilm". Este processo resultou em esferas de 2,3mm de diâmetro por 1,5-2,0mm de altura. Os autores avaliaram o efeito da água destilada, da solução fisiológica neutralizada pela adição de NaOH 2N, mistura de aminoácidos e sais de Neisenheimer.

RAJENDRAM (1978a) avaliou a oviposição de *T. californicum* em esferas de parafina, alterando a concentração das substâncias testadas e o número de fêmeas do parasitóide. Os resultados demonstraram que fêmeas de *T. californicum* não ovipositaram em soluções de NaCl a 0,21% e 1,7%, sendo necessário um número mínimo de 48 fêmeas para que ocorresse o parasitismo nas demais concentrações (0,43-1,28%).

RAJENDRAM (1978b) testou vários tipos de cera para a produção de "ovos" artificiais, verificando que os materiais com ponto de fusão elevado (70-80°C) afetaram o comportamento de oviposição de *T. californicum*. A resistência e a viscosidade deste tipo de cera foram os principais fatores que impediram a penetração do ovipositor de fêmeas de *T. californicum* nos "ovos" artificiais. Os melhores resultados foram obtidos com combinações utilizando-se parafina, que apresenta ponto de fusão ao redor de 48°C.

Baseando-se nos relatos de ARTHUR *et al.* (1969, 1972) da existência de compostos químicos na hemolinfa de insetos, que estimularam a oviposição por *I. conquisitor*, NETTLES *et al.* (1982, 1983), através de análises químicas da composição da hemolinfa e holotécidos de lagartas de *Heliothis* spp. (Lep.: Noctuidae), desenvolveram o mais eficiente meio estimulante de oviposição para *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hym.: Trichogrammatidae). Esse meio foi composto de uma mistura de sais KCl-MgSO₄.

utilizados em concentrações superiores, em cerca de 50%, às encontradas em holotécidos larvais de *Heliothis* spp.. Esta solução demonstrou ser mais ativa para *T. pretiosum*, em relação a *T. minutum* Riley (NETTLES *et al.*, 1982) e, através de uma avaliação mais detalhada, foi sugerido que o íon K^+ agiu como um estimulante, sendo que o íon Mg^{+2} exerceu um papel sinérgico (NETTLES *et al.*, 1983).

QIN & WU (1988) constataram o efeito da indução do parasitismo de *Trichogramma dendrolimi* Matsumura pelos aminoácidos leucina, fenilalanina e isoleucina. O estímulo fornecido por misturas desses aminoácidos foi superior ao obtido quando os aminoácidos foram utilizados individualmente.

Na tentativa de obtenção de um substrato artificial para postura de espécies de *Trichogramma*, MORRISON *et al.* (1983) trabalharam com uma membrana sintética, constituída por um polímero à base de silicone-policarbamato, desenvolvendo uma película plana, de característica altamente elástica e resistência relativa, com orifícios da ordem de 0,15 a 1,65 μm de diâmetro. Em testes realizados com *T. pretiosum*, utilizando como meio estimulante uma solução de $KCl-MgSO_4$, os citados autores obtiveram 8,92 ovos/fêmea do parasitóide, valor este similar ao obtido no hospedeiro alternativo.

LI *et al.* (1988) avaliaram polímeros plásticos (polietileno e polipropileno) de várias espessuras para cinco espécies de *Trichogramma* e *Anastatus* sp. (Hym.: Eupelmidae). As espessuras dos polímeros testados foram previamente selecionadas, utilizando-se, como parâmetro, as medidas dos oviposidores das espécies de parasitóides estudadas. Foram confeccionados dois tipos de cartões dos polímeros plásticos mencionados, contendo cerca de 33 a 52 cápsulas semi-esféricas (2,5 a 3,0 mm de diâmetro), servindo para o acondicionamento do meio estimulante, no caso, a própria dieta artificial utilizada. Os resultados indicaram a preferência de *T. dendrolimi* e *T. confusum* Viggiani por películas mais espessas, variando de 34-65 μm para o polietileno e de 32-36 μm para o polipropileno. *Anastatus* sp., *T. nubilale* Ertle & Davis, *T. chilotrae* Nagaraja & Nagarkatti e *T. japonicum* Ashmead preferiram ovipositar em película plástica de polietileno, com espessura variando entre 10-18 μm .

LI (1989) verificou a preferência de *T. evanescens* Westwood, *T. ostrinae* Pang & Chen, *T. maidis* Pintureau & Voegelé, *T. pretiosum*, *T. embryophagus* Hartig, *T. cacoeciae* Marchal, *T. nagarkatti* Voegelé e *T. trjapitzini* Sorokina por polietileno (10-18 μm de espessura), sendo que as espécies *T. cordubensis* Vargas e *T. closterae* Pang &

Chen preferiram as películas de polietileno e polipropileno, com espessuras de 34-65µm e 32-36µm, respectivamente.

NETTLES *et al.* (1985) avaliaram o efeito de diferentes dietas artificiais, hidrolisados protéicos, glicose e sais inorgânicos no comportamento de parasitismo de *T. pretiosum*. Concentrações de sais (K^+ , Mg^{+2} e Na^+) baseadas na análise química da composição dos ovos e hemolinfa de lepidópteros, demonstraram que concentrações semelhantes à encontrada em ovos de *Sitotroga cerealella* (Oliver) (Lep.: Gelechiidae) exerceram pequeno efeito estimulante, quando comparadas àquelas presentes na hemolinfa de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) e holotecidos de *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781) (Lep.: Noctuidae). Os demais compostos, como glicose e hidrolisado de caseína, adicionados a solução de $KCl-MgSO_4$, e o íon NH_4^+ inibiram fortemente a oviposição por *T. pretiosum*.

GRENIER *et al.* (1993) avaliaram a capacidade de postura de *Trichogramma brassicae* Voegelé em um substrato artificial, tratado superficialmente com extrato de escama de *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lep.: Pyralidae), solvente puro ou uma mistura de hidrocarbonetos saturados, previamente identificados em ovos de *O. nubilalis*. O substrato artificial desenvolvido para a criação "in vitro" de parasitóides foi constituído de uma película plástica de polietileno (20-30µm), com depressões semi-esféricas, com 1,3mm de diâmetro e 1,6mm de altura. Cada película plástica continha 54 semi-esferas, que foram preenchidas com um meio transparente, para que se permitisse a contagem do número de ovos do parasitóide. Este meio foi composto de hemolinfa pupal de *Mamestra brassicae* L. (Lep.: Noctuidae) (50%), gema-de-ovo (5%), leite semi-desnatado (5%) e solução salina de Neisenheimer (40%). A oviposição obtida com a utilização do extrato de escamas foi superior em cerca de 15x à oviposição na testemunha e, em cerca de 2,5x em relação ao solvente puro. A mistura dos 5 principais hidrocarbonetos saturados (heneicosano, tricosano, pentacosano, heptacosano e nonacosano) encontrados em extratos de ovos de *O. nubilalis* apresentou o mesmo efeito estimulante daquele apresentado pelo extrato de escamas, indicando que essa mistura atuou como um caiomônio de contato.

TILDEN & FERKOVICH (1988) desenvolveram técnica para facilitar e maximizar a coleta de ovos do parasitóide *Microplitis croceipes* (Cresson) (Hym.: Braconidae), para a utilização na produção "in vitro", evitando, desta forma, o exaustivo trabalho de dissecação das lagartas hospedeiras. A oviposição do parasitóide foi realizada em uma solução de agarose a 0,75% imersa em hemolinfa, adicionada de pequena

quantidade de feniltiuréia, para se evitar a melanização. A aceitação pela hemolinfa de lagartas de *H. zea* como agente estimulante de oviposição foi superior à de *Manduca sexta* (Cr.) (Lep.: Sphingidae).

ROTUNDO *et al.* (1988) coletaram ovos de *Lysiphlebus fabarum* (Marshall) (Hym.: Braconidae) utilizando glóbulos de parafina, que tiveram sua superfície pulverizada com um extrato produzido com fêmeas do pulgão *Aphis fabae* Scopoli (Homoptera: Aphididae). Os ovos permaneceram nesta condição até a eclosão das larvas, que foram transferidas para a dieta artificial, acondicionada em placas de poliestireno.

BATTISTI *et al.* (1990) desenvolveram uma membrana sintética (PVC), de 0,1mm de espessura, para ser utilizada como substrato de postura de *Ooencyrtus pityocampae* (Mercet) (Hym.: Encyrtidae). Para tornar-se adequada à postura do parasitóide, essa membrana foi deformada para fornecer um aspecto de semi-esfera, que foi fechada com o auxílio de uma tira de polipropileno. O número de fêmeas que ovipositaram nesse substrato foi muito reduzido, ocorrendo um ligeiro aumento, quando foram oferecidos ovos do hospedeiro natural em conjunto com ovos artificiais.

Em estudo subsequente, MASUTTI *et al.* (1991) utilizaram diversas membranas plásticas de 40µm de espessura, especialmente vinil acetato ou polieteno. Os ovos artificiais apresentaram dimensões de 0,6-1,0mm de altura e 1,5mm de diâmetro, sendo preenchidos com gema-de-ovo como substrato para a indução da oviposição. Verificaram que fêmeas no período máximo da oogênese (6º dia), quando expostas por 1 minuto a uma intensidade luminosa de 30.000 lux, apresentaram a maior taxa de parasitismo de ovos artificiais (87%), com o menor índice de superparasitismo (2,5%), comparadas às fêmeas que se encontravam na fase de oosorção (13º dia), que parasitaram 28% dos ovos, com um índice de superparasitismo de 10,7%.

2.2. Técnicas de incubação extra-uterina

GRENIER (1979) desenvolveu uma técnica para a obtenção da embriogênese de *Lixophaga diatraeae* (Town.) e *Phryxe caudata* (Rond.) (Dip.: Tachinidae) em meio artificial, visando à coleta de larvas neonatas, para a criação desses parasitóides em dietas artificiais, limitando, desta forma, os problemas de contaminação. Para a obtenção dos ovos recém fertilizados, as fêmeas dos parasitóides foram esterilizadas externamente com uma solução de álcool 70% e cetavom 1%, para posterior

dissecação dos úteros. Os ovos recém fertilizados foram transferidos para dois meios sintéticos diferentes, sendo as larvas recém-eclodidas "inoculadas" em lagartas de *G. mellonella* para se verificar a qualidade do inseto incubado artificialmente. Os melhores resultados foram obtidos com o meio M associado a 0,5% de agarose, que forneceu uma sobrevivência larval semelhante àquela obtida "in vivo". O meio líquido reduziu a sobrevivência larval para valores próximos a 50%.

MELLINI & CAMPADILLI (1988), buscando uma técnica que permitisse a incubação extra-uterina de ovos de *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Dip.: Tachinidae), para a utilização em processos de criação "in vitro", extraíram o útero de fêmeas desse parasitóide, submetendo-os a um processo de centrifugação (1000rpm por 10-15 segundos) em solução salina ou água destilada. Este processo apresentou altos percentuais de viabilidade, comparáveis aos apresentados por ovos incubados naturalmente, permitindo um melhor aproveitamento das fêmeas do parasitóide, que normalmente apresentam mortalidade prematura.

2.3 Crescimento e desenvolvimento "in vitro" - Diptera

HOUSE & TRAER (1948) foram um dos primeiros autores a relatar a criação de um parasitóide em dieta artificial. Utilizando um meio oligídico, composto de homogeneizado de fígado de porco e carne de peixe (3:1), obtiveram um desenvolvimento para *Agria affinis* (Fallen) (Dip.: Sarcophagidae) superior ao encontrado quando esse parasitóide era criado em seu hospedeiro natural.

Posteriormente, HOUSE (1954a), visando realizar estudos básicos de nutrição de insetos, desenvolveu uma dieta holídica e uma técnica asséptica para a criação de *A. affinis*. A dieta foi composta por uma mistura de aminoácidos livres, ácido ribonucleico, colesterol, dextrose, mistura de sais, vitaminas e ágar. O pH da dieta foi ajustado para 5,8, antes da inclusão do ágar, para que se mantivessem as propriedades gelatinizantes do ágar. Obtiveram uma viabilidade larval e pupal de 59,9% e 31,7%, respectivamente, e, apesar dos adultos obtidos serem normais e acasalarem, todos os ovos colocados foram inférteis. A dissecação de machos e fêmeas mostrou que as gônadas reprodutivas de ambos os sexos não apresentavam nenhuma anormalidade aparente.

HOUSE (1954b) relatou que a dieta desenvolvida para *A. affinis* (HOUSE, 1954a) atendeu melhor às exigências nutricionais das fêmeas, pois o número de fêmeas obtido foi muito superior ao de machos. A utilização desta dieta holidica, em estudos posteriores, permitiu a determinação das exigências de 11 vitaminas (HOUSE, 1954b), 19 aminoácidos (HOUSE, 1954c) e vários outros nutrientes no crescimento e desenvolvimento de *A. affinis* (HOUSE, 1954d). Quanto ao efeito das vitaminas, foi verificado que tiamina, riboflavina, pantotenoato de cálcio, cloreto de colina e biotina foram essenciais para o desenvolvimento e crescimento larval desse parasitóide, sendo que a omissão do ácido para-aminobenzoico estimulou o crescimento de *A. affinis*.

HOUSE (1954c) dividiu os aminoácidos em três classes: essenciais (l-arginina, l-histidina, dl-isoleucina, l-leucina, l-lisina, dl-metionina, dl-fenilalanina, dl-triptofano e dl-valina), benéficos (dl-alanina, glicina, dl-serina e l-tirosina), que quando ausentes da dieta, apenas alteravam a taxa de crescimento do inseto e, aqueles que não afetaram o desenvolvimento e crescimento larval de *Pseudosarcophaga affinis* (Fallen) (Dip.: Sarcophagidae) (dl-ácido aspártico, l-cisteína, l-ácido glutâmico, l-hidroxiprolina e l-prolina).

HOUSE (1954d) verificou a necessidade do ácido ribonucleico, dextrose, sais minerais, colesterol e ácidos graxos para um crescimento ótimo de *P. affinis* sendo que a glutatona não foi considerada um componente essencial, mas que provavelmente alterava o processo de metamorfose desse inseto.

Devido às alterações provocadas pela utilização de moléculas simples e pequenas (aminoácidos livres, entre outros) em dietas artificiais, principalmente quanto à osmolaridade e viscosidade do meio, que podem tornar o meio inadequado ao desenvolvimento do inseto, HOUSE & BARLOW (1964) determinaram os níveis ideais de aminoácidos livres (2-3%) e glicose (0,5-1,0%) em dietas holidicas utilizadas na criação de *P. affinis*. O atraso no desenvolvimento larval de *P. affinis* em dietas com concentrações elevadas de aminoácidos livres, não pôde ser atribuído ao desbalanço entre as fontes de carbono e nitrogênio, pois dietas com altos níveis de caseína, que também apresentaram essa característica, foram satisfatórias ao crescimento de *P. affinis*. Verificaram também, que níveis de glicose superiores a 1% alteraram o crescimento e desenvolvimento do parasitóide, devido a alterações na pressão osmótica do meio.

¹Anteriormente descrita como *Agria affinis* (Fallen).

HOUSE (1966) avaliou o efeito do balanço de nutrientes na nutrição de *P. affinis* relatando a influência da variação da concentração entre os componentes da dieta, como aminoácidos, sais minerais, entre outros, na taxa de crescimento, peso e balanço hídrico de larvas desse parasitóide.

GRENIER *et al.* (1974), baseando-se em análises químicas da composição da hemolinfa de larvas de *G. mellonella*, desenvolveram um meio básico, que, associado a oligoelementos, vitaminas, ácidos nucleicos, entre outros, permitiu a composição de 11 diferentes dietas holidicas. Essas dietas foram utilizadas na criação de *P. caudata* não permitindo o desenvolvimento larval, assegurando, apenas, uma sobrevivência larval até o 40º dia. Verificaram que o ácido ribonucleico foi indispensável à sobrevivência de larvas neonatas; observaram o efeito positivo de doses elevadas de vitaminas e a ação tóxica dos ácidos graxos, que ocasionaram até 100% de mortalidade larval.

Posteriormente, GRENIER *et al.* (1975) desenvolveram uma dieta holidica, fundamentados em análises químicas de hidrolisados larvais do parasitóide *P. caudata*. Avaliaram 5 dietas, concluindo que a adição simultânea de colesterol e Tween 80 forneceu resultados superiores àqueles obtidos quando esses componentes participaram isoladamente dos meios sintéticos, com as larvas completando o 2º instar. Os autores ainda sugeriram que as exigências nutricionais para o 1º e 2º instar não foram similares, pois o meio que se apresentou adequado ao crescimento e desenvolvimento das larvas de 1º instar, não o foi para o 2º.

BONNOT *et al.* (1984) realizaram modificações na dieta básica desenvolvida para *P. caudata* (GRENIER *et al.*, 1975), que consistiram na adição de ácido ribonucleico, vitaminas e colesterol, obtendo o completo desenvolvimento larval do parasitóide e adultos fecundos, quando iniciavam a criação com larvas do 2º instar. A criação, a partir de larvas recém-eclodidas, permitiu o desenvolvimento apenas até o último instar larval.

GRENIER *et al.* (1978) criaram, com sucesso relativo, *L. diatraeae* em meio holidico, composto por ácidos orgânicos, sais minerais, vitaminas, aminoácidos livres, uma variedade de hidrolisados proteicos, glicogênio, fatores lipogênicos de crescimento e ágar. Houve a emergência de poucos adultos, demonstrando que a osmolaridade do meio foi um fator decisivo para o perfeito crescimento e desenvolvimento larval desse parasitóide.

NETTLES *et al.* (1980) adicionaram bases púricas e pirimidínicas, trealose, trioletina, albumina e hidrolisado de levedura à dieta descrita para *L. diatraeae* (GRENIER

et al., 1978) e desenvolveram duas dietas para *Eucelatoria* sp. (Dip.: Tachinidae), que diferiram em sua consistência. A dieta líquida só permitiu o crescimento e desenvolvimento larval desse parasitóide, quando o sistema de criação foi submetido a um mecanismo de agitação (90 rotações/minuto), o que pôde ter proporcionado um estímulo à alimentação e/ou aumento da taxa de troca gasosa entre as larvas, a dieta e a atmosfera. As dietas semi-líquidas, em que foram utilizadas concentrações de ágar entre 1,0 a 1,5%, permitiram a obtenção de 24 pupas e 3 adultos, quando a criação foi iniciada com larvas com 3-8 horas de desenvolvimento. Entretanto, a utilização de larvas com 1 dia de idade permitiu a obtenção de 15% de pupas e 13% de adultos, com uma taxa de desenvolvimento similar à apresentada quando *Eucelatoria* sp. foi criada no seu hospedeiro natural. Esse foi o primeiro relato de obtenção de um endoparasitóide larval em dieta artificial. Esse sucesso foi conferido, principalmente, ao sistema de criação utilizado, que consistiu em transferir larvas de *Eucelatoria* sp. em uma gota da dieta líquida, para a superfície de uma dieta gelatinizada. Esse procedimento permitiu o desenvolvimento dos primeiros instares em meio líquido, conferindo uma passagem gradual para a dieta gelatinizada, sem que ocorressem grandes alterações na pressão osmótica, sendo o excesso de dieta líquida absorvido gradualmente pela dieta gelatinizada, permitindo que os espiráculos das larvas ficassem em contato direto com o ambiente.

NETTLES (1986a), utilizando a dieta desenvolvida por NETTLES *et al.* (1980), testou várias dietas holidicas e meridicas para a criação de *Eucelatoria bryani* Sab. (Dip.: Tachinidae). Os melhores resultados foram obtidos com a dieta de NETTLES *et al.* (1980), acrescida de soro fetal bovino e uma mistura de aminoácidos com concentração intermediária à utilizada na citada dieta e a composição de larvas de *E. bryani*. A esta dieta foram adicionadas fontes protéicas suplementares, como a farinha de soja ou Yeastolate® + farinha de soja. Foram obtidos valores de viabilidade larval de 44 e 45% e pupal de 28 e 30%, respectivamente, para as dietas suplementadas com farinha de soja ou Yeastolate® + farinha de soja.

NETTLES (1986b), em estudos de omissão de aminoácidos para a determinação das exigências nutricionais, comprovou ser a asparagina um componente essencial, em dietas artificiais, ao desenvolvimento e crescimento de *E. bryani*. Relatou mortalidade de 71% das larvas de 2º instar, não ocorrendo o desenvolvimento até a fase pupal, quando a asparagina foi retirada da dieta. Mesmo quando substituída pelo ácido aspártico, a sobrevivência larval foi muito baixa. O autor argumentou que, através da

evolução da relação hospedeiro:parasitóide. *E. bryani* sofreu mutações não letais, as quais acarretaram uma redução ou perda total da atividade de enzimas do tipo asparagina sintetase e de suas peptidases, responsáveis pela transformação das proteínas ou polipeptídeos em aminoácidos.

NETTLES (1987), em estudo complementar, avaliou as exigências de aminoácidos de *E. bryani* em meio artificial (NETTLES, 1986a), verificando a necessidade de 10 aminoácidos livres (arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina), além da necessidade pelo aminoácido prolina que, quando retirado da dieta, ocasionou mortalidade de 97% das formas imaturas. Os aminoácidos glicina e tirosina foram benéficos ao crescimento desse parasitóide, por aumentarem o número de pupas e adultos formados.

Devido ao elevado custo das dietas holidicas, dos efeitos nocivos do ágar ao processo digestivo e à dificuldade das larvas neonatas digerirem material particulado, como a farinha de soja, BRATTI & NETTLES (1992) desenvolveram meios artificiais mais baratos e adequados à criação de *E. bryani*. Assim, criaram larvas desse parasitóide até o início do 3º instar em dieta desenvolvida por NETTLES (1986a), sendo posteriormente transferidas para dieta composta de farinha de soja (2,6%), aminoácidos livres (1,83%) e gema-de-ovo (1,6%). Verificaram que a utilização de dieta gelatinosa ou de algodão hidrófilo, como suporte físico às larvas do parasitóide, não alteraram o desenvolvimento de *E. bryani*. Nas dietas com 1,83% de aminoácidos houve o desenvolvimento de 69,4% de pupas e 53,9% de adultos, resultados esses superiores aos encontrados em dieta sem aminoácidos, que apresentaram viabilidade larval e pupal de 58,9% e 1,4%, respectivamente. Os resultados demonstraram que os aminoácidos livres também foram essenciais ao desenvolvimento do 3º instar larval de *E. bryani*. Os autores alegaram que, apesar das secreções salivares serem em quantidades elevadas e suficientes para a digestão do meio artificial, aparentemente, os níveis de proteases foram insuficientes. Argumentaram, ainda, que, mesmo se as enzimas proteolíticas estivessem presentes, poderia estar ocorrendo a inibição da sua atividade por algum componente do próprio meio artificial.

BRATTI & MONTI (1988) relataram a obtenção de adultos de *P. rufifrons* em homogeneizado pupal de *G. mellonella*, acrescido de 0,006% de sulfato de gentamicina. O preparo do meio consistiu no esmagamento de 4-5 pupas de *G. mellonella* em seringa esterilizada de 10ml, previamente submetidas a um tratamento térmico (60-62°C) para a inativação das fenoloxidasas (SHAPIRO & IGNOFFO, 1973). Ao

líquido coletado em um Becker, foi adicionado ágar até a concentração final de 1%. Posteriormente, com o auxílio de uma seringa, foram distribuídos cerca de 100-150mg de dieta/orifício da placa de cultura de tecido. Esta técnica permitiu o desenvolvimento de 3,3% de pupas e 2,5% de adultos.

Devido ao baixo rendimento da criação de *P. rufifrons* em dietas artificiais com níveis praticamente inexistentes de hormônio do crescimento, FANTI (1990) avaliou o efeito do hormônio juvenil-I, metopreno e 20-hidroxiecdisônio em dieta artificial e natural, no desenvolvimento de larvas de *P. rufifrons*. Verificou que as larvas do parasitóide, transferidas para larvas "cintadas" de *G. mellonella* (larvas que tiveram o fluxo dos hormônios da ecdise interrompido com o auxílio de uma atadura na região mediana do corpo), não efetuaram a ecdise, exceto quando do tratamento tópico da larva com 20-hidroxiecdisônio. Constatou também que larvas de *P. rufifrons* foram aptas a realizar a "muda" e a continuar o crescimento, a não ser quando tratadas com o hormônio juvenil-I ou o metopreno, que impediram a ecdise do inseto.

Utilizando a dieta holidica de NETTLES *et al.* (1980), FANTI (1990) verificou a ocorrência de crescimento normal das larvas de *P. rufifrons* quando estas foram tratadas (topicamente ou adicionando-se o hormônio à dieta) com 20-hidroxiecdisônio. Estes resultados confirmaram a exigência do parasitóide por fontes hormonais do hospedeiro no início do seu desenvolvimento, principalmente quando da utilização de dietas holidicas.

FANTI & BRATTI (1991), em estudo complementar, testaram várias dietas holidicas e merídicas, verificando que o número de larvas de *P. rufifrons* que atingiram o 2º instar (56,6-96,0%) foi diretamente proporcional ao período em que as larvas se desenvolveram no hospedeiro natural (24-168 horas). A utilização de dieta meridica, à base de hemolinfa de *M. sexta* (XIE *et al.* 1988a), permitiu o desenvolvimento completo de pequena porcentagem do parasitóide. Já os resultados com dietas holidicas, contendo 20-hidroxiecdisônio, demonstraram ser possível reproduzir as exigências para a primeira ecdise do parasitóide, eliminando o uso de extrato de insetos.

BRATTI & NETTLES (1989) obtiveram o desenvolvimento de *Palexorista laxa* (Curran) (Dip.: Tachinidae) em meio oligídico, composto de hemolinfa de lagartas de último instar de *M. sexta* (70-75%) e resíduos de soja (Fi-PR0●) (20-25%). A dieta (300mg) foi colocada em placas de Petri (5cm diâmetro x 1,2cm altura), sendo as larvas, com 4-5 horas de desenvolvimento, colocadas sobre a dieta. Os resíduos de soja, além de elevados níveis de proteínas e sais minerais, forneceram uma película de sustentação

devido ao seu alto teor em fibras, servindo, dessa forma, como agente gelatinizante. Essas características permitiram o desenvolvimento de cerca de 20,8–21,8% de pupas e 8,3–13,1% de adultos.

2.4. Crescimento e Desenvolvimento "in vitro" – Hymenoptera

BOULETREAU (1968) obteve viabilidade total de 1,7% para *Pteromalus puparum* L. (Hym.: Pteromalidae) criado em dieta artificial. O meio utilizado na criação desse parasitóide consistiu de hemolinfa de pupas de *Pieris brassicae* L. (Lep.: Noctuidae) em diapausa. O peso das larvas do inseto criado artificialmente foi similar ao das larvas que se desenvolveram no hospedeiro natural. O baixo rendimento obtido na produção "in vitro" desse parasitóide foi atribuído à inadequação nutricional do meio utilizado e à manipulação das larvas, que proporcionaram alta mortalidade larval.

BOULETREAU (1972), visando estabelecer técnicas de criação que permitissem o estudo nutricional de larvas de *P. puparum*, obteve o desenvolvimento dessa espécie em hemolinfa de *P. brassicae*, com uma viabilidade total de 70%. Entretanto, a utilização de condições semi-artificiais para a criação de *P. puparum*, que envolveu o emprego da porção anterior de pupas de *P. brassicae* para o desenvolvimento do parasitóide, reduziu a viabilidade total para 40%.

HOFFMAN *et al.* (1973) criaram *P. puparum* em hemolinfa de lagartas de 5º instar de *H. zea* previamente submetidas a um tratamento térmico para se anular o efeito das fenoloxidasas (SHAPIRO & IGNOFFO, 1973). A hemolinfa, após ser coletada, foi submetida a um processo de centrifugação (23.000g por 30 minutos a 50°C), para a remoção completa do material celular. Avaliaram diversas concentrações de hemolinfa como substrato alimentar para *P. puparum*, sendo que o crescimento e desenvolvimento foram obtidos apenas em concentrações de hemolinfa superiores a 50%. Dietas com concentrações inferiores a 50% mostraram-se inadequadas ao desenvolvimento desse inseto, ocasionando alta mortalidade larval. No entanto, os adultos obtidos "in vitro" foram semelhantes aos insetos criados "in vivo".

Na tentativa de se eliminar a participação dos componentes de insetos em dietas artificiais, HOFFMAN & IGNOFFO (1974) desenvolveram um meio semi-sintético para a criação de *P. puparum*, composto de hidrolisado de levedura, soro fetal bovino e meio de cultura de Grace (utilizado especificamente para o crescimento e multiplicação

de células de insetos). Mesmo ocorrendo 27% de viabilidade larval e 44% de viabilidade pupal neste meio semi-sintético, o rendimento foi extremamente inferior ao obtido em dieta composta de hemolinfa de inseto, que apresentou 86% de viabilidade larval e 89% de viabilidade pupal. Apesar dos adultos obtidos no meio semi-sintético serem férteis, apresentaram tamanho reduzido, o que provavelmente poderia afetar a fecundidade dos adultos em relação aos insetos criados no hospedeiro natural.

BRONSKILL & HOUSE (1957) utilizaram dieta oligídica, composta de partes iguais de fígado de porco e solução aquosa de cloreto de sódio a 0,8%, para a criação de *Pimpla turionella* (L.) (Hym.: Ichneumonidae), obtendo 7% de emergência de adultos. Após os componentes da dieta serem homogeneizados, foram autoclavados por um período de 15 minutos, transformando a dieta em um coagulado. Para a obtenção de uma dieta de consistência líquida, adicionaram água destilada, mantendo-se a assepsia do meio. As larvas permaneceram em contato com a dieta até atingirem a fase de pré-pupa, quando foram transferidas para cápsulas de gelatina, para que ocorresse a pupação e emergência.

AWUITOR *et al.* (1984) utilizaram a técnica de criação proposta por Tersac & Guerdox (1981)², para avaliar o crescimento de *P. instigator* Fabr. (Hym.: Ichneumonidae) em alguns meios artificiais. O desenvolvimento desse parasitóide foi obtido apenas em meio artificial composto por homogeneizado de pupas de *P. brassicae*, com a formação de 30% de adultos, que apresentaram fertilidade normal.

YAZGAN & HOUSE (1970), baseando-se nos estudos nutricionais realizados por HOUSE (1966), criaram *I. conquisitor* em dieta holidica, composta por uma mistura de aminoácidos, ácido ribonucleico, mistura de sais e ágar, ou suplementada com colesterol e ácidos graxos, mistura de lipídeos, hidróxido de potássio, solução de glicose e vitaminas hidrossolúveis. Para a criação de *I. conquisitor* foram utilizados tubos (10 x 75mm) contendo 0,5ml da dieta, fechados com algodão hidrófilo ou cortiça. Os melhores resultados foram encontrados na dieta holidica, sem suplementos, demonstrando ainda que os tubos vedados com algodão hidrófilo deram origem a adultos maiores, provavelmente devido à evaporação do excesso de água presente, o que reduziu a diluição da dieta.

YAZGAN (1972), utilizando dieta sintética de HOUSE (1954a), avaliou o efeito da concentração de nutrientes como aminoácidos, carboidratos e lipídeos no

². Tersac, J. & Guerdox, J.L. Elevage de *Pimpla instigator* (Hym.: Ichneumonidae). *Entomophaga*, Paris, 26: 221-32, 1981.

desenvolvimento de *I. conquisitor*. O autor relatou valores de emergência de até 62%.

HOUSE (1978) foi o primeiro autor a descrever o desenvolvimento de um parasitóide, desde a oviposição até a emergência dos adultos, em condições artificiais. A oviposição e desenvolvimento de *I. conquisitor* foi obtida em cápsulas de "parafilm" com 5mm de diâmetro x 25mm de comprimento, contendo 0,2ml da dieta artificial. Utilizou uma dieta merídica, composta por caseína, gelatina, aminoácidos levógiros, sais minerais, glicogênio, lipídeos, vitaminas lipossolúveis, trealose, glicose, solução de vitaminas e ágar.

THOMPSON (1975) apresentou um procedimento asséptico e uma dieta holidica para a criação de *Exeristes roborator* (Fabr.) (Hym.: Ichneumonidae), composta por proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas e sais minerais. Essa dieta proporcionou o desenvolvimento de 30% de adultos, quando oferecida em sua forma líquida. Esse percentual foi sensivelmente melhorado, quando se utilizou gel de Sephadex como substrato para a dieta, fornecendo, assim, uma maior consistência para o meio. Outro procedimento que apresentou sucesso foi a adição de albumina à dieta, que após a esterilização em autoclave por um período de 40 minutos, conferiu consistência semi-sólida ao meio artificial.

THOMPSON (1982) utilizou uma dieta holidica livre de ácidos graxos para determinar o efeito dos níveis de glicose na taxa de crescimento larval de *E. roborator*. A dieta consistiu de 6% de aminoácidos, 0,25% de vitaminas B e fatores lipogênicos de crescimento (como a colina e o inositol), 0,2% de colesterol, 0,5% de sais inorgânicos e níveis de glicose variando de 0 a 8%. Os resultados demonstraram uma relação diretamente proporcional entre os níveis de glicose e a taxa de crescimento de *E. roborator*, variando de 1µg/mg.dia a 50µg/mg.dia, respectivamente, para os níveis de glicose de 0 e 8%.

THOMPSON (1980) formulou, aproximadamente, 100 dietas merídicas para a criação de *Brachymeria intermedia* (Nees) (Hym.: Chalcididae), que variaram nas concentrações de proteína, aminoácidos, carboidratos, ácidos orgânicos, ácidos nucleicos, nucleotídeos, ácidos graxos, esteróis, sais inorgânicos ou vitaminas. A princípio, as dietas artificiais foram preparadas contendo cerca de 6% de proteínas, 2% de carboidratos, 0,5% de sais inorgânicos e 0,25% de vitaminas, sendo utilizados vários agentes gelatinizantes, como gelatina, ágar ou Sephadex® G-50. Para o desenvolvimento desse parasitóide, pequena quantidade da dieta foi colocada em tubos de cultura de tecido, sendo colocado um único indivíduo por tubo. Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se dieta com 2% de ágar ou Sephadex G-50, que demonstrou ser o melhor agente para evitar a

presença de líquido em excesso, eliminando, também, os problemas causados com a precipitação de vários componentes da dieta. As larvas criadas em dieta artificial cresceram lentamente, apresentando um conteúdo de água corpórea extremamente superior às larvas criadas no hospedeiro natural. Apesar do desenvolvimento de pupas morfológicamente normais, não ocorreu a emergência de adultos.

THOMPSON (1981a) definiu as exigências por aminoácidos essenciais para 4 espécies de parasitóides, utilizando técnica de criação descrita por THOMPSON (1980). As exigências para as quatro espécies estudadas, *E. roborator*, *B. lasus* (Walker), *B. ovata* (Say) (Hym.: Chalcididae) e *Pachycrepoideus vindemiae* Rond. (Hym.: Pteromalidae) foram semelhantes, demonstrando a necessidade por arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina.

THOMPSON (1981b) desenvolveu uma dieta artificial, livre de componentes de insetos, composta de 15% de albumina, 1% de aminoácidos, 4% de glicose, 2,5% de lipídeos, 0,3% de sais inorgânicos, 0,01% de vitamina B e 0,2% de fatores lipogênicos de crescimento, para a criação de *B. lasus*. A dieta (0,5ml) foi oferecida em placas de cultura de tecido, com as aberturas das células da placa fechadas com graxa de silicone, para evitar a perda de água do meio artificial. A utilização de albumina permitiu a eliminação dos agentes gelatinizantes anteriormente utilizados, como o ágar ou o Sephadex, que apresentaram certa toxicidade às larvas do parasitóide. Essas alterações resultaram na formação de 80% de pupas, com a emergência de adultos férteis, que chegaram a produzir uma segunda geração de adultos normais.

THOMPSON (1983), utilizando a dieta previamente descrita para *B. lasus* (THOMPSON, 1981b), avaliou a influência de diferentes concentrações de aminoácidos e glicose no desenvolvimento desse parasitóide. O melhor desempenho foi obtido em dieta artificial contendo 1,2 ou 4% de aminoácidos e 2% de glicose. A retirada da glicose ou a omissão de aminoácidos das dietas artificiais ocasionaram, respectivamente, uma redução ou ausência de desenvolvimento desse parasitóide.

DINDO (1990) comparou o desenvolvimento do parasitóide *B. intermedia* em substrato alimentar natural (pupas vivas e mortas de *G. mellonella*) e artificial (homogeneizado pupal de *G. mellonella*). A obtenção de desenvolvimento do parasitóide em pupas mortas do seu hospedeiro, o desenvolvimento de 75% das larvas e a emergência de 1 adulto do parasitóide em meio artificial, demonstraram que as relações fisiológicas entre parasitóide:hospedeiro não foram essenciais ao desenvolvimento de *B. intermedia*.

DINDO & CAMPADELLI (1992) utilizaram quatro dietas oligídicas para a criação de *B. intermedia*, compostas de soro bovino, extrato pupal de *G. mellonella*, trealose, gema-de-ovo, soro bovino liofilizado e/ou homogeneizado de carne bovina, contendo de 1-2% de ágar. Após a coleta de ovos do parasitóide, foram utilizadas placas plásticas de cultura de tecido, contendo 0,4cm³ de dieta. Os melhores resultados foram obtidos com a dieta composta por homogeneizado de carne bovina (80%) e extrato de pupas (20%), ocorrendo a emergência de apenas um indivíduo. As dietas compostas por soro bovino mostraram-se inadequadas ao desenvolvimento do parasitóide.

THOMPSON *et al.* (1983) criaram *P. vindemiae* em dieta holidica composta por soro de albumina bovina, aminoácidos livres, glicose, lipídeos, sais inorgânicos, vitaminas e fatores lipogênicos de crescimento, com osmolaridade próxima a 600 mOs/Kg. Devido à sensibilidade desse parasitóide à osmolaridade do meio, substituiu-se a glicose por trealose e os aminoácidos livres por uma mistura de poli-aminoácidos, que reduziram a participação de moléculas difusíveis, permitindo que a osmolaridade do meio atingisse valores próximos aos da hemolinfa de insetos (400 mOs/Kg). Os adultos obtidos apresentaram longevidade reduzida, não sendo determinada a sua fecundidade.

GREANY (1986) criou os parasitóides *M. croceipes* e *Cotesia marginiventris* (Cresson) (Hym.: Braconidae) em dieta holidica, composta de IPL-52B (meio de cultura utilizado para o desenvolvimento de células de inseto "in vitro"), l-glutamina e gentamicina, resultando em uma dieta com pH próximo a 6,4 e pressão osmótica de 340 mOsm. Os ovos dos parasitóides foram transferidos para a dieta artificial após a formação do embrião, sendo relatado o efeito positivo da adição do soro fetal bovino no crescimento larval de ambas as espécies de parasitóides. A suplementação da dieta com plasma de hemolinfa de hospedeiros, como *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lep.: Noctuidae) e *H. zea*, não exerceu qualquer alteração na taxa de crescimento desses parasitóides.

ROTUNDO *et al.* (1988) obtiveram o crescimento e o desenvolvimento de *L. fabarum*, utilizando um meio artificial, desenvolvido para a cultura de células de *Drosophila* sp. (Dip.: Drosophilidae), suplementado com soro fetal bovino, penicilina e sulfato de gentamicina. Este substrato alimentar proporcionou o desenvolvimento larval até o último instar, ocorrendo a emergência de apenas 2 adultos das 48 larvas iniciais.

STRAND *et al.* (1988) verificaram a influência dos teratócitos e do volume de dieta ingerido por larvas do parasitóide na performance de adultos de *Telenomus heliothidis* Ashmead (Hym.: Scelionidae). Assim, criaram os insetos individualmente,

fornecendo uma dieta modificada daquela de XIE *et al* (1986a), contendo hemolinfa de *M. sexta* (40%), gema-de-ovo (35%), leite integral (23,5%) e trealose (1,5%). A alimentação das larvas foi interrompida 6, 12, 24 e 36 horas após o início do 3º instar larval, sendo, então, retirado o excesso de dieta. Obtiveram uma viabilidade média de 42% para *T. heliothidis* criado em dieta artificial, muito inferior àquela obtida em ovos do hospedeiro natural, *H. virescens*. Os resultados apontaram que, apesar da ausência dos teratócitos não afetar o desenvolvimento larval até o 3º instar, ocorreu uma drástica redução na viabilidade larval e pupal. Observaram, ainda, que períodos de alimentação superiores a 12 horas, após o início do desenvolvimento do 3º instar, reduziram, significativamente, a emergência de adultos.

HOFFMAN *et al.* (1975) utilizaram plasma de hemolinfa de lagartas de 5º instar de *H. zea* para a criação de *T. pretiosum*. A hemolinfa foi oferecida em discos de papel de filtro (6mm de diâmetro) esterilizados, resultando no completo desenvolvimento do inseto, ocorrendo, no entanto, um alongamento de 30% e 15% dos períodos larval e pupal, respectivamente. Estes autores ainda demonstraram a grande redução nas taxas de pupação e emergência de *T. pretiosum*, quando as larvas do parasitóide foram mantidas em contato com o excesso de dieta, por um período superior à 96 horas. A retirada do excesso de dieta, após um período de 24 horas, resultou em valores semelhantes aos encontrados quando *T. pretiosum* foi mantido sobre ovos de *Trichoplusia ni* Hübner (Lep.: Noctuidae), com viabilidade larval e pupal de 97% e 85%, respectivamente. Larvas mantidas continuamente na dieta reduziram drasticamente o seu desenvolvimento, atingindo valores de 80% de pupação e 22% de emergência. Dos adultos obtidos nessa condição, 75% apresentaram dificuldades para distenderem as asas, o que, no entanto, não provocou restrições ao acasalamento e parasitismo.

LI (1982), relatando os resultados obtidos na China, descreveu o início das pesquisas para a criação "in vitro" de espécies de *Trichogramma* a partir de 1975, quando utilizaram algumas dietas oligídicas, compostas por gema-de-ovo e hemolinfa larval ou pupal de espécies de bicho-da-seda. Estas dietas, contidas em cápsulas de parafina, induziram a oviposição e permitiram o desenvolvimento até a fase pré-pupal das espécies *T. japonicum*, *T. dendrolimi*, *T. confusum*, *T. evanescens*, *T. pretiosum* e *T. cacoeciae*. No entanto, as criações "in vitro" realizadas a partir de 1978, permitiram o crescimento e desenvolvimento de *T. dendrolimi*, *T. confusum* e *T. pretiosum* em um meio oligídico, composto por hemolinfa pupal de *Antheraea pernyi* (Guérin-Mèneville) (Lep.: Saturniidae), gema-de-ovo, leite, extrato de embrião de galinha e solução salina de

Neisenheimer. Entretanto, até o ano de 1982, com o desenvolvimento das técnicas de criação, foi reduzida a participação de hemolinfa nas dietas artificiais de 27-50% para apenas 13,6%, obtendo-se índices de 40% de pupação e 8,7% de emergência. Os resultados sempre se apresentaram instáveis, mesmo quando da utilização de elevadas concentrações de hemolinfa, com os adultos apresentando abdome volumoso e asas deformadas.

GAO *et al.* (1982) relataram a criação de *T. dendrolimi* por 35 gerações consecutivas, utilizando dieta artificial descrita por LI (1982).

STRAND & VINSON (1985) obtiveram uma dieta merídica para a criação de *T. pretiosum*, composta por aminoácidos livres, soro de albumina bovina, lipídeos, carboidratos, sais inorgânicos, vitaminas, metabólitos como ácido málico, ácido alfa-cetoglutarico, ácido succínico e ácido fumárico, com concentrações variáveis de hemolinfa de *M. sexta*. Os resultados mostraram forte relação entre a pupação e emergência de *T. pretiosum*, com a concentração de hemolinfa incorporada à dieta. Valores de pupação de 92-94% e emergência de 75%, em dieta contendo 30-40% de hemolinfa, foram drasticamente reduzidos para 4% e 0,05%, respectivamente, quando se utilizou apenas 10% de hemolinfa. Estes autores ainda descreveram uma relação inversamente proporcional entre os valores obtidos para pupação e emergência com o período de alimentação larval, sendo encontrados valores de 92% e 70%, respectivamente, para a viabilidade larval e pupal, com um período de alimentação de 24 horas. Estes valores sofreram acentuada redução quando as larvas permaneceram em contato com a dieta por até 48 horas, apresentando 37% de viabilidade larval e apenas 3% de viabilidade pupal.

XIE *et al.* (1986a), desenvolvendo técnicas que permitissem a criação "in vitro" de *T. pretiosum* em grandes quantidades, utilizaram dieta oligídica composta por hemolinfa larval de *M. sexta* (50%), gema-de-ovo (25%), solução de leite em pó (25%) e gentamicina (0,15%). Os ovos do parasitóide foram transferidos para placas de cultura de tecido (com 96 células de 6,4mm de diâmetro), contendo de 7,5-10µl de dieta, e placas de Petri de 5cm de diâmetro, contendo gotas de 15µl ou 1,2ml da dieta. Cada recipiente comportou, em média, 60, 90 e 4.000 larvas de *T. pretiosum*, respectivamente. Todos os métodos forneceram elevados valores de pupação (acima de 70%), sendo que a maior emergência (6,5%) foi obtida em placas de cultura de tecido.

XIE *et al.* (1986b) adicionaram extrato purificado de ovos de *M. sexta* a uma dieta oligídica, composta de hemolinfa de larvas de *M. sexta*, gema-de-ovo,

suspensão de leite em pó e sulfato de gentamicina, verificando valores de emergência superiores em cerca de 7 a 13 vezes aos encontrados em dieta artificial comum. Demonstraram, ainda, que a solução de sais desenvolvida por NETTLES *et al.* (1982), como estimulante para a oviposição de *T. pretiosum*, apresentou forte toxicidade quando em contato com ovos do parasitóide, por períodos superiores a 6 horas.

LI *et al.* (1988) criaram *T. dendrolimi*, *T. confusum*, *T. nubilale*, *T. chilostraca*, *T. japonicum* e *Anastatus* sp. em películas plásticas de polietileno ou polipropileno, contendo de 33-52 cápsulas semi-esféricas, preenchidas por dieta artificial, composta por hemolinfa pupal de *A. pernyi* ou *Philosamia cynthia ricini* (Drury) (Lep.: Saturniidae), gema-de-ovo, malte e solução salina de Neisenheimer. Este foi o primeiro relato em que se obteve, com sucesso, a postura, o desenvolvimento larval e pupal e a emergência dos parasitóides em um único substrato.

DAI *et al.* (1988) utilizaram uma dieta oligídica, contendo holotécidos pupais de *A. pernyi*, gema-de-ovo, solução de leite desnatado e água destilada, para a obtenção do crescimento e desenvolvimento de *T. dendrolimi* em uma película plástica, especificamente confeccionada para a obtenção de "ovos" artificiais. Os adultos obtidos por este método de produção foram utilizados em liberações inundativas para o controle de várias pragas, em diversas províncias da China.

GRENIER & BONNOT (1988) avaliaram duas dietas para o desenvolvimento de *T. dendrolimi* e *T. maidis*. Uma dieta oligídica, composta por hemolinfa de lagartas de *Bombyx mori* L. (Lep.: Bombycidae) ou *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lep.: Noctuidae), leite semi-desnatado, gema-de-ovo e solução salina de Neisenheimer, e uma dieta merídica, composta por ácidos orgânicos, carboidratos, sais minerais, vitaminas, aminoácidos livres, ATP, ácido ribonucleico, ácido fosfórico, colesterol e soro de albumina bovina. Encontraram desenvolvimento de 33,3% de adultos para *T. dendrolimi* e 16,7% para *T. maidis* em dieta oligídica. A dieta merídica forneceu o desenvolvimento de pupas de *T. maidis* somente se suplementada com gema-de-ovo e hemolinfa.

QIN & WU (1988) estudaram as exigências nutricionais de *T. dendrolimi* utilizando uma dieta artificial composta pela associação de um meio holidico a um meio oligídico. O meio holidico foi composto de aminoácidos livres, carboidratos, vitaminas, sais inorgânicos e orgânicos, e o meio oligídico, composto de gema-de-ovo, extrato de embrião de galinha, soro fetal bovino, germe-de-trigo, extrato de levedura, peptona e leite. A viabilidade larval variou de 36 a 53%, com taxas de emergência de 8-16%. Demonstraram que os componentes gema-de-ovo e meio holidico foram indispensáveis

para o sucesso no desenvolvimento desse parasitóide em dietas artificiais, sem componentes de insetos.

LI (1989) descreveu duas dietas artificiais, a primeira desenvolvida pelo Instituto de Entomologia de Guangdong, composta por plasma de hemolinfa de pupas de *A. pernyi*, gema-de-ovo, solução de malte, solução salina de Neisenheimer, penicilina e estreptomicina, sendo a segunda, desenvolvida pela Universidade de Wuhan, contendo holotécidos pupais de *A. pernyi*, gema-de-ovo, solução de leite desnatado, água destilada, penicilina e canamicina. Ambas as dietas proporcionaram o desenvolvimento de 60% de pupas e adultos normais. Com este procedimento, foram criadas várias espécies de *Trichogramma*, como *T. dendrolimi*, *T. closterae*, *T. cordubensis*, *T. confusum*, *T. embryophagum*, *T. cacoeciae*, *T. pretiosum*, *T. evanescens*, *T. ostrinae*, *T. maidis*, *T. nubilale*, *T. chilotraea*, *T. nagarkatti*, *T. trjapitzini* e *T. japonicum*. No entanto, somente as espécies *T. dendrolimi* e *T. confusum* são criadas massalmente e utilizadas em programas de controle biológico através desta técnica de produção.

ZHONG & ZHANG (1989) verificaram o efeito do pH no desenvolvimento e crescimento de *T. confusum* em meio artificial. Utilizaram dieta composta de holotécidos pupais de *A. pernyi* (30%), gema-de-ovo (30%), solução de leite em pó (10%) e água destilada (30%). Os resultados obtidos em dieta com pH ajustado para 6,70-6,95 foram 30% superiores aos relatados em dieta com pH de 6,40. Relataram 89-92% de parasitismo dos ovos artificiais, com uma taxa de pupação de 79-80%.

ZHONG & ZHANG (1992) descreveram a necessidade de partículas de tecido de insetos na dieta artificial de *T. dendrolimi*. Relataram que a presença de 1,4% desse material em dieta artificial, baseada em tecidos pupais de *A. pernyi* foi indispensável à obtenção de índices de desenvolvimento satisfatórios. Descreveram taxas de pupação (70,9%) e emergência (15,5%) superiores àquelas relatadas em dietas sem a presença desses tecidos. Demonstraram que a coleta de hemolinfa de *A. pernyi* para o desenvolvimento da dieta artificial utilizando um processo de centrifugação (800rpm por 5 minutos) e subsequente utilização de filtros, permitiu a remoção de 65% dessas partículas, permanecendo a quantidade ideal para ser utilizada na criação de *T. dendrolimi*.

BATTISTI *et al.* (1996) criaram *O. pityocampae* até o estágio de pré-pupa, utilizando várias dietas sintéticas, como homogeneizado pupal, gema-de-ovo e dieta artificial desenvolvida para o ácaro *Pyemotes tritici* (Lagreze-Fossat & Montane) (Acari: Pyemotidae) (BRUCE, 1989).

MASUTTI *et al.* (1992) desenvolveram uma dieta oligídica, composta por gema-de-ovo, hidrolisado de caseína, hidrolisado de levedura, trealose, solução de ácido ribonucleico, sais de Wesson, mistura vitamínica de Vanderzant, colesterol e anti-contaminantes que, mesmo sendo livre de componentes de insetos, permitiu o desenvolvimento de *O. pityocampae* até o último estágio larval. Apesar da acentuada mortalidade do 3º instar larval por problemas de trocas gasosas, devido ao excesso de dieta em contato com as larvas, foi obtida a emergência de dois adultos, que ovipositaram tanto em ovos do hospedeiro natural, como em ovos artificiais.

GUERRA (1992) realizou modificações na dieta apresentada por XIE *et al.* (1986a), testando hemolinfa proveniente de outros insetos, como larvas de *G. mellonella* e *A. pernyi*, pupas de *M. sexta*, larvas e pupas de *Anthonomus grandis* Boheman (Col.: Curculionidae) e fluido de ovos de *M. sexta* para a criação de *Bracon mellitor* Say (Hym.: Braconidae) e *Catolaccus grandis* (Burks) (Hym.: Pteromalidae). Os resultados demonstraram que esses parasitóides podem ser criados com sucesso em dietas artificiais, apresentando, no entanto, valores médios de pupação (40%) e emergência (30%) inferiores aos obtidos em hospedeiro natural. Os adultos obtidos mostraram-se aptos ao acasalamento e reprodução, com fecundidade e fertilidade semelhantes aos dos insetos criados "in vivo".

VOLKOFF *et al.* (1992) desenvolveram um meio básico composto por hemolinfa de *M. sexta* (50%), leite bovino (25%) e gema-de-ovo (25%), para a criação de *Trissolcus basalis* (Woll.) (Hym.: Scelionidae), que foi posteriormente modificado, alterando-se as proporções desses componentes, ou mesmo, adicionando-se soluções salinas, aminoácidos livres, líquido de ovos de *Nezara viridula* (L.) (Hemip.: Pentatomidae) e meio de cultura de Grace. A utilização do meio básico permitiu a eclosão de apenas 13% das larvas de *T. basalis* ocorrendo mortalidade larval de 100%. Testes com as demais dietas indicaram que a gema-de-ovo promoveu a embriogênese do parasitóide e que a eliminação do leite resultou em 1% dos parasitóides alcançando o último instar larval. Os melhores resultados foram obtidos com a utilização de dieta artificial composta por hemolinfa (25%), gema-de-ovo (50%) e solução salina (25%), que permitiu o desenvolvimento de *T. basalis* até a fase de pupa, quando o sistema "in vitro" foi iniciado com larvas de 2º instar.

2.5 Utilização de anticontaminantes

SINGH & HOUSE (1970) determinaram a toxicidade de 21 anticontaminantes ao desenvolvimento de *A. affinis* em dieta artificial. Classificaram os anticontaminantes em 4 níveis, sendo divididos em: **nível seguro**, **inibidor primário**, **inibidor secundário** e **nível tóxico**. Os efeitos encontrados foram dependentes das concentrações utilizadas, promovendo o alongamento ou inibição do desenvolvimento larval e/ou aumento da mortalidade larval e pupal.

GRENIER (1977) verificou a toxicidade do nipagin M (metil para-idroxibenzoato) a larvas e adultos de *P. caudata*. Nas concentrações de 0,01 e 0,04%, o tempo letal médio para larvas desse parasitóide foi da ordem de 41 e 41,3 horas, respectivamente. A toxicidade para o estágio adulto foi dependente do sexo, sendo as fêmeas mais sensíveis. Quando adicionada à dieta dos adultos, a concentração de 0,1% de nipagin apresentou, em média, um TL₅₀ variando de 6,5 a 13,6 dias. O autor sugeriu que devido ao fato de nipagin M não controlar eficazmente o desenvolvimento de fungos, torna-se inviável a sua utilização em dietas artificiais para *P. caudata*.

GRENIER & LIU (1990) avaliaram a toxicidade de inúmeros agentes fungitásticos e bactericidas a larvas de *T. dendrolimi*, criadas em dieta artificial composta por hemolinfa, leite semi-desnatado, gema-de-ovo, água destilada e solução salina de Neisenheimer, seguindo técnica previamente estabelecida por LI *et al.* (1988). Dos vários químicos avaliados, destacaram-se a geneticina, anfotericina-B e o nistatin, que utilizados em dosagens corretas, forneceram excelente controle dos agentes contaminantes, sem alterarem o desenvolvimento do parasitóide.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Criação dos insetos hospedeiros

3.1.1 Criação de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850)

Foram obtidas pupas da criação estoque de *H. zea* do Departamento de Entomologia, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP, que foram separadas por sexo (BUTT & CANTU, 1962) e colocadas em número de 10 casais em gaiolas de 40cm de altura e 20cm de diâmetro, constituídas por uma armação metálica, revestida por tecido tipo "organdi". Após a emergência, os adultos foram alimentados com solução aquosa de mel a 10%, fornecida por capilaridade, através de um pavio de algodão (rolo dental Johnson's®) embebido na solução.

Esses adultos permaneceram nestas gaiolas por um período de 48 horas, para que ocorresse a cópula, sendo, posteriormente, transferidos para gaiolas menores (tubos de PVC com 10cm de diâmetro e 22 cm de altura). Os insetos realizaram a postura na tela de tecido tipo "filó", que cobria a porção superior das gaiolas de PVC.

Os ovos coletados foram submetidos à esterilização superficial, com uma solução de formaldeído a 10%, por um período de 5 minutos. Após esse tratamento, os ovos foram colocados em placas de Petri e transferidos para câmaras climatizadas tipo BOD, reguladas à temperatura de $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas, para o desenvolvimento embrionário.

Para a criação das lagartas foram utilizados tubos de vidro de 2,5cm de diâmetro por 8,5cm de comprimento, contendo dieta à base de feijão, germe-de-trigo e levedura de cerveja (BURTON, 1969) (Apêndice 1). Previamente à colocação da dieta artificial, os tubos utilizados na criação desses insetos foram tampados com algodão hidrófugo e esterilizados em estufa (150°C), por um período de 1 hora. A "inoculação" das lagartas recém-eclodidas foi realizada após 24 horas do preparo e colocação da dieta nos tubos de criação. Todo esse procedimento foi conduzido em câmara de fluxo laminar, para se evitar a contaminação do meio artificial.

Os tubos de criação foram mantidos em suportes de madeira, com a extremidade superior voltada para baixo, para se evitar problemas com contaminações por fungos (PARRA, 1988).

3.1.2 Criação de *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818

Através de pupas obtidas da criação estoque do Laboratório de Biologia dos Insetos, do Departamento de Entomologia - ESALQ/USP, foram transferidos vários adultos, na proporção de 1macho:1fêmea, para gaiolas de acrílico (34cm x 34cm x 45cm), para a realização da cópula e posterior oviposição.

A oviposição foi realizada em folhas de papel sulfite, que revestiam internamente as gaiolas de acrílico. Os adultos foram alimentados com uma dieta composta de 75% de solução de 10ml de mel, 1g de ácido ascórbico, 1g de metil parahidroxibenzoato (nipagin) e 80g de sacarose diluídos em 100ml de água destilada, e 25% de cerveja (CAMPO *et al.*, 1985). Os ovos foram obtidos retirando-se as folhas de papel sulfite do interior das gaiolas de oviposição, que após serem recortadas em pedaços menores, foram tratadas superficialmente com uma solução de formaldeído a 10%, por um período de 5 minutos. Esses recortes, contendo os ovos, foram transferidos para placas de Petri, com papel de filtro umedecido, e colocadas em temperatura controlada ($25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$) até a eclosão das lagartas.

O procedimento de criação de lagartas adotado para *A. gemmatalis* foi semelhante ao utilizado para *H. zea* (item 3.1.1), sendo, no entanto, utilizada dieta artificial à base de feijão, germe-de-trigo, caseína e levedura de cerveja (GREENE *et al.*, 1978) (Apêndice 2).

3.1.3 Criação de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794)

Foram obtidas pupas de *D. saccharalis* no Laboratório de Biologia dos Insetos, do Departamento de Entomologia, ESALQ/USP, e colocadas em recipientes adequados para a emergência dos adultos. Após a emergência, os adultos foram colocados em gaiolas de PVC, idênticas às descritas no item 3.1.1, na proporção de

1,5macho:1fêmea. Para a alimentação dos adultos foi utilizada solução aquosa de mel a 10%, oferecida por capilaridade através de um pavio de algodão (rolo dental Johnson's®).

As gaiolas foram revestidas internamente por folhas de papel sulfite, umedecidas diariamente, para a coleta de ovos de *D. saccharalis*. As folhas de papel sulfite, contendo as posturas de *D. saccharalis* foram recortadas e tratadas com solução de formaldeído 0,2%, água destilada e solução de sulfato de cobre 1%, por períodos consecutivos de 2 minutos (MACEDO *et al.*, 1983). Os recortes de papel sulfite, com as posturas de *D. saccharalis* foram colocados em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido na parte inferior, e armazenados à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $80 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. Após a eclosão, foram transferidas de 5 a 8 lagartas por tubo de criação, contendo dieta referida por MACEDO *et al.* (1983), à base de farelo de soja e germe de trigo (Apêndice 3).

Todo o procedimento adotado para o preparo e "inoculação" da dieta foram previamente descritos no item 3.1.1.

3.1.4. Criação de *Bombyx mori* L., 1758

As lagartas e pupas de *B. mori* utilizadas neste estudo foram cedidas pelo Laboratório de Insetos Oteis, do Departamento de Entomologia - ESALQ/USP, sendo este inseto criado em folhas de híbridos de amoreira.

3.2 Manutenção de populações de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 e *T. pretiosum* Riley, 1879

Para a manutenção de populações das duas espécies de parasitóides foram utilizados ovos do hospedeiro alternativo *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879), produzido pelo Laboratório de Biologia dos Insetos, do Departamento de Entomologia, da ESALQ/USP, utilizando técnica desenvolvida por PARRA *et al.* (1989).

Os ovos de *A. kuehniella* foram oferecidos aos parasitóides aderidos em cartolina azul, com o auxílio de uma solução aquosa de goma arábica. Esses ovos foram previamente inviabilizados, pela exposição à lâmpada germicida, por um período de 45 minutos (STEIN & PARRA, 1987).

Estes cartões foram oferecidos aos parasitóides na proporção de fêmea:10 ovos do hospedeiro, por um período de 24 horas. Após o parasitismo, os cartões, com os ovos parasitados, foram armazenados em câmaras climatizadas (temperatura: $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa: $80\pm 10\%$; fotofase: 14 horas) para o desenvolvimento de *T. galloi* e *T. pretiosum*.

3.3 Coleta dos componentes de insetos utilizados nas dietas artificiais

3.3.1 Coleta da hemolinfa

Foram coletadas hemolinfas de lagartas de 5^o instar de *H. zea* e *B. mori*. As lagartas foram submetidas ao tratamento térmico ($60-62^{\circ}\text{C}$), por um período de 12-15 minutos, para a inativação das fenoloxidasas, evitando-se assim, a melanização da hemolinfa coletada (SHAPIRO & IGNOFFO, 1973). Após o tratamento térmico, as lagartas foram esterilizadas externamente com uma solução de hipoclorito de sódio a 2% por 10 minutos.

Essas lagartas foram transferidas para capela de fluxo laminar, sendo a hemolinfa coletada com o auxílio de uma seringa de 5 ml esterilizada, recolhendo-se o líquido extravasado pelo corte de um par de falsas pernas. Essa hemolinfa foi colocada em tubos plásticos de cultura de tecido e armazenada à temperatura de -18°C .

3.3.2 Coleta de holotécidos pupais

Foram extraídos holotécidos de pupas de *B. mori*, *A. gemmatilis* e *D. saccharalis*. O processo envolveu a inativação térmica das fenoloxidasas, sendo, posteriormente, realizada a esterilização externa com solução de hipoclorito de sódio a 2% por 10 minutos.

Após a esterilização superficial, as pupas foram maceradas, sendo o homogeneizado obtido centrifugado a 2.500 rpm por 5 minutos, para a eliminação das partículas de tecido dos insetos. O líquido sobrenadante foi coletado e armazenado a -18°C . Para que fossem reduzidas as possíveis fontes de contaminação, os holotécidos pupais foram filtrados em Millipore (1.2μ).

3.4 Criação de *T. galloi* e *T. pretiosum* "in vitro"

3.4.1 Desenvolvimento da dieta artificial

3.4.1.1 Avaliação da necessidade da solução de leite em pó como componente das dietas artificiais

Em uma primeira etapa de testes para o desenvolvimento de uma dieta oligídica para o crescimento e desenvolvimento de *T. galloi* e *T. pretiosum*, foi avaliada a necessidade da utilização de soluções de leite em pó, como um componente da dieta artificial para a criação "in vitro" desses parasitóides. Assim, comparou-se a dieta descrita por CONSOLI *et al.* (1993), composta por hemolinfa de lagartas de último instar de *H. zea* (40%), gema-de-ovo (30%), soro fetal bovino (20%), suspensão aquosa de leite em pó (1,0g/10ml de água destilada)(10%) e estreptomicina (0,02%) (dieta 1), com outra dieta, em que a participação do leite em pó foi omitida, com a seguinte composição: hemolinfa de *H. zea* (40%), gema-de-ovo (40%), soro fetal bovino (20%) e estreptomicina (0,2%) (dieta 2).

3.4.1.2 Determinação da proporção ideal dos componentes da dieta artificial

Após este teste preliminar, foram avaliadas diversas dietas, que diferiram na concentração de seus componentes, tomando-se como base as dietas anteriormente avaliadas (Tabela 1).

As dietas foram preparadas em condições assépticas e transferidas (5µl) para lâminas escavadas. Essas lâminas foram colocadas no interior de placas de Petri, contendo uma solução de ágar:água na porção inferior das placas, que serviu para manter a umidade do ambiente, evitando o ressecamento da dieta (Figura 1).

Para a coleta dos ovos de *T. galloi* e *T. pretiosum*, foram utilizados ovos de *H. zea* ou *H. virescens* oferecidos às fêmeas dos parasitóides em condições de superparasitismo (10-20 fêmeas do parasitóide:1 ovo do hospedeiro, por 4 a 6 horas), o que permitiu a coleta de vários ovos do parasitóide (Figura 1).

Após o parasitismo, os ovos dos hospedeiros foram esterilizados superficialmente, utilizando-se uma solução de hipoclorito de sódio (2%) por 5 minutos. Posteriormente à esterilização, os ovos dos hospedeiros (3-5) foram transferidos para as

lâminas escavadas, tendo o córion rompido com o auxílio de um estilete, para que ovos do parasitóide, contidos no seu interior, pudessem entrar em contato com a dieta artificial (Figura 1).

Tabela 1. Composição das dietas artificiais utilizadas na criação "in vitro" de *T. galloi* e *T. pretiosum*.

Componentes	D1 ¹	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8 ²
Hemolinfa	40%	40%	20%	20%	40%	70%	100%	70%
Gema-de-ovo	30%	40%	70%	70%	40%	20%	*	20%
Leite em pó	10%	*	*	*	*	*	*	*
Soro fetal	20%	20%	10%	10%	10%	10%	*	5%
Homogeneizado de ovos ³	*	*	*	*	10%	*	*	5%
Tween 80	*	*	*	0,1%	*	*	*	*
Estreptomicina	0,02%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%

1. Utilizada somente na fase preliminar deste trabalho.

2. Avaliada apenas para *T. pretiosum*.

3. Homogeneizado centrifugado (2.500rpm por 3 minutos) de ovos de *H. virescens*.

Realizada esta etapa, as placas de Petri foram embrulhadas com filme de polietileno e transferidas para câmaras climatizadas, reguladas à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $80 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

Foram realizadas observações diárias, acompanhando-se o desenvolvimento de todas as fases de desenvolvimento dos parasitóides, sendo as placas manuseadas apenas 48 horas após o início do experimento, quando foi retirado o excesso de dieta, que permanecia em contato com as larvas, com o auxílio de capilares. Todo o procedimento de manuseio e preparo das dietas foi realizado em capela de fluxo laminar, sendo todo o instrumental esterilizado em autoclave (120°C por

Figura 1. Ilustração da colocação dos ovos do parasitóide na dieta artificial. A - ovo do hospedeiro superparasitado; B - liberação dos ovos do parasitóide do interior do ovo do hospedeiro; C - colocação da dieta artificial ; D - lâmina escavada no interior da placa de Petri.

20 minutos), com exceção das placas de Petri, que foram esterilizadas em estufa à temperatura de 180°C por 4 horas.

Para a determinação da melhor dieta a ser utilizada na criação "in vitro" de *T. galloi* e *T. pretiosum*, foram avaliados os parâmetros:

- duração do período ovo-adulto;
- viabilidade larval;
- % de pupas normais;
- viabilidade pupal;
- % de adultos normais;

3.4.1.3 Determinação do volume ideal de dieta

Foram realizados testes com *T. galloi* para se verificar o volume ideal de dieta a ser utilizado nos recipientes de criação "in vitro" dos parasitóides.

Estes testes foram realizados com base nos dados obtidos no item anterior, utilizando-se lâminas de vidro escavadas como substrato para o acondicionamento da dieta, seguindo método previamente descrito (item 3.4.1.2) para o preparo de dietas artificiais para a criação "in vitro" de *Trichogramma*.

Após a obtenção e colocação dos ovos do parasitóide (item 3.4.1.2) sobre as lâminas escavadas, foram adicionados, utilizando-se micropipetas de 1µl e 5µl, volumes de 1µl, 2µl, 3µl, 4µl ou 5µl de dieta artificial para cada tratamento.

Os parâmetros avaliados foram os mesmos observados em 3.4.1.2.

3.4.1.4 Efeito de substratos para a colocação das dietas

Foram avaliados dois substratos para o acondicionamento das dietas artificiais para o desenvolvimento de *T. galloi* e *T. pretiosum*. Utilizando-se as dietas estabelecidas no item 3.4.1.2 para cada parasitóide, avaliou-se o desenvolvimento de ambas as espécies, utilizando-se lâminas de vidro escavadas e placas de poliestireno.

As placas de poliestireno, normalmente utilizadas para cultura de tecidos e testes de ELISA, contêm 96 orifícios circulares com fundo em forma de U, com 1,1cm de profundidade e 0,7cm de diâmetro.

Todo o procedimento de preparo e condução dos experimentos foi semelhante àquele descrito no item 3.4.1.2. Entretanto, para a manutenção da umidade dentro das placas de poliestireno, foi utilizada água destilada esterilizada, nos orifícios que não receberam dieta artificial.

3.4.1.5 Efeito dos diversos componentes de insetos no desenvolvimento das dietas artificiais

Com os resultados obtidos no item 3.4.1.2, foram formuladas diferentes dietas, utilizando-se hemolinhas de lagartas (*H. zea* e *B. mori*) e holotécidos pupais (*A. gemmatilis*, *B. mori* e *D. saccharalis*), como fonte nutricional para o desenvolvimento "in vitro" de *T. galloi* e *T. pretiosum*. Essas dietas mantiveram as proporções ideais de cada componente, determinada no item 3.4.1.2, para cada uma das espécies.

Para a determinação da melhor dieta artificial para o desenvolvimento "in vitro" desses parasitóides, foram observados os mesmos parâmetros estudados no item 3.4.1.2.

3.5 Desempenho dos insetos produzidos "in vitro" x "in vivo"

Os insetos produzidos em dieta artificial foram comparados aos insetos criados no hospedeiro alternativo e nos seus hospedeiros naturais, para se avaliar a qualidade do inseto produzido "in vitro". As avaliações foram realizadas utilizando-se parâmetros morfológicos, biológicos e comportamentais. Assim, foram avaliados:

- comprimento da tibia posterior (baseando-se em BIGLER *et al.*, 1987);
- comprimento e largura da cápsula genital;
- deformações do aparelho reprodutor;
- deformações dos adultos;
- duração do período ovo-adulto;
- capacidade de parasitismo;
- longevidade de adultos;
- preferência hospedeira.

Estas comparações foram realizadas para as duas espécies de parasitóides, exceto a avaliação da preferência hospedeira, realizada apenas para *T. galloi*.

3.5.1 Avaliações morfológicas

Para a realização das medições da tíbia e cápsula genital de fêmeas desses parasitóides (Figura 2), exemplares recém-emergidos foram colocados em álcool 70%, transferidos para ácido acético glacial, por um período mínimo de 48 horas, para uma melhor clarificação do material. Posteriormente, os exemplares foram transferidos, em posição ventral, para lâminas de vidro e montados em solução de Hoyer's (ZUCCHI, 1985).

As medidas foram efetuadas utilizando-se uma ocular graduada acoplada a um microscópio biológico (400X). Com base nessas medições foi calculada a relação entre o comprimento da tíbia e o comprimento da cápsula genital (CT/CCG). Essa relação foi calculada para verificar se os parasitóides criados "in vitro" apresentavam o abdome proporcional em relação ao tamanho do corpo.

A determinação de deformações do aparelho reprodutor de fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum*, produzidas em dieta artificial, em ovos dos hospedeiros naturais e no hospedeiro alternativo, foi realizada através da dissecação de fêmeas recém-emergidas de ambas as espécies de parasitóides. Para a dissecação dos insetos, fêmeas conservadas em álcool 70% foram colocadas, em posição ventral, em gotículas de cola branca, sobre a superfície de lâminas de vidro. A seguir, adicionava-se pequena quantidade de glicerina e, com o auxílio de micro-alfinetes, retirava-se a cápsula genital do inseto, permitindo, dessa forma, que o aparelho reprodutor da fêmea fosse extrovertido do abdome. Após a dissecação, em microscópio estereoscópio (80X), as lâminas foram montadas em glicerina e levadas ao microscópio biológico (400X), para observações detalhadas.

Para a determinação das deformações dos adultos, foi coletada uma amostra dos insetos recém-emergidos. Esses adultos foram colocados em álcool 70%, transferidos posteriormente para ácido acético glacial por um período de 48-72 horas. Após a clarificação do material em ácido acético, os exemplares foram transferidos para lâminas de vidro e montados em solução de Hoyer's. Todas as observações foram conduzidas em microscópio biológico, utilizando aumento de 400X ou imersão.

Figura 2. Representação das medições da cápsula genital (A) e tíbia posterior (B) de fêmeas de *T. galloei* e *T. pretiosum*, criadas "in vivo" e "in vitro". (CCG e LCG= comprimento e largura da cápsula genital, respectivamente; CT= comprimento da tíbia).

3.5.2 Avaliações biológicas

A capacidade de parasitismo foi avaliada utilizando-se fêmeas recém-emergidas dos parasitóides, individualizadas em tubos de vidro (8,5 x 2,5cm), e alimentadas com gotículas de mel puro, colocadas na lateral dos tubos.

Para a avaliação da capacidade de parasitismo de ovos de *D. saccharalis* por *T. galloei* criado em dieta artificial, hospedeiro natural e hospedeiro alternativo, foram oferecidos, diariamente, cerca de 75 ovos de *D. saccharalis* (LOPES, 1988), com um

período máximo de desenvolvimento embrionário de 48 horas. O parasitismo de ovos de *A. kuehniella* por *T. galloi*, criado nas diferentes condições, foi avaliado oferecendo-se, diariamente, cerca de 75-100 ovos de *A. kuehniella* aderidos a uma cartolina, com auxílio de goma arábica diluída, e previamente inviabilizados pela exposição à lâmpada germicida (BLEICHER & PARRA, 1990).

O método utilizado para *T. pretiosum* foi semelhante ao empregado para *T. galloi*, sendo, no entanto, oferecidos, diariamente, cerca de 40-50 ovos de *H. virescens* para se avaliar o parasitismo em ovos do hospedeiro natural. Em relação ao parasitismo de ovos de *A. kuehniella*, o método empregado foi idêntico ao descrito anteriormente para *T. galloi*.

Com os dados de longevidade obtidos para as fêmeas destes parasitóides, foi possível estimar a longevidade média e a curva de sobrevivência de *T. galloi* e *T. pretiosum*, utilizando-se o modelo de distribuição de Weibull (SGRILLO, 1982).

3.5.3 Preferência hospedeira de *T. galloi*

Para o estudo da preferência de parasitismo de *T. galloi* em testes de livre escolha, foram utilizados adultos recém-emergidos, obtidos de ovos de *D. saccharalis*, *A. kuehniella* e da criação em dieta artificial. Para a condução dos experimentos foram individualizadas 25 fêmeas, por tratamento, em tubos de vidro (8,5 x 2,5cm), alimentadas com mel puro.

Para os testes de livre escolha foram utilizados ovos com 24-48 horas de idade de *D. saccharalis* e *A. kuehniella*. Os ovos de *A. kuehniella* foram inviabilizados em lâmpada germicida, para se evitar que lagartas eclodidas dos ovos não parasitados exercessem o canibalismo.

Os ovos dos hospedeiros foram colados, de forma equidistante, em um cartão (7,0 x 0,8cm) com goma arábica diluída, e oferecidos às fêmeas por um período de 24 horas. Para cada fêmea foram oferecidos cerca de 80-90 ovos de *D. saccharalis* (2 a 3 posturas grandes) e 100-120 ovos de *A. kuehniella*. Os experimentos foram conduzidos em câmara climatizada com temperatura constante de $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

Após o período de parasitismo, os cartões foram retirados dos tubos de vidro e transferidos para recipientes contendo tiras de papel de filtro umedecidas com

água destilada, para se evitar o ressecamento dos ovos de *D. saccharalis*. A avaliação do parasitismo foi realizada 4 dias após do início do experimento, quando do escurecimento dos ovos parasitados, típico do desenvolvimento deste inseto.

Para a comparação dos resultados de preferência hospedeira foram utilizados dois fatores de correção, visto que o número de insetos que se desenvolvem em ovos de *D. saccharalis* é superior àquele de *A. kuehniella*. Estes fatores levaram em consideração o número médio de pupas do parasitóide que se desenvolveu por ovo do hospedeiro, obtido através da dissecação de uma amostra dos ovos parasitados (30 ovos de cada hospedeiro). Portanto, foi calculado um fator para os ovos de *D. saccharalis* e outro, para os ovos de *A. kuehniella*, correspondendo, respectivamente, a 1,98 e 1,14. Assim, as comparações foram realizadas baseando-se no número total de parasitóides produzidos por espécie.

3.6 Análise de aminoácidos

A composição de aminoácidos do material utilizado para o preparo das dietas artificiais, especialmente os componentes de insetos e ovos dos hospedeiros, foi determinada utilizando-se um analisador automatizado (ALONZO & HIRS, 1968) para análise de aminoácidos (NICOLAS V), do Centro Interdepartamental de Química de Proteínas, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Assim, foram analisadas a hemolinfa de larvas de *H. zea* e *B. mori* e os holotécidos pupais de *A. gemmatilis*, *B. mori* e *D. saccharalis* além dos ovos dos hospedeiros naturais de *T. galloi*, *D. saccharalis* e de *T. pretiosum*, *Heliothis virescens* (Fabr., 1781), e do hospedeiro alternativo, *A. kuehniella*.

Após a coleta das hemolinfas e dos holotécidos pupais, descrita no item 3.3, os materiais foram centrifugados a 2.500 rpm, por 5 minutos, para a eliminação da porção gordurosa presente nas amostras. Os ovos dos insetos analisados, após a inativação térmica das fenoloxidasas (item 3.3), foram macerados em tubos plásticos de centrifuga e submetidos ao processo de centrifugação anteriormente descrito, para a eliminação dos tecidos celulares e porção gordurosa, sendo retirada apenas a fração líquida da amostra.

As amostras foram colocadas em ampolas de vidro (150 x 25mm) para a realização da hidrólise do material. Para a hidrólise ácida foram adicionados 500µl de

ácido clorídrico 6N a um volume de até 50 μ l da amostra (SPACKMAN *et al.*, 1963). A seguir, as ampolas foram colocadas em gelo seco, até o congelamento das amostras, e submetidas à pressão de vácuo, com o auxílio de uma bomba de vácuo acoplada ao sistema. As ampolas foram então seladas e colocadas a uma temperatura constante de $110^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, por um período de 22 horas.

No entanto, devido à sensibilidade do aminoácido triptofano às soluções ácidas, foi realizado um processo de hidrólise alcalina utilizando hidróxido de lítio 4N (LUCAS & SOTELO, 1980). O procedimento de hidrólise adotado foi praticamente idêntico ao descrito para a hidrólise ácida, sendo que as amostras permaneceram a 110°C por um período de 24 horas. A reação de hidrólise com hidróxido de lítio foi neutralizada com a adição de ácido ortofosfórico 85%.

Após o processo de hidrólise, as amostras foram concentradas, permitindo-se a evaporação dos agentes hidrolíticos utilizados, adicionando-se, em seguida, o tampão diluente de citrato de sódio pH 2,2, com 15% de polietilenoglicol. As amostras, quando necessário, foram submetidas a filtros Millipore (0,45 μ) e armazenadas em geladeira até a sua aplicação.

O equipamento utilizado permite a identificação e quantificação dos diversos aminoácidos presentes. A identificação é baseada na posição de eluição dos aminoácidos, após um processo de cromatografia de troca iônica, que consiste de duas colunas de poliestireno bivinil-benzeno. A separação dos aminoácidos foi obtida utilizando-se tampões com pH diferentes no processo de eluição das amostras. Foram utilizados tampões de citrato de sódio 0,2N com pH 3,25 e pH 4,25 na coluna longa e tampão pH 5,25 a 0,37N para a eluição dos aminoácidos na coluna curta. O sistema foi mantido a uma temperatura constante de 55°C que, no decorrer da análise, foi elevada automaticamente para 75°C , para poder controlar os processos de troca iônica e adsorção. Os tampões foram mantidos em fluxo constante de 36ml/hora.

A detecção dos aminoácidos foi realizada através da reação colorimétrica com a ninidrina (HIRS, 1967), adicionada diretamente ao efluente da coluna a um fluxo constante de 18ml/hora, utilizando um espectrofotômetro com dois filtros, com comprimentos de onda de 570nm e 440nm. O comprimento de onda de 440nm é necessário para se detectar a prolina, que na reação com a ninidrina produz coloração amarela, enquanto os demais aminoácidos produzem coloração azulada. A norleucina e o α -amino β -guanidino foram utilizados como padrão interno, em todas as análises realizadas.

A quantificação foi realizada com base na determinação da área do pico registrado para cada aminoácido, após a reação colorimétrica.

Todas as hidrólises e análises de aminoácidos foram realizadas em duplicata, sendo que, após cada análise efetuada, a resina das colunas era regenerada com hidróxido de sódio 0,2N por 20 minutos e equilibrada, com tampão citrato de sódio pH 5,25 a 0,37N, por 60 minutos.

3.7 Análise de proteínas totais através de eletroforese

Para se verificar a similaridade quanto à presença de proteínas totais entre os diversos componentes utilizados na confecção das dietas artificiais (hemolinfa e holotécidos) e os ovos dos hospedeiros naturais e alternativo de *T. galloi* e *T. pretiosum*, foram realizadas análises eletroforéticas em gel de poliacrilamida.

Cada componente foi coletado conforme descrito no item 3.3, e submetido, novamente, à centrifugação, para a eliminação das partículas de tecido que ainda permaneciam junto à amostra. Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante de cada amostra, que foi diluído em tampão SDS, na proporção de 1:20.

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida a 7%, corrido em tampão tris-glicina, com pH 8,4, utilizando uma corrente elétrica de 1,5mA, por um período de 90 minutos. A revelação do gel de poliacrilamida foi feita com 1% de amido Black 10B em ácido acético glacial. O procedimento de análise eletroforética adotado foi o proposto por BREWER & ASHWORTH (1969).

3.8 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Entretanto, os dados obtidos nas dietas artificiais (duração do período ovo-adulto, viabilidade larval e pupal, porcentagem de pupas e adultos normais) não foram comparados estatisticamente entre si, devido à grande variação apresentada. Para a análise da preferência hospedeira de *T. galloi* foi utilizado o método não-paramétrico, aplicando-se o teste de qui-quadrado.

4. Resultados e Discussão

4.1 Desenvolvimento da dieta artificial

4.1.1 Avaliação da necessidade da solução de leite em pó como componente das dietas artificiais

Os resultados obtidos para *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988, demonstraram que as suspensões de leite em pó não foram necessárias ao seu crescimento e desenvolvimento em dietas artificiais.

T. galloi desenvolveu-se até o 3º instar, em ambas as dietas testadas (Tabela 1), sendo obtido um total de 210 e 333 larvas do parasitóide para as dietas 1 e 2, respectivamente. Estes resultados demonstram a grande variação que ocorre no desenvolvimento destes insetos em dietas artificiais, visto que CONSOLI *et al.* (1993) relataram o desenvolvimento completo de *T. galloi* em dieta similar à utilizada neste trabalho (dieta 1). Estas variações nos resultados de criações "in vitro", de várias espécies de *Trichogramma* foram relatadas por LI (1982), mesmo quando as dietas eram compostas por grandes quantidades de hemolinfa de insetos.

Entretanto, foi evidente o efeito prejudicial do leite como um dos componentes da dieta artificial para *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Tabela 2). A dieta 2 proporcionou um melhor desenvolvimento de pré-pupas e pupas do parasitóide, originando 7,28% de adultos. Resultados semelhantes foram relatados para *Trissolcus basalis* (Woll.), que apresentou melhor desenvolvimento quando da omissão do leite na composição das dietas artificiais (VOLKOFF *et al.*, 1992). No entanto, os adultos de *T. pretiosum* emergidos na dieta 2 apresentaram asas deformadas e abdome excessivamente volumoso. Esses adultos apresentavam dificuldade de movimentação.

Os resultados obtidos para *T. pretiosum*, nessa dieta, foram superiores aos relatados por PARRA & CONSOLI (1992) e XIE *et al.* (1988a), que utilizando dieta semelhante, contendo leite desnatado, obtiveram viabilidade pupal de 3,8% e 3,2%, respectivamente.

Tabela 2. Crescimento e desenvolvimento de *T. pretiosum* criado em dietas artificiais.
Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase 14h.

	DIETA 1*	DIETA 2**
Número de larvas do 3º instar	183	161
Número de pré-pupas	30	161
Viabilidade larval (%)	0	77,02
Viabilidade pupal (%)	**	7,26
Período ovo-adulto (dias)	**	14,00
Longevidade (dias)	**	1,44

*D1= hemolinfa, gema-de-ovo, soro fetal, leite em pó e estreptomicina.

**D2= hemolinfa, gema-de-ovo, soro fetal e estreptomicina.

O período ovo-adulto (14,00 dias) (Tabela 2) foi similar ao encontrado por PARRA & CONSOLI (1992), utilizando dieta artificial, e superior àquele apresentado quando o parasitóide se desenvolveu no hospedeiro alternativo (BLEICHER & PARRA, 1989; SÁ, 1991) ou natural (GOODENOUGH *et al.*, 1983). A longevidade dos adultos obtidos (Tabela 2) foi inferior àquela relatada por BLEICHER & PARRA (1989), criando este parasitóide em ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879), e alimentando-o com mel puro.

A dieta contendo 10% de suspensão de leite permitiu o desenvolvimento de *T. pretiosum* apenas até o final da fase de pré-pupa. Esses resultados contrastam com aqueles apresentados por PARRA & CONSOLI (1992), que obtiveram 3,8% de viabilidade pupal utilizando dieta oligídica composta por hemolinfa de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (40%), gema-de-ovo (40%), suspensão de leite (20%) e estreptomicina (0,02%).

4.1.2 Determinação da proporção ideal dos componentes da dieta artificial

Das dietas desenvolvidas a partir dos resultados apresentados no item 4.1.1, foi obtido o desenvolvimento, com sucesso, de *T. pretiosum* nas dietas contendo 70% de hemolinfa (dietas 6 e 8) ou 40% de hemolinfa+homogeneizado de ovos de *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) (dieta 5) (Tabela 1). Estas dietas apresentaram os maiores valores de viabilidade larval e pupal (Figura 3), com o maior número de pupas e adultos normais (Figura 4).

Os adultos obtidos na dieta 2 apresentaram as mesmas deformações descritas no item 4.1.1, ou seja, adultos com asas deformadas e abdome volumoso. No entanto, essas deformações foram reduzidas em dietas contendo homogeneizado de ovos (dieta 5) ou concentrações maiores de hemolinfa de *H. zea* (dieta 7), sendo praticamente inexistentes na dieta contendo concentração elevada de hemolinfa + homogeneizado de ovos (dieta 8). Essas deformações são comuns em espécies de *Trichogramma* criadas em diversos meios sintéticos (STRAND & VINSON, 1985; XIE *et al.*, 1988a; LI, 1982).

As deformações observadas nos adultos foram visíveis na pupa, sendo que as pupas sem segmentação do corpo não originavam adultos. Na maioria dos casos, as pupas apresentavam segmentação normal do corpo, mas com o abdome extremamente volumoso, originando, neste caso, adultos normais, mas com o abdome desproporcional em relação ao corpo do inseto. Pupas com segmentação perfeita do corpo sempre deram origem a adultos normais.

A dieta 3, contendo 70% de gema-de-ovo, causou 100% de mortalidade no início da fase de pré-pupa (visualizada pelo acúmulo de corpos de urato), provavelmente por não permitir trocas gasosas, visto que o meio apresentava-se viscoso, com a presença de gotículas de lipídeo, que se concentravam próximas às larvas. HOUSE (1954a) apresentou resultados similares para *Agria affinis* (Fallen), descrevendo a adesão de compostos lipídicos ao corpo das larvas do parasitóide, especialmente na região dos espiráculos, o que impedia a troca gasosa, ocasionando a morte das larvas.

A utilização de um agente emulsificante (Tweeng®), na concentração de 0,1% (dieta 4), para promover uma melhor emulsão da gema-de-ovo na dieta, não resultou em modificações na taxa de desenvolvimento de *T. pretiosum*. Nesta concentração, a dieta ainda apresentou gotículas de lipídeo distribuídas no meio artificial, apesar da redução na viscosidade do meio artificial. Os resultados foram semelhantes aos obtidos na dieta 3, com o desenvolvimento até a fase de pré-pupa. A

utilização de concentrações superiores deste agente emulsificante, como componente da dieta artificial, poderia afetar o desenvolvimento do parasitóide. YAZGAN (1981) demonstrou uma redução na viabilidade larval e pupal de *Pimpla turionellae* (L.) em dietas artificiais contendo concentrações de Tween 80 superiores a 0,16-0,20%. No entanto, o desenvolvimento incompleto deste parasitóide nestas dietas (3 e 4) pode ter sido ocasionado pela baixa concentração de hemolinfa utilizada (20%), visto ser esta a principal fonte protéica em dietas oligídicas para o crescimento e desenvolvimento de espécies de *Trichogramma* "in vitro" (STRAND & VINSON, 1985; IRIE *et al.*, 1987). As larvas de *T. pretiosum* criadas nas dietas 3 e 4 apresentavam tegumento extremamente frágil, característico de insetos criados em meios artificiais com níveis protéicos deficientes (HOUSE, 1983).

A adição de homogeneizado de ovos de *H. virescens* à dieta, composta por 40% de hemolinfa, resultou em um incremento na viabilidade larval e pupal, permitindo o desenvolvimento de adultos normais. Melhores resultados foram obtidos com a inclusão deste componente em dieta artificial contendo 70% de hemolinfa (Figuras 3 e 4). Estes resultados confirmam as indicações de XIE *et al.* (1986b) da presença de componentes químicos em ovos de insetos hospedeiros, que influenciariam a taxa de emergência destes parasitóides. Estes autores relataram um aumento de 7 a 13 vezes na emergência de *T. pretiosum* criado em dieta artificial, suplementada com líquido de ovos de *Manduca sexta* (Cresson). O efeito benéfico de componentes de ovos do hospedeiro no desenvolvimento de parasitóides "in vitro" também foi relatado para *T. basalis* que apresentou crescimento expressivo em dietas contendo líquido de ovos do seu hospedeiro natural (VOLKOFF *et al.*, 1992).

As porcentagens de pupas e adultos normais obtidas para as dietas 2,5,6,7 e 8 (Figura 4), associadas aos resultados de viabilidade larval e pupal, demonstraram que o componente gema-de-ovo foi essencial ao desenvolvimento de *T. pretiosum*, visto que a dieta 7 (100% de hemolinfa) não permitiu a emergência de adultos desse parasitóide. XIE *et al.* (1986b) também relataram desenvolvimento parcial de *T. pretiosum* criado apenas em hemolinfa de larvas de *M. sexta*.

A presença de concentrações elevadas de hemolinfa e homogeneizado de ovos de *H. virescens* foi fundamental para a obtenção de valores elevados de viabilidade larval e pupal de *T. pretiosum*. A inclusão do homogeneizado de ovos à

Figura 3. Viabilidade larval e pupal de *T. pretiosum*, criado em diversas dietas artificiais, com diferentes proporções de hemolinfa, gema-de-ovo, soro fetal bovino, homogeneizado de ovos e emulsificante. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 14 h.

Figura 4. Porcentagem de pupas e adultos normais de *T. pretiosum* obtidos em diversas dietas artificiais, com diferentes proporções de hemolinfa, gema-de-ovo, soro fetal bovino e homogeneizado de ovos. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 14h.

dieta com 70% de hemolinfa (D8) (Tabela 1) permitiu aumento de 3,4 e 2 vezes na viabilidade larval e de 7,4 e 2,2 vezes na viabilidade pupal de *T. pretiosum*, quando comparada, respectivamente, às dietas 5 e 6.

O período ovo-adulto de *T. pretiosum* criado na dieta 6 e 8 foi inferior ao período apresentado por esse parasitóide quando criado nas dietas 2 e 5 (Figura 5). O período ovo-adulto obtido para *T. pretiosum*, nas dietas 6 (13,12 dias) e 8 (12,89 dias), aproxima-se dos valores obtidos quando esse parasitóide foi criado em ovos de *A. kuehniella* (BLEICHER & PARRA, 1989; SÁ, 1991) ou em diversos hospedeiros naturais ou alternativos (GOODENOUGH *et al.*, 1983). Entretanto, o período ovo-adulto, apresentado nas dietas 2 (15,03 dias) e 5 (14,20 dias), foi superior aos relatados pelos autores anteriormente citados.

Figura 5. Duração média do período ovo-adulto de *T. pretiosum* criado em diversas dietas artificiais, com diferentes proporções de hemolinfa, gema-de-ovo, soro fetal bovino e homogeneizado de ovos. Temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase 14h.

Estes resultados demonstraram que a inclusão de quantidades elevadas de hemolinfa (70%) reduz a duração do período ovo-adulto de *T. pretiosum*, resultando em valores próximos àqueles encontrados no inseto criado "in vivo" (GOODENOUGH *et al.*, 1983; BLEICHER & PARRA, 1989; SÁ, 1991). Resultados semelhantes foram relatados por STRAND & VINSON (1985), que verificaram a redução no período de desenvolvimento ovo-adulto de *T. pretiosum* com o aumento da concentração de hemolinfa na dieta artificial.

Os resultados obtidos para *T. galloi* seguiram a mesma tendência daqueles alcançados para *T. pretiosum*. No entanto, *T. galloi* não apresentou desenvolvimento completo na dieta 5, contendo homogeneizado de ovos de *H. virescens*. Apesar de *H. virescens* não ser hospedeiro natural de *T. galloi* e de não ter sido relatada a ocorrência natural desse parasitóide em ovos de outras espécies de insetos, além de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794), o seu desenvolvimento tem sido observado, em condições de laboratório, em ovos de diversos hospedeiros alternativos (CONSOLI & PARRA, 1992), o que permitiu a utilização de ovos deste inseto como fonte nutricional para o desenvolvimento "in vitro" de *T. galloi*.

Os valores de viabilidade larval e pupal encontrados na dieta 2 e 6 foram superiores aos apresentados nas demais dietas (Figura 6). Apesar dos maiores valores de viabilidade larval apresentados na dieta 2, houve um grande número de pupas deformadas, e um percentual superior ao apresentado na dieta 6 (Figura 7).

O desenvolvimento obtido para *T. galloi* nas dietas 3 e 4 foi semelhante ao encontrado para *T. pretiosum*, devido, provavelmente, às mesmas exigências desses parasitóides para o desenvolvimento em meio artificial.

Apesar da dieta 7 propiciar viabilidade larval superior àquela relatada por XIE *et al.* (1986a) para *T. pretiosum* e, da elevada porcentagem de pupas normais obtidas, *T. galloi* também demonstrou necessitar da gema-de-ovo para o seu desenvolvimento "in vitro", à semelhança do ocorrido para *T. pretiosum*. GRENIER & BONNOT (1988) também descreveram que a obtenção do desenvolvimento de *Trichogramma maidis* Pintureau et Voegelé, em dieta oligídica, só foi possível com a inclusão de gema-de-ovo ao meio artificial.

O período ovo-adulto de *T. galloi*, criado em dietas com 70% de hemolinfa (13,2 dias) e 40% de hemolinfa+homogeneizado de ovos (13,5 dias), esteve próximo aos valores relatados para esta mesma espécie quando criada sobre o hospedeiro natural, *D. saccharalis* (SALES, 1992; CONSOLI & PARRA, 1992), ou sobre os hospedeiros alternativos,

Figura 6. Viabilidade larval e pupal de *T. galloi*, criado em diversas dietas artificiais, com diferentes proporções de hemolinfa, gema-de-ovo, soro fetal bovino, homogeneizado de ovos e emulsificante. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 14h.

Figura 7. Porcentagem de pupas e adultos normais de *T. galloi*, criado em diversas dietas artificiais, com diferentes proporções de hemolinfa, gema-de-ovo, soro fetal bovino e homogeneizado de ovos. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 14 h.

A. kuehniella e *Sitotroga cerealella* (Oliver) (PARRA *et al.*, 1991).

Os valores de viabilidade larval e pupal obtidos para *T. galloi* e *T. pretiosum*, criados em dieta oligídica com 70% de hemolinfa, são comparáveis aos resultados apresentados para diversas espécies de *Trichogramma* criadas "in vitro" e utilizadas, em liberações inundativas, para o controle de diversas pragas na China, único país a dominar a técnica de produção "in vitro" de inimigos naturais em larga escala (LI, 1982,1989; LI *et al.*, 1988; QIN & WU, 1988; ZHONG & ZHANG, 1989). Entretanto, os resultados relatados neste trabalho são superiores aos apresentados por diversos grupos de pesquisadores (NETTLES *et al.*, 1985; XIE *et al.*, 1986ab; GRENIER & BONNOT, 1988), que buscam o desenvolvimento deste método de produção para a criação de diversas espécies de *Trichogramma*.

4.1.3 Determinação do volume ideal de dieta

Os resultados obtidos para *T. galloi* criado na dieta 6, utilizando diferentes volumes da dieta artificial, demonstraram que o volume ideal de dieta para o desenvolvimento larval desse inimigo natural, nas condições estudadas, variou entre 3µl e 4µl.

A porcentagem de pupas e adultos formados foi crescente entre 2 e 4µl, ocorrendo uma redução nestes valores, quando da utilização de 5µl de dieta artificial. O volume de 1µl de dieta não permitiu o completo desenvolvimento deste parasitóide, ocorrendo reduzida viabilidade larval (Figura 8).

Os reduzidos valores de viabilidade larval e pupal, obtidos quando foram utilizados 1µl e 2µl, podem estar associados ao comportamento higroscópico do meio artificial, que devido aos elevados valores de umidade no interior das placas de criação, absorviam umidade do ambiente interno das placas, aumentando, desta forma, o teor de água da dieta, e causando, conseqüentemente, a diluição dos componentes nutricionais. A diluição de dietas artificiais, através de modificações no teor de água do substrato alimentar, pode alterar sua qualidade nutricional, influenciando o ganho de peso, duração e viabilidade larval, além de afetar a performance dos adultos (SLANSKY & SCRIBER, 1985).

No entanto, a redução nos valores biológicos obtidos com 5µl de dieta artificial, principalmente quanto à viabilidade pupal, parece estar relacionada ao volume

excessivo de dieta presente. As larvas mantiveram contato com a dieta remanescente, mesmo com a retirada do líquido que permanecia junto a elas, após 48 horas de desenvolvimento. Nestas condições, muitas vezes, não havia ingestão da dieta que permanecia em contato entre as larvas, pois muitas já haviam se transformado em pré-pupas, permitindo, novamente, o acúmulo de água. Este fato fez com que a operação de retirada do líquido acumulado fosse repetida inúmeras vezes. A presença de líquido em contato com indivíduos no estágio de pré-pupa é extremamente prejudicial ao desenvolvimento de parasitóides do gênero *Trichogramma*, visto que, nesta fase de desenvolvimento, ocorre uma elevação no consumo de oxigênio por estes insetos (DAI *et al.*, 1982).

O percentual de pupas e adultos normais foi elevado em todas as condições de criação, excetuando-se 1 μ l, que não possibilitou o desenvolvimento dos insetos até a fase adulta. A redução no percentual de pupas normais obtida na criação com 5 μ l de dieta artificial, demonstrou os efeitos prejudiciais do excesso de

Figura 8. Viabilidade larval e pupal de *T. galloi* criado em diversos volumes de dieta artificial, composta de hemolinfa, gema-de-ovo e soro fetal bovino. Temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase 14 h.

de meio artificial, que induziu a um consumo excessivo pelas larvas de *T. galloi* levando a um crescimento exagerado e, gerando, desta forma, um grande número de pupas anormais (Figura 9).

Os insetos emergidos de pupas apresentando segmentação do corpo definida, porém com a região abdominal exageradamente desenvolvida, originavam, em geral, adultos com asas e abdome deformados. Essas deformações são típicas dos insetos criados em meio artificial inadequado (item 4.1.1), tendo sido observadas para diversas espécies de *Trichogramma* criadas "in vitro" (LI, 1982; LI *et al.*, 1988; XIE *et al.*, 1986a).

O período de desenvolvimento ovo-adulto de *T. galloi* obtido com 2, 3 e 4µl de dieta artificial foi semelhante, ocorrendo uma tendência de alongamento deste período com a utilização de 5µl de dieta artificial (Figura 10).

4.1.4 Efeito de substratos para a colocação das dietas artificiais

O desenvolvimento obtido para *T. galloi* e *T. pretiosum* em placas de poliestireno foi extremamente reduzido, ocorrendo o desenvolvimento larval até o início da fase de pré-pupa (48-72 horas de desenvolvimento). A interrupção do desenvolvimento larval destes parasitóides foi atribuída, neste caso, ao contacto da dieta com as larvas dos parasitóides no interior dos orifícios de criação, mesmo após a retirada do excesso de dieta. A permanência desta pequena quantidade de dieta em contato com as larvas ocorreu devido ao formato em U da porção inferior dos orifícios da placa de poliestireno, que facilitou o acúmulo e a retenção de resíduos de dieta na fase de pré-pupa de *T. galloi* e *T. pretiosum*, resultando em 100% de mortalidade. No entanto, o formato plano do fundo dos orifícios de criação proporcionou a eliminação do excesso de dieta, permitindo o desenvolvimento completo deste parasitóide (XIE *et al.*, 1986a).

Por outro lado, o desenvolvimento obtido em lâminas escavadas foi semelhante aos relatados para *T. galloi* e *T. pretiosum* no item 4.1.2, respectivamente, para as dietas 6 e 8 (Tabela 1).

Figura 9. Porcentagem de pupas e adultos normais de *T. galloi* criado em diversos volumes de dieta artificial, composta de hemolinfa, gema-de-ovo e soro fetal bovino. Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase 14 horas.

Figura 10. Duração média do período ovo-adulto de *T. galloi* criado em diversos volumes de dieta artificial, composta de hemolinfa, gema-de-ovo e soro fetal bovino. Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase 14 h.

T. galloi apresentou 89,74% e 34,37% de viabilidade larval e pupal, respectivamente. O percentual de insetos normais que se desenvolveram na dieta foi elevado, ocorrendo a formação de 91,43% de pupas normais, com a emergência de 93,47% de adultos normais.

Os resultados obtidos para *T. pretiosum* foram semelhantes aos obtidos para *T. galloi*, ocorrendo, no entanto, uma viabilidade pupal superior àquela relatada para *T. galloi*. Os valores de viabilidade larval e pupal foram de 98,33% e 81,40%, respectivamente. O número de insetos normais produzidos nestas condições também foi elevado, com 96,61% e 98,41% de pupas e adultos normais, respectivamente.

4.1.5 Efeito dos diversos componentes de insetos no desenvolvimento das dietas artificiais

As dietas artificiais, que apresentavam hemolinfa de lagartas de *Bombyx mori* L., 1758 e holotecidos pupais de *Anticarsia gemmatilis* (Hübner, 1818) ou *D. saccharalis* como fonte protéica para a criação de *T. pretiosum* "in vitro", não permitiram o desenvolvimento completo desse parasitóide. Nessas dietas ocorreu o crescimento larval até o 3º instar, sendo que, para a dieta composta por holotecidos pupais de *D. saccharalis* a mortalidade no início do estágio larval atingiu, praticamente, 100%.

Entretanto, as dietas contendo hemolinfa de lagartas de *H. zea* (DLHZ) ou holotecidos pupais de *B. mori* (DPBM) permitiram o completo desenvolvimento de ovo a adulto deste parasitóide, ilustrado na Figura 11. A dieta composta por hemolinfa de lagartas de *H. zea* foi superior àquela composta por holotecidos pupais de *B. mori*, apresentando menor duração do período ovo-adulto, maior viabilidade larval e pupal (Tabela 3), além de permitir o desenvolvimento de um maior número de insetos normais (pupas e adultos).

Os valores de duração do período ovo-adulto, viabilidade larval e pupal apresentados por *T. pretiosum*, criado em dieta composta por hemolinfa de lagartas de *H. zea*, foram similares àqueles apresentados no item 4.1.2, quando este parasitóide foi criado nesta mesma dieta artificial. O período ovo-adulto de *T. pretiosum* criado na dieta com hemolinfa de lagartas de *H. zea* foi similar àquele

Figura 11. Ilustração do desenvolvimento ovo-adulto de *T. pretiosum* e *T. galloi* criados "in vitro". A - larvas; B - pré-pupas (acúmulo de corpos de urato); C - pupas recém-formadas; D - pupas em final de desenvolvimento; E - adulto recém-emergido; F.1 e F.2- *T. pretiosum* e *T. galloi* parasitando ovos de *H. virescens* e *D. saccharalis* respectivamente.

apresentado por este parasitóide quando criado em ovos de hospedeiros naturais ou alternativos (GOODENOUGH *et al.*, 1983; BLEICHER & PARRA, 1989; SÁ, 1991).

Apesar de *T. pretiosum* apresentar viabilidade larval de 88,36%, com a formação de 85,50% de pupas normais, quando criado em dieta artificial composta por holotecido pupal de *B. mori* (DPBM), a viabilidade pupal foi de apenas 17,49%. Mesmo com o reduzido número de pupas anormais, a emergência de adultos normais foi extremamente inferior àquela obtida por este inseto, quando criado em dieta contendo hemolinfa de lagartas de *H. zea* (DLHZ) (Figura 12).

Tabela 3. Duração média do período ovo-adulto, viabilidade larval e pupal de *T. pretiosum* criado em dietas artificiais compostas por diferentes componentes de insetos. Temperatura: 25±1°C e fotofase 14 horas.

Dieta	Duração média* (Dias) [x±s(x)]	Viabilidade (%)* [x±s(x)]	
		Larval	Pupal
DLHZ**	11,88±0,17a	83,42±8,38a	80,59±7,76a
DPBM***	13,99±0,35 b	88,36±9,32 b	17,49±4,78 b

*. Médias seguidas pela mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05).

**.. Dieta composta de hemolinfa de lagartas de *H. zea*.

***. Dieta composta de holotecidos pupais de *B. mori*.

As deformações ocorridas nestes insetos foram semelhantes às aquelas descritas nos itens 4.2.1 e 4.2.2. Apesar de alguns adultos apresentarem aspecto morfológico normal, o tamanho do abdome foi desproporcional ao tamanho do inseto.

T. galloi ao contrário de *T. pretiosum*, apresentou desenvolvimento de ovo a adulto (ilustrado na Figura 11) apenas na dieta composta por hemolinfa de lagartas de *H. zea* (DLHZ) (Figura 13). O desenvolvimento obtido na dieta composta por holotecido pupal de *A. gemmatilis* (DPAG) foi extremamente reduzido, ocorrendo o desenvolvimento até o 3º instar larval, enquanto a dieta com hemolinfa de lagartas de *B.*

mori (DLBM), apresentou mortalidade total, no início do desenvolvimento larval. Por outro lado, as dietas compostas por holotécidos de pupas de *B. mori* (DPBM) ou *D. saccharalis* (DPDS) permitiram o desenvolvimento até a fase de pupa desse parasitóide. No entanto, na dieta DPBM não ocorreu o desenvolvimento de pupas normais (Figura 14).

O período ovo-adulto (11,35 dias) de *T. galloi* quando criado na dieta DLHZ, foi similar ao apresentado por esse parasitóide quando criado em ovos do hospedeiro natural (CÔNSOLI & PARRA, 1992; SALES, 1992) ou em diversos hospedeiros alternativos (PARRA *et al.*, 1991; CÔNSOLI & PARRA, 1992).

Apesar de serem formadas 74,05% de pupas normais de *T. galloi*, em dieta contendo hemolinfa de lagartas de *H. zea* (DLHZ), houve 15,79% de adultos deformados. As deformações presentes foram semelhantes àquelas descritas anteriormente para *T. pretiosum*.

Figura 12. Porcentagem de pupas e adultos normais de *T. pretiosum*, criado em dieta artificial contendo diferentes componentes de insetos. Temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase 14h.

As diferenças encontradas quanto ao desenvolvimento de *T. pretiosum* e *T. galloi* em dietas artificiais contendo fontes protéicas provenientes de diferentes

Figura 13. Viabilidade larval e pupal de *T. galloi* criado em dietas artificiais contendo diferentes componentes de insetos. Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase 14 horas.

Figura 14. Porcentagem de pupas e adultos normais de *T. galloi*, criado em dietas artificiais contendo diferentes componentes de insetos. Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase 14 h.

espécies de insetos, podem estar relacionadas às diferenças no valor nutricional desses componentes, como também a fatores como a osmolaridade e pH do meio, visto que estes parâmetros podem afetar o desenvolvimento de parasitóides em dietas artificiais (THOMPSON, 1986; GRENIER *et al.*, 1986). Alterações nestes fatores são extremamente importantes para o desenvolvimento de parasitóides "in vitro", sendo que ZHONG & ZHANG (1989) descreveram o efeito nocivo de pequenas variações do pH da dieta artificial, no desenvolvimento de *Trichogramma confusum* Viggiani "in vitro".

A obtenção do desenvolvimento ovo-adulto de *T. pretiosum* em DPBM e o desenvolvimento de *T. galloi* até a fase de pupa nas dietas DPBM e DPDS sugerem que pupas de *B. mori* e *D. saccharalis* permitem o desenvolvimento "in vitro" desses parasitóides, sendo necessário, no entanto, o estudo da proporção ideal para cada uma destas fontes nutricionais na composição das dietas artificiais, para ambos os parasitóides. Outro fator a ser analisado é a forma de obtenção destes componentes, visto que o processo de maceração e centrifugação das pupas, utilizado no preparo destes materiais, poderia estar afetando a sua composição, via dissolução de certas proteínas estruturais ou mesmo eliminação de proteínas importantes para o desenvolvimento "in vitro" de *T. pretiosum* e *T. galloi*. GRENIER & BONNOT (1988) relataram que a utilização do processo térmico, com temperaturas elevadas, para a inativação das fenoloxidasas, pode destruir fatores químicos presentes na hemolinfa que, induzem a metamorfose de larvas de *Trichogramma*. Estes autores também descreveram o efeito negativo do processo de centrifugação, para a obtenção de hemolinfa de insetos, no desenvolvimento de larvas e pupas de *Trichogramma maidis* Pintureau & Voegelé, criado em dieta artificial.

4.2 Desempenho dos insetos produzidos "in vivo" e "in vitro"

4.2.1 Biologia e parasitismo de *T. pretiosum*

O período ovo-adulto de *T. pretiosum* foi semelhante quando esse parasitóide foi criado em ovos de *H. virescens* e *A. kuehniella*. Entretanto, o período ovo-adulto obtido em dieta artificial, composta de hemolinfa de *H. zea*, gema-de-ovo, homogeneizado de ovos e soro fetal bovino, foi superior àqueles relatados para os insetos criados "in vivo" (Tabela 4). Estes resultados são semelhantes aos obtidos por diversos

autores criando este parasitóide em ovos de *H. virescens* (GOODENOUGH *et al.*, 1983) e *A. kuehniella* (GOODENOUGH *et al.*, 1983; BLEICHER & PARRA, 1989; SÁ, 1991).

O período de desenvolvimento de *T. pretiosum*, criado em dieta artificial, foi similar ao apresentado por duas linhagens desse parasitóide, criadas em ovos de *H. zea* (SÁ, 1991), apesar da duração, no presente trabalho, ter sido superior àquela encontrada em ovos de *H. virescens* e *A. kuehniella*.

Devido aos valores de mortalidade do estágio pré-imaginal serem desprezíveis, quando *T. pretiosum* e *T. galloi* foram criados em ovos do hospedeiro alternativo (CONSOLI & PARRA, n. publ.), foi possível comparar a viabilidade do período ovo-adulto dos insetos produzidos "in vitro" com aqueles criados "in vivo", pois os valores de mortalidade calculados para os insetos criados "in vivo" são obtidos, na realidade, após o desenvolvimento do estágio pré-pupal. As observações de mortalidade só podem ser realizadas neste estágio de desenvolvimento, devido à deposição de grânulos escuros no interior do córion do hospedeiro, no início da fase de pré-pupa, quando os ovos do hospedeiro adquirem uma coloração escura, característica dos ovos parasitados por estes insetos (MOUTIA & COURTOIS, 1952).

Tabela 4. Duração média e viabilidade do período ovo-adulto de *T. pretiosum* criado "in vivo" e "in vitro". Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa $80\pm 10\%$ e fotofase 14 horas.

Hospedeiro	Duração* (Dias) [$\bar{x}\pm s(\bar{x})$]	Viabilidade* (%) [$\bar{x}\pm s(\bar{x})$]
<i>H. virescens</i>	$10,30\pm 0,04a$	$94,29\pm 2,21a$
<i>A. kuehniella</i>	$10,14\pm 0,06a$	$94,00\pm 3,05a$
DLHZ**	$11,88\pm 0,12 b$	$50,89\pm 8,62 b$

*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

**.. Dieta artificial composta de hemolinfa de lagartas de *H. zea*.

A viabilidade do período ovo-adulto de *T. pretiosum* criado em dieta artificial foi sensivelmente inferior aos valores apresentados quando esse parasitóide se desenvolveu em condições naturais (Tabela 4). Entretanto, a viabilidade obtida em dieta artificial com hemolinfa de *H. zea* (DLHZ) (50,89%) é comparável aos melhores resultados apresentados para *Trichogramma dendrolimi* Matsumura (66,14%) e *T. nubilale* Ertle & Davis (63,64%), criados em dietas artificiais, utilizando-se de um sistema mecanizado de produção. Esses parasitóides, assim produzidos, são utilizados em programas intensivos de controle de pragas, através de inúmeras liberações inundativas (Li *et al.*, 1988).

A capacidade de parasitismo de *T. pretiosum* e a porcentagem de fêmeas ativas, criadas em condições naturais e artificiais, variou com o hospedeiro utilizado (Tabela 5). O parasitismo de ovos de *H. virescense* *A. kuehniella* por *T. pretiosum*, criado em dieta artificial (DLHZ), foi inferior ao parasitismo apresentado por insetos criados em ovos do hospedeiro natural e alternativo. Os resultados também demonstraram que adultos criados no hospedeiro alternativo foram menos fecundos quando submetidos ao parasitismo de ovos de *H. virescens*.

Entretanto, o parasitismo de ovos de *A. kuehniella* foi similar quando *T. pretiosum* foi criado em ovos do hospedeiro natural ou alternativo (Tabela 5). MARSTON & ERTLE (1973) relataram resultados semelhantes para *Trichogramma minutum* Riley, que apresentou reduzida capacidade de parasitismo em ovos do hospedeiro natural, quando criado no hospedeiro alternativo. Da mesma forma, o parasitismo de ovos do hospedeiro alternativo foi similar, independentemente do hospedeiro utilizado.

O número de fêmeas de *T. pretiosum* que parasitaram ovos do hospedeiro natural ou alternativo foi elevado (>90%) para todas as condições de criação, exceto para as fêmeas produzidas em dieta artificial (40%) e expostas a ovos de *H. virescens*. Neste caso, ocorreu uma drástica redução no número de indivíduos que efetuaram o parasitismo. Esses resultados são expressivos, visto que o número de fêmeas de *T. pretiosum*, criadas em dieta artificial, que parasitaram ovos do hospedeiro alternativo, foi próximo aos demais tratamentos, embora com uma capacidade de parasitismo menor.

T. pretiosum apresentou ritmo de parasitismo diário e parasitismo acumulado semelhantes, quando criado em condições naturais ou artificiais. O parasitismo foi realizado por longo tempo, em ambos os hospedeiros utilizados, *H. virescense* *A. kuehniella*, sendo obtido um parasitismo acumulado de 80% apenas ao

Tabela 5. Número médio de ovos de *H. virescens* e *A. kuehniella* parasitados e porcentagem de fêmeas de *T. pretiosum*, criadas "in vivo" e "in vitro", que efetuaram o parasitismo. Temperatura $25\pm1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa $60\pm10\%$ e fotofase 14 h.

Hospedeiro	<i>H. virescens</i>		<i>A. kuehniella</i>	
	Parasitismo* (ovos/fêmea) [$\bar{x}\pm s(\bar{x})$]	% fêmeas que parasitaram	Parasitismo* (ovos/fêmea) [$\bar{x}\pm s(\bar{x})$]	% fêmeas que parasitaram
<i>H. virescens</i>	41,58 $\pm$ 3,05a	96,00	73,50 $\pm$ 9,23a	96,00
<i>A. kuehniella</i>	29,09 $\pm$ 2,38 b	92,00	67,48 $\pm$ 6,19a	100,00
DLHZ**	13,50 $\pm$ 3,97 c	40,00	33,86 $\pm$ 4,60 b	88,00

*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

**. Dieta artificial composta de hemolinfa de lagartas de *H. zea*

Tabela 6. Longevidade média (dias), observada e estimada, de fêmeas de *T. pretiosum*, criadas "in vivo" e "in vitro", parasitando ovos de *H. virescens* e *A. kuehniella* Temperatura $25\pm1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa $60\pm10\%$ e fotofase 14 h.

Hospedeiro	<i>H. virescens</i>		<i>A. kuehniella</i>	
	Longevidade* observada [$\bar{x}\pm s(\bar{x})$]	Longevidade estimada**	Longevidade* observada [$\bar{x}\pm s(\bar{x})$]	Longevidade estimada
<i>H. virescens</i>	15,40 $\pm$ 0,80a	14,80	15,52 $\pm$ 1,10a	16,21
<i>A. kuehniella</i>	12,80 $\pm$ 1,09a	11,53	16,64 $\pm$ 1,29a	18,62
DLHZ***	5,04 $\pm$ 0,74 b	4,69	9,72 $\pm$ 1,20 b	9,52

*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

**. Valores obtidos pelo modelo da distribuição de Weibull.

***. Dieta artificial composta de hemolinfa de lagartas de *H. zea*

Figura 15. Parasitismo acumulado e parasitismo médio diário de ovos de *H. virescens* por *T. pretiosum* criado "in vivo" e "in vitro". Temperatura $25 \pm 10^\circ\text{C}$; umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase 14 h.

redor do 10º dia de parasitismo (Figuras 15 e 16). Estes resultados são diferentes dos encontrados na literatura, que relatam taxas semelhantes de parasitismo ao redor do 4º dia de parasitismo, quando esse parasitóide é criado no hospedeiro natural ou alternativo (BLEICHER & PARRA, 1990; SA, 1991).

Fêmeas de *T. pretiosum*, criadas em dieta artificial, foram menos longevas que as fêmeas criadas em ovos de *H. virescens* e *A. kuehniella* submetidas ao parasitismo de ovos do hospedeiro natural ou alternativo. A longevidade deste parasitóide foi similar quando criado em *H. virescens* ou *A. kuehniella* em qualquer condição de parasitismo estudada (Tabela 6).

Os resultados de longevidade neste trabalho são superiores aos apresentados por SA (1991), criando *T. pretiosum* em ovos do hospedeiro alternativo, *A. kuehniella*, e de dois hospedeiros naturais, *H. zea* e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Este autor ainda verificou maior longevidade para fêmeas desse parasitóide criadas no hospedeiro alternativo. No entanto, os valores obtidos nesta pesquisa são semelhantes aos relatados por BLEICHER & PARRA (1990), criando 3 linhagens de *T. pretiosum* em ovos do hospedeiro alternativo.

Utilizando-se o modelo de distribuição de Weibull foi possível estimar a longevidade média (Tabela 6) e determinar as curvas de sobrevivência das fêmeas de *T. pretiosum*, criadas "in vivo" e "in vitro", parasitando ovos do hospedeiro natural e alternativo (Figuras 17 e 18).

4.2.2 Biologia e parasitismo de *T. galloi*

T. galloi não apresentou diferenças na duração do período ovo-adulto, quando criado em dieta artificial, composta de hemolinfa de lagartas de *H. zea*, gema-de-ovo e soro fetal bovino (DLHZ), em ovos do hospedeiro natural (*D. saccharalis*) ou em ovos do hospedeiro alternativo (*A. kuehniella*) (Tabela 7). O período ovo-adulto, obtido nesta pesquisa, foi semelhante aos relatados para *T. galloi* criado em ovos de *D. saccharalis* (CÔNSOLI & PARRA, 1992; SALES, 1992) ou em ovos de diversos hospedeiros alternativos (PARRA *et al.*, 1991; CÔNSOLI & PARRA, 1992).

Figura 16. Parasitismo acumulado e parasitismo médio diário de ovos de *A. kuehniella* por *T. pretiosum*, criado "in vivo" e "in vitro". Temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase 14 h.

Apesar de *T. galloi* criado em dieta artificial, apresentar taxa de desenvolvimento idêntica à encontrada para este inseto, quando criado em ovos do hospedeiro natural, *D. saccharalis* ou alternativo, *A. kuehniella*, a viabilidade do período ovo-adulto foi extremamente reduzida (Tabela 7). As comparações da viabilidade desse período, entre os diferentes tratamentos, foi possível devido às pesquisas de CONSOLI & PARRA (n. publ.), citados no item anterior. A redução nos valores de viabilidade do período ovo-adulto de *T. galloi* criado "in vitro", está relacionada a grande mortalidade no período de pupa desse inseto, devido à alta umidade presente no interior das placas de criação e à pequena quantidade de água livre em contato com as pupas desse inseto. Os efeitos negativos de elevados valores de umidade relativa e da água livre no desenvolvimento de *T. galloi* parasitando ovos de *D. saccharalis* foram pesquisados por CONSOLI *et al.* (n. publ.), que demonstraram uma drástica redução na emergência desse parasitóide quando criado em umidade relativa de 100% ou em ambiente saturado, contendo água livre em contato com os ovos do hospedeiro utilizado.

Tabela 7. Duração média e viabilidade do período ovo-adulto de *T. galloi* criado "in vivo" e "in vitro". Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa $60\pm 10\%$ e fotofase 14 horas.

Hospedeiro	Duração* (Dias) [$\bar{x}\pm s(\bar{x})$]	Viabilidade* (%) [$\bar{x}\pm s(\bar{x})$]
<i>D. saccharalis</i>	$11,28\pm 0,08a$	$98,00\pm 2,40a$
<i>A. kuehniella</i>	$11,28\pm 0,07a$	$99,00\pm 0,99a$
DLH7**	$11,35\pm 0,04a$	$26,10\pm 6,75 b$

*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

**, Dieta artificial composta de hemolinfa de lagartas de *H. zea*.

A viabilidade do período ovo-adulto de *T. galloi* (26,10%), criado em dieta artificial, apesar de ser inferior aos relatos apresentados para várias espécies de *Trichogramma* produzidos "in vitro" (LI, 1989), é superior aos apresentados para *T.*

Figura 17. Curvas de sobrevivência de fêmeas de *T. pretiosum* criadas "in vivo" e "in vitro", parasitando ovos de *H. virescens* Temperatura $25 \pm 10^\circ\text{C}$; umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase 14h. Valores calculados pela distribuição de Weibull.

Figura 18. Curvas de sobrevivência de fêmeas de *T. pretiosum* criadas "in vivo" e "in vitro", parasitando ovos de *A. kuehniella* Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa $60\pm 10\%$ e fotofase 14h. Valores calculados pela distribuição de Weibull.

pretiosum (XIE *et al.*, 1986ab), *T. confusum* (LI *et al.*, 1988) e *T. dendrolimi* (QIN & WU, 1988). NETTLES (1990) atribuiu a baixa viabilidade no desenvolvimento de parasitóides "in vitro" à ausência de determinados componentes químicos, essenciais ao desenvolvimento e crescimento desses insetos em condições artificiais de criação.

O parasitismo de ovos de *D. saccharalis* por *T. galloi* foi reduzido quando os parasitóides foram criados no hospedeiro alternativo ou em dieta artificial. Os adultos obtidos da criação em dieta artificial foram os de menor fecundidade oferecidos ovos da broca-da-cana para o parasitismo (Tabela 8). Entretanto, o parasitismo de *T. galloi*, criado em dieta artificial, foi superior ao parasitismo dos insetos criados em ovos da broca-da-cana e da traça-da-farinha, quando foram oferecidos ovos de *A. kuehniella* como hospedeiro (Tabela 8).

Os valores de parasitismo de ovos de *D. saccharalis* por *T. galloi*, criado "in vivo" e "in vitro", foram superiores aos apresentados por SALES (1992) e LOPES (1988), criando este inimigo natural em ovos do hospedeiro natural e alternativo, respectivamente.

Tabela 8. Número médio de ovos de *D. saccharalis* e *A. kuehniella* parasitados e porcentagem de fêmeas de *T. galloi*, criadas "in vivo" e "in vitro", que efetuaram o parasitismo. Temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase 14 horas.

Hospedeiro	<i>D. saccharalis</i>		<i>A. kuehniella</i>	
	Parasitismo* (ovos/fêmea) [$\bar{x} \pm s(\bar{x})$]	% fêmeas que parasitaram	Parasitismo* (ovos/fêmea) [$\bar{x} \pm s(\bar{x})$]	% fêmeas que parasitaram
<i>D. saccharalis</i>	46,20 $\pm$ 2,30a	100,00	39,56 $\pm$ 6,02a	72,00
<i>A. kuehniella</i>	38,17 $\pm$ 1,37 b	100,00	39,05 $\pm$ 2,87a	87,00
DLHZ**	31,17 $\pm$ 2,05 c	96,00	48,41 $\pm$ 2,29 b	80,00

*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

**. Dieta artificial composta de hemolinfa de lagartas de *H. zea*

O ritmo de parasitismo de *T. galloi* criado em condições naturais e artificiais, foi semelhante para ambos os hospedeiros utilizados, ocorrendo uma taxa de parasitismo acumulada de 80% até o 4^o dia de atividade das fêmeas (Figuras 19 e 20). Esses resultados são semelhantes aos apresentados por SALES (1992), criando esse parasitóide em ovos de *D. saccharalis*.

A porcentagem de fêmeas de *T. galloi* que parasitaram, quando oferecidos ovos da broca-da-cana, foi extremamente elevada, sendo que praticamente a totalidade das fêmeas efetuaram o parasitismo, em qualquer condição de criação estudada. Por outro lado, os insetos criados na broca-da-cana apresentaram as maiores taxas de rejeição de ovos de *A. kuehniella*. Do total de fêmeas estudadas, 28% não parasitaram (Tabela 8). De um modo geral, *T. galloi* pareceu não se adaptar adequadamente ao hospedeiro alternativo utilizado, pois essa redução no número de fêmeas, que efetuaram o parasitismo, também ocorreu para os insetos criados em ovos de *A. kuehniella* e em dieta artificial. Essa inadequação aparente dos ovos do hospedeiro alternativo para o parasitismo de *T. galloi* tem criado certas dificuldades para o processo de produção desse parasitóide, utilizando-se ovos deste hospedeiro alternativo para a sua criação (PARRA, inf. pessoal).

A longevidade de fêmeas de *T. galloi* criadas em dieta artificial foi inferior à longevidade das fêmeas criadas em ovos da broca-da-cana e da traça-da-farinha, quando submetidas ao parasitismo de ovos de *D. saccharalis*. As fêmeas desse parasitóide, criadas no hospedeiro natural e alternativo, apresentaram valores de longevidade semelhantes (Tabela 9).

Quando foram oferecidos ovos da traça-da-farinha para o parasitismo de *T. galloi*, as fêmeas desse parasitóide apresentaram acentuada redução na longevidade, que foi similar às fêmeas criadas em dieta artificial (Tabela 9).

Apesar da menor longevidade de *T. galloi* criado em dieta artificial, em relação aos insetos criados "in vivo", os resultados são superiores aos apresentados por SALES (1992), criando esse parasitóide em ovos da broca-da-cana.

Através da distribuição de Weibull foi possível estimar a longevidade média de *T. galloi* (Tabela 9), além de determinar as curvas de sobrevivência das fêmeas desse parasitóide, para cada condição estudada (Figuras 21 e 22).

Apesar da capacidade de parasitismo e da longevidade de *T. galloi* criado em meio artificial, terem sido inferiores às aquelas apresentadas por adultos criados em meio natural, a dieta artificial utilizada para a sua criação parece ter sido adequada

Figura 19. Parasitismo acumulado e parasitismo médio diário de ovos de *D. saccharalis* por *T. galloi* criado "in vivo" e "in vitro". Temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h.

ao seu crescimento e desenvolvimento, visto que a duração do estágio pré-imaginal foi similar em ambas as condições de criação. A redução nos valores biológicos de *T. galloi* pode estar relacionados às alterações físicas da dieta, provocadas pelas condições do ambiente de criação, principalmente, pela sua elevada umidade. O ambiente saturado, no interior das placas de criação, provocou a diluição do meio artificial, alterando a concentração dos diversos componentes nutricionais. A diluição do substrato alimentar, da fase imatura, influencia a performance dos adultos, reduzindo a sua fecundidade e longevidade (SOHAL, 1985).

Tabela 9. Longevidade média (dias), observada e estimada, de fêmeas de *T. galloi*, criadas "in vivo" e "in vitro", parasitando ovos de *D. saccharalis* e *A. kuehniella* Temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa $60\pm 10\%$ e fotofase 14 h.

Hospedeiro	<i>D. saccharalis</i>		<i>A. kuehniella</i>	
	Longevidade* observada [$\bar{x}\pm s(\bar{x})$]	Longevidade estimada**	Longevidade* observada [$\bar{x}\pm s(\bar{x})$]	Longevidade estimada
<i>D. saccharalis</i>	$8,87\pm 0,42a$	8,51	$4,48\pm 0,43 b$	4,34
<i>A. kuehniella</i>	$8,03\pm 0,47a$	7,40	$7,08\pm 0,51a$	7,74
DLHZ***	$6,20\pm 0,47 b$	5,62	$5,08\pm 0,39 b$	4,36

*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

**. Valores obtidos pelo modelo da distribuição de Weibull.

***. Dieta artificial composta de hemolinfa de lagartas de *H. zea*

4.2.3 Tamanho de adultos de *T. pretiosum* e *T. galloi*

T. pretiosum, criado em dieta artificial, composta de hemolinfa de *H. zea*, gema-de-ovo, homogeneizado de ovos e soro fetal bovino (DLHZ), apresentou as mesmas dimensões dos insetos criados "in vivo". No entanto, a relação entre o comprimento da tibia posterior e o comprimento da cápsula genital foi

Figura 20. Parasitismo acumulado e parasitismo médio diário de ovos de *A. kuehniella* por *T. galloxi* criado "in vivo" e "in vitro". Temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h.

significativamente inferior à relação apresentada pelos insetos criados em ovos de *H. virescens* e *A. kuehniella* (Tabela 10). Essas medições indicaram que os insetos criados "in vitro", apesar de aparentemente normais, apresentavam o abdome desproporcional ao tamanho do corpo.

Os resultados obtidos para *T. galloi*, ao contrário daqueles apresentados para *T. pretiosum*, demonstraram que este parasitóide apresentou variações quanto às suas dimensões, dependendo da condição de criação utilizada. Os adultos de *T. galloi*, produzidos em ovos de *A. kuehniella*, foram menores do que aqueles obtidos em ovos do hospedeiro natural, *D. saccharalis*. Os adultos criados em dieta artificial apresentaram tamanho intermediário em relação aos insetos que se desenvolveram em ovos da broca-da-cana e da traça-da-farinha (Tabela 11).

T. galloi, criado em dieta artificial, apresentou um crescimento exagerado do abdome, o que resultou em uma relação CT/CCG inferior à dos insetos criados "in vivo", originando adultos com proporções distintas daqueles obtidos em ovos de *D. saccharalis* e *A. kuehniella* (Tabela 11).

Tabela 10. Dimensões (μ) da tibia posterior e da cápsula genital e relação entre o comprimento da tibia (CT)/comprimento da cápsula genital (CCG) de fêmeas de *T. pretiosum* criadas "in vivo" e "in vitro".

Hospedeiro*	Tibia**	Cápsula genital**		CT/CCG
	[x±s(x)]	[x±s(x)]		
	Comprimento	Comprimento	Largura	
Natural	156,74±5,00a	155,10±4,28a	92,63±2,38a	1,01±0,01a
Altern.	157,26±2,32a	155,27±2,58a	92,85±1,46a	1,01±0,01a
DLHZ	155,22±2,64a	163,24±2,79a	97,74±2,11a	0,95±0,01 b

*. hospedeiro natural= *H. virescens*; hospedeiro alternativo= *A. kuehniella*; DLHZ= dieta composta de hemolinfa de lagartas de *H. zea*

** Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Apesar da qualidade dos insetos entomófagos utilizados em programas de controle biológico estar relacionada, normalmente, ao seu tamanho, que serve como um indicador da sua capacidade reprodutiva, longevidade, taxa de "procura" e capacidade de dispersão (Charnov¹ citado por KAZMER & LUCK, 1991), os resultados indicaram que as aferições do tamanho das fêmeas de *T. pretiosum* (Tabela 10) e *T. galloi* (Tabela 11) (através do comprimento da tibia) não foram um bom parâmetro para se avaliar a capacidade reprodutiva desses insetos (itens 4.2.1 e 4.2.2). Esses resultados são semelhantes aos apresentados para *T. pretiosum* por KAZMER & LUCK (1991) que, em estudos de seleção de adultos, indicaram que o tamanho dos insetos não foi um bom indicador para verificar a sua performance. No entanto, MARSTON & ERTLE (1973) e BIGLER *et al.* (1987) indicaram forte relação entre o tamanho de fêmeas de *Trichogramma* e a sua capacidade reprodutiva. Assim, MARSTON & ERTLE (1973) sugeriram que medições do tamanho do abdome seriam mais adequadas do que as medições da tibia, para avaliações da performance desses insetos. Estas

Tabela 11. Dimensões (μ) da tibia posterior e da cápsula genital e relação entre o comprimento da tibia (CT)/ comprimento da cápsula genital (CCG) de fêmeas de *T. galloi* criadas "in vivo" e "in vitro".

Hospedeiro*	Tibia**	Cápsula genital**		CT/CCG
	[x±s(x)]	[x±s(x)]		
	Comprimento	Comprimento	Largura	
Natural	167,59±2,07a	194,50±3,17a	119,89±1,99a	0,86±0,01a
Altern.	158,65±1,40 b	177,62±3,09 b	106,70±1,71 b	0,89±0,01a
DLHZ	163,01±1,61ab	199,36±1,61a	110,26±1,06 b	0,82±0,01 b

*. hospedeiro natural= *D. saccharalis* hospedeiro alternativo= *A. kuehniella*; DLHZ= dieta artificial composta de hemolinfa de lagartas de *H. zea*

** . Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

¹CHARNOV, E.L. The theory of sex allocation. Princeton University Press. Princeton, New Jersey, USA. 1982.

Figura 21. Curvas de sobrevivência de fêmeas de *T. galloxi* criadas "in vivo" e "in vitro", parasitando ovos de *D. saccharalis* Temperatura $25 \pm 10^\circ\text{C}$; umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase 14h. Valores calculados pela distribuição de Weibull.

indicações são contrárias aos resultados apresentados neste trabalho pois, apesar de não ser verificada diferença no tamanho do abdome de fêmeas de *T. pretiosum* criadas "in vivo" e "in vitro" (Tabela 10), ocorreram diferenças na capacidade reprodutiva desse inseto (item 4.2.1). Da mesma forma, o maior parasitismo encontrado para *T. galloi* (item 4.2.2) não foi correlacionado com fêmeas que apresentavam maior abdome (Tabela 11).

4.2.4 Deformações de adultos de *T. pretiosum* e *T. galloi*

Dissecações de fêmeas recém-emergidas de *T. pretiosum* e *T. galloi* criadas "in vivo" e "in vitro", indicaram que estes parasitóides não demonstravam nenhuma deformação aparente no seu aparelho reprodutor, apresentando um par de ovários alongados, duas glândulas acessórias e o ovipositor (Figura 23).

Porém, os insetos criados em dieta artificial, apresentaram várias anomalias nas asas e abdome (Figura 24). As deformações presentes foram similares para *T. pretiosum* e *T. galloi*, sendo caracterizadas em cinco tipos distintos: abdome volumoso (B); asas infladas (C), dobradas (D), enroladas (E) e atrofiadas (F) (Figura 24).

A presença de abdome volumoso tem sido relatada por alguns autores em criações "in vitro" de outras espécies de *Trichogramma* (LI, 1982; STRAND & VINSON, 1985; XIE *et al.*, 1986a). Esta característica tem sido atribuída ao consumo excessivo do meio artificial, que é acumulado no interior do trato digestivo desses parasitóides durante o período pré-imaginal, e eliminado logo após a emergência do adulto. A ingestão excessiva de um substrato alimentar pode ocorrer devido à necessidade do inseto acumular certos nutrientes em seus tecidos, pela baixa concentração desses componentes no substrato alimentar (SLANSKY & SCRIBER, 1985).

As deformações de asas encontradas para *T. pretiosum* e *T. galloi* criadas "in vitro", parecem estar relacionadas mais aos fatores físicos do ambiente de criação, do que à qualidade nutricional do meio artificial utilizado. GROSS (1988) relatou o efeito negativo de altos valores de umidade relativa na emergência e no número de adultos normais de *T. pretiosum*. Esse autor descreveu que o número de insetos braquípteros aumentava quando *T. pretiosum* era criado em ambiente com umidade relativa superior a 80% ou inferior a 40%, atingindo valores de 94,3% de

Figura 22. Curvas de sobrevivência de fêmeas de *T. galloei* criadas "in vivo" e "in vitro", parasitando ovos de *A. kuehniella* Temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase 14h. Valores calculados pela distribuição de Weibull.

adultos com asas deformadas em 100% de umidade relativa. Resultados idênticos foram apresentados por CONSOLI *et al.* (n. publ.) criando *T. galloi* em ambientes com umidade relativa variável. Os resultados apresentados por esses autores demonstraram um alongamento no período ovo-adulto, redução na emergência e aumento no número de adultos com asas deformadas, em ambientes com umidade relativa inferior ou superior a 90%. As deformações de asas descritas por estes autores são semelhantes às aquelas apresentadas neste trabalho, quando *T. pretiosum* e *T. galloi* foram criados em dieta artificial (Figura 24).

A umidade excessiva no interior dos recipientes de criação "in vitro" de *T. pretiosum* também afetou a emergência dos adultos desse parasitóide, que apresentaram dificuldade para a eliminação da cutícula da pupa, que permanecia aderida à região anal do adulto recém-emergido, impedindo-o de expelir o mecônio, levando o inseto à morte (STRAND & VINSON, 1985).

4.2.5 Preferência hospedeira de *T. galloi*

As respostas de *T. galloi* criado "in vivo" e "in vitro", nos testes de livre escolha foram dependentes da condição de criação utilizada, ocorrendo diferenças quanto a escolha do hospedeiro natural ou alternativo,

Os insetos criados em ovos de *D. saccharalis* e em dieta artificial preferiram parasitar ovos do hospedeiro natural. Estes resultados são semelhantes aos apresentados por SALES (1992), criando *T. galloi* em ovos de *D. saccharalis*. Este autor observou a preferência desse inseto por ovos do hospedeiro natural em relação aos ovos de dois hospedeiros alternativos, *A. kuehniella* e *Corcyra cephalonica* (Stainton). Os resultados indicaram que os insetos criados em dieta artificial foram atraídos de forma semelhante àqueles obtidos em ovos de *D. saccharalis*.

As diferenças quanto à preferência hospedeira de *T. galloi* podem ter ocorrido devido ao condicionamento do parasitóide aos estímulos do primeiro contato. Essas alterações no comportamento de seleção hospedeira ocorrem devido ao contato prévio com diversos estímulos, que funcionam como fonte de "aprendizado" para o inimigo natural (VINSON, 1984).

Estes estímulos podem ser gerados por cairomônios presentes nas escamas dos insetos hospedeiros, que exercem forte atração e aumentam a eficiência de

Figura 23. Esquema da estrutura normal do aparelho reprodutor de fêmeas de *T. pretiosum* e *T. galloi*.

Figura 24. Deformações de asas e abdome de adultos de *T. pretiosum* e *T. galloi* criados "in vitro". A- adulto normal; B- abdome volumoso; C- asas infladas; D- asas dobradas; E- asas enroladas; F- asas atrofiadas,

procura do hospedeiro por espécies de *Trichogramma* (GROSS *et al.*, 1975; NORDLUND *et al.*, 1976). No entanto, a resposta a estes caíromônios parece ser variável conforme a espécie de hospedeiro utilizada (LEWIS *et al.*, 1976; THOMPSON & STINNER, 1990). Assim, ZABORSKI *et al.* (1987) verificaram que adultos de *T. minutum* responderam ao extrato de escamas do hospedeiro natural, *Choristoneura fumiferana* (Clem.), enquanto não ocorreu resposta para os extratos com escamas do hospedeiro alternativo, *S. cerealella*.

Tabela 12. Número de ovos de *D. saccharalis* e *A. kuehniella* parasitados por *T. galloi*, criado "in vivo" e "in vitro", em testes de livre escolha. Temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase 14 horas.

Hospedeiro	<i>D. saccharalis</i>	<i>A. kuehniella</i>
	Parasitismo (ovos/fêmea)* [$\bar{x} \pm s(\bar{x})$]	Parasitismo (ovos/fêmea)* [$\bar{x} \pm s(\bar{x})$]
<i>D. saccharalis</i>	41,33 $\pm$ 4,40a**	9,02 $\pm$ 3,72 b***
<i>A. kuehniella</i>	13,71 $\pm$ 4,00 b	31,24 $\pm$ 4,31a
DLHZ****	24,75 $\pm$ 8,32a	13,25 $\pm$ 7,38 b

*. Médias seguidas pela mesma letra, dentro de uma mesma linha, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Qui-quadrado ($p < 0,05$).

**. Valores corrigidos pelo fator de correção 1,98.

***. Valores corrigidos pelo fator de correção 1,14.

****. Dieta artificial composta de hemolinfa de lagartas de *H. zea*.

Estes resultados podem indicar que os estímulos presentes em ovos de *A. kuehniella* são insuficientes para permitir que *T. galloi* apresente o mesmo comportamento ocorrido em ovos de *D. saccharalis* a menos que estes insetos sejam criados no hospedeiro alternativo, sofrendo, desta forma, um condicionamento por ovos desse hospedeiro, conforme observações anteriores de ZABORSKI *et al.* (1987).

4.3 Análise de aminoácidos

As análises de aminoácidos da hemolinfa de lagartas de *H. zea* e *B. mori*, holotécidos pupais de *B. mori*, *A. gemmatilis* e *D. saccharalis* e ovos de *D. saccharalis*, *H. virescens* e *A. kuehniella* demonstraram haver semelhança qualitativa entre estes vários componentes (Tabela 13). Em todos os casos ocorrem 18 aminoácidos, sendo encontrados os 10 aminoácidos essenciais (lisina, histidina, arginina, triptofano, treonina, valina, metionina, isoleucina, leucina e fenilalanina) em todos os materiais analisados. Apesar das diferenças quantitativas encontradas, as proporções entre os aminoácidos, para cada componente, mantiveram-se praticamente constantes (Tabela 14).

Em termos quantitativos, os ovos de *A. kuehniella* apresentaram maior quantidade total de aminoácidos livres, por mililitro de amostra, do que os ovos de *D. saccharalis* e *H. virescens*. Para os demais componentes analisados, os holotécidos pupais de *D. saccharalis* apresentaram a menor quantidade total de aminoácidos livres (250,3547 $\mu\text{mol/ml}$), em relação aos demais, que apresentaram valores superiores a 400 $\mu\text{mol/ml}$ (Tabela 13).

Uma análise comparativa entre os componentes utilizados como fonte protéica na confecção das dietas artificiais (hemolinfa e holotécidos) e os ovos dos hospedeiros naturais de *T. galloi* e *T. pretiosum*, revelou que todos os componentes utilizados apresentavam quantidades de aminoácidos superiores às encontradas nos ovos dos hospedeiros naturais desses insetos (Tabelas 15 e 16), com exceção dos holotécidos pupais de *D. saccharalis* que apresentavam quantidades inferiores de histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, metionina e tirosina, em relação aos ovos de *D. saccharalis* (Tabela 15).

A análise comparativa entre os ovos de *D. saccharalis* e *H. virescens* hospedeiros naturais de *T. galloi* e *T. pretiosum*, respectivamente, e os ovos do hospedeiro alternativo, indicou a existência de diferenças entre esses insetos (Tabelas 15 e 16). Os ovos de *A. kuehniella* apresentaram quantidades inferiores de arginina, triptofano, ácido aspártico, alanina, tirosina e fenilalanina, em relação aos ovos do hospedeiro natural de *T. galloi* e ácido glutâmico, em relação aos ovos de *H. virescens* hospedeiro natural de *T. pretiosum*.

Apesar das análises terem revelado quantidades elevadas de aminoácidos livres na hemolinfa de lagartas e holotécidos de pupas, o desenvolvimento de *T. galloi* e *T. pretiosum*, em dietas artificiais compostas por esses elementos, foi inferior ao obtido

Tabela 13. Composição ($\mu\text{mol/ml}$) de aminoácidos livres dos diversos componentes de insetos utilizados nas dietas artificiais de *T. galloi* e *T. pretiosum*, e de ovos dos hospedeiros naturais e alternativo.

Aminoácido	ODS	OHV	OAK	HLHZ	HLBM	HPBM	HPDS	HPAG
lisina	9,867	8,456	11,794	38,859	32,445	25,620	13,020	20,000
histidina	11,083	5,333	13,406	18,270	22,050	21,980	9,030	20,450
arginina	13,400	5,160	12,286	20,160	17,430	12,800	10,290	16,350
triptofano	0,870	0,510	0,465	3,265	7,014	4,087	1,462	7,143
ác. aspártico	18,183	9,053	16,361	53,129	51,187	36,050	14,881	52,750
treonina	6,500	4,193	7,013	21,314	20,160	19,250	8,358	17,910
serina	12,850	11,540	16,367	25,515	20,160	20,300	14,715	14,437
ác. glutâmico	30,783	27,203	44,412	75,337	51,712	46,900	26,808	52,894
prolina	4,617	5,553	6,002	29,504	18,572	12,950	12,202	19,500
glicina	11,375	7,053	16,361	32,549	32,602	38,850	24,725	31,950
alanina	14,550	5,600	12,856	29,189	31,710	30,800	17,108	25,337
cistina	1,650	1,617	2,407	4,300	3,075	5,250	2,433	3,150
valina	7,167	4,160	8,404	32,759	28,245	24,500	9,483	32,612
metionina	7,167	4,007	12,005	11,130	20,790	27,300	6,299	17,587
isoleucina	4,800	2,240	6,003	17,220	17,535	14,525	6,275	19,750
leucina	6,500	4,640	7,206	31,919	32,760	22,050	11,497	34,187
tirosina	11,750	4,800	7,205	32,339	25,305	20,300	10,643	29,750
fenilalanina	5,200	2,720	4,801	21,945	27,300	17,850	5,203	24,687
Total	178,311	113,839	205,255	494,702	460,054	401,362	204,434	440,417

ODS= ovos de *D. saccharalis* OHV= ovos de *H. virescens* OAK= ovos de *A. kuehniella*
 HLHZ= hemolinfa de lagartas de *H. zea* HLBM= hemolinfa de lagartas de *B. mori* HPBM=
 holotecidos de pupas de *B. mori* HPDS= holotecidos de pupas de *D. saccharalis* HPAG=
 holotecidos de pupas de *A. gemmatalis*

Tabela 14. Proporção (%) entre os aminoácidos livres dos diversos componentes de insetos utilizados nas dietas artificiais de *T. galloi* e *T. pretiosum*, e de ovos dos hospedeiros naturais e alternativo.

Aminoácido	ODS	OHV	OAK	HLHZ	HLBM	HPBM	HPDS	HPAG
lisina	5,5	7,4	5,7	7,0	7,0	6,4	6,4	4,5
histidina	6,2	4,7	6,5	3,7	4,8	5,5	4,4	4,6
arginina	7,5	4,5	6,0	4,1	3,8	3,2	5,0	3,7
triptofano	0,4	0,4	0,2	0,6	1,5	1,0	0,7	1,6
ác. aspártico	10,2	7,9	8,0	10,7	11,1	9,0	7,3	12,0
treonina	3,6	3,7	3,4	4,3	4,4	4,8	4,1	4,1
serina	7,2	10,1	8,0	5,1	4,4	5,1	7,2	3,3
ác. glutâmico	17,3	23,9	21,6	15,2	11,2	11,7	13,1	12,0
prolina	2,6	4,9	2,9	6,0	4,0	3,2	6,0	4,4
glicina	6,4	6,2	8,0	6,6	7,1	9,7	12,1	7,2
alanina	8,2	4,9	6,3	5,9	6,9	7,7	8,4	5,7
cistina	0,9	1,4	1,2	0,9	0,7	1,3	1,2	0,7
valina	4,0	3,5	4,1	6,6	6,1	6,1	4,6	7,4
metionina	4,0	3,5	5,8	2,2	4,5	6,8	3,1	4,0
isoleucina	2,7	2,0	2,9	3,5	3,8	3,6	3,1	4,5
leucina	3,6	4,1	3,5	6,4	7,1	5,5	5,6	7,8
tirosina	6,6	4,2	3,5	6,5	5,5	5,1	5,2	6,7
fenilalanina	2,9	2,4	2,3	4,4	5,9	4,4	2,5	5,6
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

ODS= ovos de *D. saccharalis* OHV= ovos de *H. virescens* OAK= ovos de *A. kuehniella*
 HLHZ= hemolinfa de lagartas de *H. zea* HLBM= hemolinfa de lagartas de *B. mori* HPBM=
 holotécidos de pupas de *B. mori* HPDS= holotécidos de pupas de *D. saccharalis* HPAG=
 holotécidos de pupas de *A. gemmatilis*

quando esses insetos foram criados "in vivo". Esses resultados, associados àqueles apresentados em dietas compostas por hemolinfa de lagartas de *H. zea* ou *B. mori* ou holotécidos de pupas de *B. mori* indicam que, apesar desses componentes apresentarem semelhança qualitativa e quantitativa de aminoácidos livres, deve ocorrer uma variação qualitativa nas suas proteínas. Estes aminoácidos poderiam formar proteínas com estruturas diferentes, não metabolizadas pelo processo digestivo desses parasitóides.

4.4 Análise de proteínas totais através de eletroforese

As análises eletroforéticas realizadas indicaram a presença de diferentes frações protéicas para os diversos componentes de insetos estudados, tais como ovos de *D. saccharalis*, *H. virescens* e *A. kuehniella*, hemolinfa de lagartas de *H. zea* e *B. mori* e holotécidos pupais de *B. mori*, *A. gemmatilis* e *D. saccharalis*. Essas frações protéicas diferiram quanto à sua intensidade e deslocamento no gel de poliacrilamida (Figura 25).

Figura 25. Eletrofotograma dos diversos componentes de insetos utilizados nas dietas artificiais de *T. galloi* e *T. pretiosum*, e de ovos dos hospedeiros naturais e alternativo. (1= ovos de *D. saccharalis*, 2= ovos de *H. virescens*, 3= ovos de *A. kuehniella*, 4= lagartas de *H. zea*, 5= lagartas de *B. mori*, 6= pupas de *B. mori*, 7= pupas de *D. saccharalis* e 8= pupas de *A. gemmatilis*). A seta indica o sentido do deslocamento no gel de poliacrilamida.

Tabela 15. Análise comparativa entre os diversos componentes de insetos utilizados nas dietas artificiais e os ovos de *D. saccharalis* hospedeiro natural de *T. galloi*.

Aminoácido	ODS	OAK	HLHZ	HLBM	HPBM	HPDS	HPAG
lisina	1,0	1,2	3,5	3,3	2,6	1,3	2,0
histidina	1,0	1,2	1,6	2,0	2,0	0,8	1,8
arginina	1,0	0,9	1,5	1,3	0,9	0,8	1,2
triptofano	1,0	0,5	3,7	8,1	4,7	1,7	8,2
ác. aspártico	1,0	0,9	2,9	2,8	2,0	0,8	2,9
treonina	1,0	1,1	3,3	3,1	3,0	1,3	2,7
serina	1,0	1,3	2,0	1,6	1,6	1,1	1,1
ác. glutâmico	1,0	1,4	2,4	1,7	1,5	0,9	1,7
prolina	1,0	1,3	6,4	4,0	2,8	2,6	4,2
glicina	1,0	1,4	2,9	2,9	3,4	2,2	2,8
alanina	1,0	0,9	2,0	2,2	2,1	1,8	1,7
cistina	1,0	1,4	2,8	1,9	3,2	1,5	1,9
valina	1,0	1,2	4,8	3,9	3,4	1,3	4,5
metionina	1,0	1,7	1,5	2,9	3,8	0,9	2,4
isoleucina	1,0	1,2	3,6	3,6	3,0	1,3	4,1
leucina	1,0	1,1	4,9	5,0	3,4	1,8	5,2
tirosina	1,0	0,6	2,7	2,1	1,7	0,9	2,5
fenilalanina	1,0	0,9	4,2	5,2	3,4	1,0	4,7

ODS= ovos de *D. saccharalis* OAK= ovos de *A. kuehniella* HLHZ= hemolinfa de lagartas de *H. zea* HLBM= hemolinfa de lagartas de *B. mori* HPBM= holotecidos de pupas de *B. mori* HPDS= holotecidos de pupas de *D. saccharalis* HPAG= holotecidos de pupas de *A. gemmatalis*

Tabela 16. Análise comparativa entre os diversos componentes utilizados nas dietas artificiais e os ovos de *H. virescens* hospedeiro natural de *T. pretiosum*

Aminoácido	OHV	OAK	HLHZ	HLBM	HPBM	HPDS	HPAG
lisina	1,0	1,4	4,1	3,8	3,2	1,5	2,4
histidina	1,0	2,5	3,4	4,1	4,1	1,7	3,8
arginina	1,0	2,4	3,9	3,4	2,5	2,0	3,2
triptofano	1,0	0,9	6,4	13,7	8,0	2,9	14,0
ác. aspártico	1,0	1,8	5,9	5,6	4,0	1,6	5,8
treonina	1,0	1,7	5,1	4,8	4,6	2,0	4,3
serina	1,0	1,4	2,2	1,7	1,7	1,3	1,2
ác. glutâmico	1,0	1,6	2,8	1,9	1,7	0,9	1,9
prolina	1,0	1,1	5,3	3,3	2,3	2,2	3,5
glicina	1,0	2,3	4,6	4,6	5,5	3,5	4,5
alanina	1,0	2,3	5,2	5,7	5,5	3,0	4,5
cistina	1,0	1,5	2,6	1,9	3,2	1,5	1,9
valina	1,0	2,0	7,9	6,8	5,9	2,3	7,8
metionina	1,0	3,0	2,8	5,2	6,8	1,6	4,4
isoleucina	1,0	2,7	7,7	7,8	6,5	2,8	8,8
leucina	1,0	1,5	6,9	7,1	4,7	2,5	7,4
tirosina	1,0	1,5	6,7	5,3	4,2	2,2	6,2
fenilalanina	1,0	1,8	8,1	10,0	6,6	1,9	9,1

OHV= ovos de *H. virescens* OAK= ovos de *A. kuehniella* HLHZ= hemolinfa de lagartas de *H. zea* HLBM= hemolinfa de lagartas de *B. mori* HPBM= holotécidos de pupas de *B. mori* HPDS= holotécidos de pupas de *D. saccharalis* HPAG= holotécidos de pupas de *A. gemmatilis*

Foram identificadas 9, 6, 8, 19, 13, 9, 9 e 8 frações protéicas para os ovos de *D. saccharalis* ovos de *H. virescens* ovos de *A. kuehniella* lagartas de *H. zea* lagartas e pupas de *B. mori* pupas de *D. saccharalis* e *A. gemmatilis* respectivamente.

Estes resultados confirmam que, apesar da semelhança quantitativa de aminoácidos livres encontrada entre alguns dos componentes analisados, a sua composição protéica pode ser variável. Estes resultados facilitarão o aprimoramento das dietas artificiais desenvolvidas para a criação de *T. galloi* e *T. pretiosum*, mas sugerem ainda, estudos mais adequados para a separação e identificação das diversas frações protéicas encontradas, como também, avaliações da digestibilidade dessas proteínas e dos níveis de atividade enzimática dos parasitóides estudados.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos na presente pesquisa são bastante promissores, sendo superiores aos encontrados nos EUA e França, e comparáveis aos melhores resultados obtidos na China, único país a dominar a técnica de produção massal de inimigos naturais "in vitro".

Foram obtidas diferentes respostas para as duas espécies de parasitóides estudadas, sendo possível criá-las com proporções variáveis dos diversos componentes utilizados. As dietas foram compostas de 70% de hemolinfa de lagartas de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850), 20% de gema-de-ovo, 10% de soro fetal bovino e 0,2% de estreptomicina para *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988, e de 70% de hemolinfa de lagartas de *H. zea*, 10% de gema-de-ovo, 5% de soro fetal bovino, 5% de homogeneizado de ovos de *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) para *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879.

A utilização de outros componentes de insetos, como a hemolinfa de lagartas de *B. mori* ou holotécidos pupais de *B. mori*, *A. gemmatilis* e *D. saccharalis*, não permitiram o completo desenvolvimento desses parasitóides em dietas artificiais, exceto as dietas contendo holotécidos pupais de *B. mori*, que possibilitaram reduzido desenvolvimento de *T. pretiosum* até a fase adulta.

Os adultos produzidos "in vitro" apresentaram menor fecundidade e longevidade em relação aos insetos criados "in vivo", além de apresentarem um grande número de adultos com asas e abdome deformados. Embora sejam menos fecundos, os insetos criados em dieta artificial demonstraram aparelho reprodutor sem deformações e tamanho semelhante àqueles criados "in vivo". Também o comportamento de seleção hospedeira de *T. galloi*, criado em dieta artificial, foi semelhante ao do inseto produzido em ovos do hospedeiro natural.

Os componentes de insetos utilizados no preparo das dietas artificiais diferiram quantitativamente na sua composição de aminoácidos livres e no padrão eletroforético de suas frações protéicas.

Desta forma, pequenos ajustes nas dietas artificiais possibilitarão avanços na pesquisa, como o desenvolvimento de uma película artificial ("ovo" artificial), que permita desde o parasitismo até a emergência do adulto em um único substrato, etapa fundamental para a implementação de um sistema de criação de parasitóides em dietas artificiais, visando a sua liberação em condições de campo.

6. CONCLUSÕES

1. É possível a criação "in vitro" de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 e *T. pretiosum* Riley, 1879;
2. Suspensões de leite em pó são componentes dispensáveis ao desenvolvimento e crescimento de *T. galloi* e *T. pretiosum*;
3. A gema-de-ovo é essencial ao desenvolvimento de *T. galloi* e *T. pretiosum*;
4. Altas concentrações de hemolinfa aumentam a viabilidade larval e pupal desses parasitóides, sendo que a hemolinfa isoladamente não permite o desenvolvimento desses parasitóides;
5. O homogeneizado de ovos de *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) aumenta a viabilidade do período ovo-adulto e formação de pupas e adultos normais de *T. pretiosum*;
6. Lâminas escavadas são mais adequadas como substrato para o acondicionamento da dieta, para um volume de dieta entre 3 e 4 µl;
7. A proporção ideal de hemolinfa, gema-de-ovo, soro fetal bovino, homogeneizado de ovos de *H. virescens* e anticontaminante da dieta artificial de *T. pretiosum* é 70:20:5:5:0,2;
8. A proporção ideal de hemolinfa, gema-de-ovo, soro fetal bovino e anticontaminante, da dieta artificial de *T. galloi* é 70:20:10:0,2;
9. A hemolinfa de lagartas de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) é a mais adequada para a utilização em dietas artificiais de *T. galloi* e *T. pretiosum*;
10. *T. galloi* e *T. pretiosum*, criados "in vitro", são menos fecundos e longevos que os insetos obtidos "in vivo";
11. Não há diferença no tamanho de *T. pretiosum* produzido "in vivo" e "in vitro";
12. *T. galloi* criado em ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) é maior que os insetos obtidos em ovos do hospedeiro alternativo e em dieta artificial;
13. Adultos de *T. galloi* e *T. pretiosum*, criados em dieta artificial, apresentam o abdome desproporcional em relação ao tamanho do corpo;
14. Não ocorrem deformações no aparelho reprodutor de fêmeas desses parasitóides, criadas "in vivo" e "in vitro";

15. Ocorrem deformações de asas e abdome de adultos de *T. galloi* e *T. pretiosum*, criados em dieta artificial;

17. A curva de sobrevivência de *T. galloi* e *T. pretiosum*, criados em meio natural e artificial, obedece a distribuição de Weibull, para ambos os hospedeiros utilizados, natural e alternativo;

18. A preferência hospedeira de *T. galloi* criado em dieta artificial é semelhante àquela do inseto obtido no hospedeiro natural;

19. Os diferentes valores biológicos obtidos para *T. galloi* e *T. pretiosum*, criados em dietas artificiais contendo diferentes componentes de insetos (hemolinfa ou holotécidos), estão relacionados às diferenças quantitativas de aminoácidos livres entre esses componentes;

20. As diferenças quantitativas de aminoácidos livres desses componentes estão relacionadas aos diferentes padrões eletroforéticos das suas frações protéicas .

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONZO, N. & HIRS, C.H.W. Automation of sample application in aminoacid analysers. **Analytical Biochemistry**, Washington, 23: 272-8, 1968.
- ARTHUR, A.P.; HEGDEKAR, B.M.; BATSCH, W.W. A chemically defined, synthetic medium that induces oviposition in the parasite *Itoplectis conquisitor* (Hymenoptera: Ichneumonidae). **The Canadian Entomologist**, Ottawa, 104(11): 1251-8, 1972.
- ARTHUR, A.P.; HEGDEKAR, B.M.; ROLLINS, L. Component of the host hemolymph that induces oviposition in a parasitic insect. **Nature**, London, 223: 968-7, 1969.
- AWUITOR, K.; MASSELOT, M.; TERSAC, J. In vitro rearing of *Pimpla instigator* (Hym.: Ichneumonidae) 2. Completion of development in semi-artificial conditions. **Entomophaga**, Paris, 29(3): 331-9, 1984.
- BATTISTI, A.; IANNE, P.; MILANI, N.; ZANATA, M. Preliminary accounts on the rearing of *Ooencyrtus pityocampae* (Mercet) (Hym., Encyrtidae). **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, 110: 121-7, 1990.
- BIGLER, F.; MEYER, A.; BOSSHART, S. Quality assessment in *Trichogramma maidis* Pintureau et Voegelé reared from eggs of the factitious hosts *Ephestia kuehniella* Zell. and *Sitotroga cerealella* (Olivier). **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, 104: 340-53, 1987.

- BLEICHER, E. & PARRA, J.R.P. Espécies de *Trichogramma* parasitóides de *Alabama argillacea* I. Biologia de três populações. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 24(8): 929-40, 1989.
- BLEICHER, E. & PARRA, J.R.P. Espécies de *Trichogramma* parasitóides de *Alabama argillacea* II. Tabela de vida de fertilidade e parasitismo de três populações. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 25(2): 207-14, 1990.
- BONNOT, G.; DELOBEL, B.; GRENIER, S. Elevage, croissance et developpement de *Phryxe caudata* (Diptera, Tachinidae) sur son hôte de substitution *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) et sur lilieu artificiel. *Société Linnéenne de Lyon*, Lyon, 53(9): 313-20, 1984.
- BOULETREAU, M. Premiers résultats de l'élevage des larves d'un hyménoptère chalcidien (*Pteromalus puparum* L.) sur hémolymph de lépidoptère. *Entomophaga*, Paris, 13(3): 217-22, 1968.
- BOULETREAU, M. Developpement et croissance larvaires en conditions semi-artificielles et artificielles chez un hyménoptère entomophage: *Pteromalus puparum* L. (Chalc.). *Entomophaga*, Paris, 17(3): 265-73, 1972.
- BRATTI, A. Tecniche di allevamento in vitro per gli stadi larvali di insetti entomofagi parassitoidi. *Bolletino dell Istituto di Entomologia "Guido Grandi" della Università di Bologna*, Bologna, 44: 169-220, 1990.
- BRATTI, A. & MONTI, M. Allevamento "in vitro" delle larve di *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Dipt. Tachinidae) su omogeneizzato di crisalidi di *Galleria mellonella* L. (Lep. Galleridae). *Bolletino dell Istituto di Entomologia "Guido Grandi" della Università di Bologna*, Bologna, 43: 115-28, 1988.

- BRATTI, A. & NETTLES Jr., W.C. In vitro rearing of *Palexorista laze* (Curran) (Diptera: Tachinidae) on haemolymph-based diets. *Bolletino dell Istituto di Entomologia "Guido Grandi" della Università di Bologna*, Bologna, 43: 25-30, 1989.
- BRATTI, A. & NETTLES Jr., W.C. In vitro rearing of *Eucelatoria bryani* improvements and evaluation of factors affecting efficiency. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Dordrecht, 63: 213-9, 1992.
- BREWER, J.M. & ASHWORTH, R.B. Disc eletrophoresis. *Journal of Chemical Education*, Easton, 46: 41-5, 1969.
- BRONSKILL, J.F. & HOUSE, H.L. Notes on rearing a pupal endoparasite, *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae), on unnatural food. *The Canadian Entomologist*, Ottawa, 89(10): 483, 1957.
- BRUCE, W.A. Artificial diet for the parasitic mite *Pyemotes litici* (Acari: Pyemotidae). *Experimental and Applied Acarology*, Amsterdam, 6(1): 11-8, 1989.
- BURTON, R. Mass rearing the corn earworm in the laboratory. Tifton, USDA/ Agricultural Research Service, 1969. 8p. (ARS 33-134).
- BUTT, B.A. & CANTU, E. Sex determination of lepidopterous pupae. Washington, USDA, 1962. 7p.
- CAMPADELLI, G. & DINDO, M.L. Recenti progressi nello studio delle diete artificiali per l'allevamento di insetti entomofagi parassiti. *Bolletino dell Istituto di Entomologia "Guido Grandi" della Università di Bologna*, Bologna, 42: 101-18, 1987.
- CAMPO, C.B.H.; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*). Londrina, EMBRAPA/CNPSo, 23p. (Documentos, 10). 1985.

- CÔNSOLI, F.L. & PARRA, J.R.P. Ciclo biológico e exigências térmicas de linhagens de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 criadas em diversos hospedeiros. In: Reunião Anual do Instituto Biológico, 5., São Paulo, 1992. **Resumos**. São Paulo, IB, 1992. p. 10.
- CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; MONTEIRO, R.C.; ZUCCHI, R.A. Avanços na criação de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 "in vitro". In Congresso Brasileiro de Entomologia, 14., Piracicaba, 1993. **Resumos**. Piracicaba, SEB, 1993. p.356.
- DAI, K.J.; CAO, A.H.; LI, X.Y. Oxygen consumption of *Trichogramma dendrolimi*. **Journal of Wuhan University**, Beijing, 4: 169-77, 1982. (Em Chinês).
- 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*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TRICHOGRAMMA AND OTHER EGG PARASITES, 2., Guangzhou, 1986. Paris, INRA, 1988. p. 311-8. (Les Colloques de l'INRA, 43).
- DAI, K.J.; MA, Z.J.; ZHANG, L.W.; CAO, A.H. Utilization of artificial host egg-wasps for control of insect pest in agriculture and forestry. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 19., Beijing, 1992. **Proceedings**. Beijing, China, 1992. p. 191.
- DINDO, M.L. Alcune osservazioni sulla biologia di *Brachymeria intermedia* (Nees) (Hym. Chalcididae) in vivi e in vitro. **Bolletino dell Istituto di Entomologia "Guido Grandi" della Università di Bologna**, Bologna, 44: 221-32, 1990.
- DINDO, M.L. & CAMPADELLI, G. Preliminary studies on the artificial culture of *Brachymeria intermedia* (Nees) (Hym. Chalcididae) on oligidic diets. **Bolletino dell Istituto di Entomologia "Guido Grandi" della Università di Bologna**. Bologna, 46: 93-9, 1992.
- FANTI, P. Fattori ormonali inducenti la prima muta larvale del parassitoide *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Diptera Tachinidae) in substrati di crescita in vivo e in vitro.

Bolletino dell Istituto di Entomologia "Guido Grandi" della Università di Bologna, Bologna, 45: 47-59, 1990.

FANTI, P. & BRATTI, A. In vitro rearing of the larval stages of the parasitoid *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Diptera Tachinidae): Preliminary results. *Redia*, Perugia, 74(3): 449-52, 1991.

GAO, Y.G.; KAIJIA, D.J.; SHONG, L.S. Studies on the artificial host egg for *Trichogramma* In INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TRICHOGRAMMA AND OTHER EGG PARASITES, 1., Antibes, 1982. Paris, INRA, 1982. p. 181. (Les Colloques de l'INRA, 9).

GOODENOUGH, J.L.; HARSTACK, A.W.; KING, E.G. Developmental models for *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) reared on four hosts. *Journal of Economic Entomology*, Lanham, 76: 1095-102, 1983.

GREANY, P. In vitro culture of hymenopterous larval endoparasitoids. *Journal of Insect Physiology*, Oxford, 32(4): 409-19, 1986.

GREENE, G.L.; LEPPA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, Lanham, 69(4): 487-8, 1976.

GRENIER, S. Effects nocifs de la Nipagine M sur le parasitoïde *Phryxe caudata* (Dipt.: Tachinidae). *Entomophaga*, Paris, 22(2): 223-6, 1977.

GRENIER, S. Developpement embryonnaire in vitro, en milieu artificiel defini de deux parasitoïdes ovarvipares, *Phryxe caudata* et *Lixophaga diatraeae* (Diptera, Tachinidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Amsterdam, 26(1): 13-23, 1979.

- GRENIER, S. & BONNOT, G. Development of *Trichogramma dendrolimi* and *T. maidis* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) in artificial media and artificial host eggs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TRICHOGRAMMA AND OTHER EGG PARASITES, 2., Guangzhou, 1986. Paris, INRA, 1988. p. 319-26. (Les Colloques de l'INRA, 43).
- GRENIER, S. & LIU, W.H. Antifungals: mold control and safe levels in artificial media for *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Entomophaga*, Paris, 35(2): 283-91, 1990.
- GRENIER, S.; BONNOT, G.; DELOBEL, B. Définition et mise au point de milieux artificiels pour l'élevage in vitro de *Phryxe caudata* Rond. (Dipetra Tachinidae) I. Survie du parasitoïde sur milieux dont la composition est basée sur celle de l'hémolymph de l'hôte. *Annales de Zoologie Ecologie Animale*, Paris, 6(4): 511-20, 1974.
- GRENIER, S.; BONNOT, G.; DELOBEL, B. Définition et mise au point de milieux artificiels pour l'élevage in vitro de *Phryxe caudata* Rond. (Dipetra Tachinidae) II. Croissance et mues larvaires du parasitoïde en milieux définis. *Annales de Zoologie Ecologie Animale*, Paris, 7(1): 13-25, 1975.
- GRENIER, S.; DELOBEL, B.; BONNOT, G. Physiological considerations of importance to the success of in vitro culture: an overview. *Journal of Insect Physiology*, Oxford, 32(4): 403-8, 1986.
- GRENIER, S.; VEITH, V.; RENOU, M. Some factors stimulating oviposition by the oophagus parasitoid *Trichogramma brassicae* Bezd. (Hym., Trichogrammatidae) in artificial host eggs. *Journal of Applied Entomology*, Hamburg, 115(1): 66-76, 1993.
- GRENIER, S.; BONNOT, G.; DELOBEL, B.; LAVIOLETTE, P. Développement en milieu artificiel du parasitoïde *Lixophaga diatraeae* (Townsend) (Diptera, Tachinidae). Obtention de l'imago à partir de l'oeuf. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, Paris, Série D, p. 535-8, 1978.

- GROSS, H.R. Effect of temperature, relative humidity, and free water on the number and normalcy of *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) emerging from eggs of *Heliothis zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, College Park, 17(3): 470-5, 1988.
- GROSS, H.R.; LEWIS, W.J.; JONES, R.L.; NORDLUND, D.A. Kairomones and their use for management of entomophagous insects: III. Stimulation of *Trichogramma achaeae*, *T. pretiosum*, and *Microplitis croceipes* with host-seeking stimuli at time of release to improve their efficiency. *Journal of Chemical Ecology*, New York, 1: 431-8, 1975.
- GUERRA, A.A. In vitro rearing of *Bracon mellitor* and *Catolaccus grandis* with different insect hemolymph-based diets. *The Southwestern Entomologist*, College Station, 17(2): 123-6, 1992.
- HAI, F.N.P. Histórico e situação atual da traça do tomateiro nos perímetros irrigados do submédio São Francisco. In: Simpósio de Controle Biológico, 3., Águas de Lindóia, 1992. *Resumos*. Águas de Lindóia, EMBRAPA, 1992. p. 57-59.
- HEGDEKAR, B.M. & ARTHUR, A.P. Host hemolymph chemicals that induce oviposition in the parasite *Itoplectis conquisitor* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *The Canadian Entomologist*, Ottawa, 105(5): 787-93, 1973.
- HIRS, C.H.W. Detection of peptides by chemical methods. *Methods in Enzymology*, New York, 11: 325-9, 1967.
- HOFFMAN, J.D. & IGNOFFO, C.M. Growth of *Pteromalus puparum* in a semisynthetic medium. *Annals of the Entomological Society of America*, Lanham, 67(3): 524- 5, 1974.
- HOFFMAN, J.D.; IGNOFFO, C.M.; DICKERSON, W.A. In vitro rearing of the endoparasitic wasp *Trichogramma pretiosum*. *Annals of the Entomological Society of America*, Lanham, 68(2): 335-6, 1975.

- HOFFMAN, J.D.; IGNOFFO, C.M.; LONG, S.H. In vitro cultivation of an endoparasitic wasp, *Pteromalus puparum*. *Annals of the Entomological Society of America*, Lanham, 6(3): 633-4, 1973.
- HOUSE, H.L. Nutritional studies with *Pseudosarcophaga affinis* (Fall.), a dipterous parasite of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) I. A chemically defined medium and aseptic-culture technique. *Canadian Journal of Zoology*, Ontario, 32(5): 331-41, 1954a.
- HOUSE, H.L. Nutritional studies with *Pseudosarcophaga affinis* (Fall.), a dipterous parasite of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) II. Effects of eleven vitamins on growth. *Canadian Journal of Zoology*, Ontario, 32(5): 342-50, 1954b.
- HOUSE, H.L. Nutritional studies with *Pseudosarcophaga affinis* (Fall.), a dipterous parasite of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) III. Effects of nineteen aminoacids on growth. *Canadian Journal of Zoology*, Ontario, 32(5): 351-7, 1954c.
- HOUSE, H.L. Nutritional studies with *Pseudosarcophaga affinis* (Fall.), a dipterous parasite of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.). *Canadian Journal of Zoology*, Ontario, 32(5): 358-65, 1954d.
- HOUSE, H.L. Nutritional diseases. In: STEINHAUS, E.A., ed. *Insect Pathology*. New York, Academic Press, 1963. vol. 1, p. 133-60.
- HOUSE, H.L. Effects of varying the ratio between the amino acids and the other nutrients in conjunction with a salt mixture on the fly *Agria affinis* (Fall). *Journal of Insect Physiology*, Oxford, 12(3): 299-310, 1966.

- HOUSE, H.L. An artificial host: encapsulated synthetic medium for in vitro oviposition and rearing the endoparasitoid *Itoplectis conquisitor* (Hymenoptera: Ichneumonidae). **The Canadian Entomologist**, Ottawa, **110**(3): 331-3, 1978.
- HOUSE, H.L. & BARLOW, J.S. Effects on the parasitoid *Agria affinis* (Fall.) (Diptera: Sarcophagidae) of small molecules in diets. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, **10**(3): 255-60, 1964.
- HOUSE, H.L. & TRAER, M.S. An artificial food for rearing *Pseudosarcophaga affinis* (Fall.), a parasite of the spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clem.). **Report of the Entomological Society of Ontario**, Toronto, **79**: 50-3, 1948.
- IRIE, K.; XIE, Z.N.; NETTLES, W.C.Jr.; MORRISON, R.K.; CHEN, A.C.; HOLMAN, G.M.; VINSON, S.B. The partial purification of a *Trichogramma pretiosum* pupation factor from hemolymph of *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry**, London, **17**(3): 269-75, 1987.
- KAZMER, D.J. & LUCK, R.F. Female body size, fitness and biological control quality: field experiments with *Trichogramma pretiosum*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TRICHOGRAMMA AND OTHER EGG PARASITIDS, 3., San Antonio, 1990. Paris, INRA, 1991. p. 37-40. (Les Colloques de l'INRA, 56).
- KING, E.G. Introduction talk. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TRICHOGRAMMA AND OTHER EGG PARASITIDS, 3., San Antonio, 1990. Paris, INRA, 1991. p. 17-8. (Les Colloques de l'INRA, 56).
- LEWIS, W.P.J.; NORDLUND, D.A.; GROSS Jr., H.R.; PERKINS, W.D.; KNIPLING, E.F.; VOEGELE, J. Production and performance of *Trichogramma* reared on eggs of *Heliothis zea* and other hosts. **Environmental Entomology**, Lanham, **5**(3): 449-52, 1976..
- LI, L.Y. *Trichogramma* sp. and their utilization in People's Republic of China. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TRICHOGRAMMA AND OTHER EGG PARASITES, 1., Antibes, 1982. Paris, INRA, 1982. p. 23-9. (Les Colloques de l'INRA, 9).

- LI, L.Y. Mass production of *Trichogramma* spp and *Anastatus japonicum* Ashmead with artificial diets in China. In: FFTC-NARC INTERNATIONAL SEMINAR ON "THE USE OF PARASITOIDS AND PREDATORS TO CONTROL AGRICULTURAL PESTS", Tsukuba, 1989. Proceedings. s.n. s.d.
- LI, L.Y.; LIU, W.H.; CHEN, C.S.; HAN, S.T.; SHIN, J.C.; DU, H.S.; FENG, S.Y. In vitro rearing of *Trichogramma* spp. and *Anastatus* sp. in artificial eggs and the methods of mass production. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TRICHOGRAMMA AND OTHER EGG PARASITES, 2., Guangzhou, 1986. Paris, INRA, 1988. p. 339-52. (Les Colloques de l'INRA, 43).
- LOPES, J.R.S. Estudos bioetológicos de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hym., Trichogrammatidae) para o controle de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lep., Pyralidae). Piracicaba, 1988. 141p. Dissertação de Mestrado, ESALQ/USP.
- LUCAS, B. & SOTELO, A. Effect of different alkalis, temperature, and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. *Analytical Biochemistry*, Washington, 109: 192-7, 1980.
- MACEDO, N.; BOTELHO, P.S.M.; DEGASPARI, N.; ALMEIDA, L.C.; ARAÚJO, J.R.; MAGRINI, E.A. Controle biológico da broca da cana-de-açúcar. Piracicaba, IAA/PLANALSUCAR, 1983. 22p.
- MARSTON, N. & ERTLE, L.R. Host influence on the bionomics of *Trichogramma minutum*. *Annals of the Entomological Society of America*, Lanham, 66(5): 1155-62, 1973.
- MASUTTI, L.; SLAVAZZA, A.; BATTISTI, A. Oviposition of *Ooencyrtus pityocampae* (Mercet) into artificial eggs (Hym., Encyrtidae). *Redia*, Perugia, 74(3): 457-62, 1991.
- MASUTTI, L.; BATTISTI, A.; MILANI, N.; ZANATA, M. First success in the in vitro rearing of *Ooencyrtus pityocampae* (Mercet) (Hym. Encyrtidae). Preliminary note. *Redia*, Perugia, 75(1): 227-32, 1992.

- MELLINI, E. Possibilità di allevamento di insetti entomofagi parassiti su diete artificiali. *Bollettino dell'Istituto di Entomologia "Guido Grandi" della Università di Bologna*, Bologna, 32: 257-90, 1975.
- MELLINI, E. & CAMPADELLI, G. Prove di incubazione extrauterine e di schiusa delle uova microtipiche di *Pseudogonia rufifrons* Wied.. *Bollettino dell'Istituto di Entomologia "Guido Grandi" della Università di Bologna*, Bologna, 43: 105-13, 1988.
- MORAES, G.W.G. de; BRUN, P.G.; SOARES, L.A. Insetos x insetos - Nova alternativa para o controle de pragas. *Ciência Hoje*, Rio de Janeiro, 1(6): 70-7, 1983.
- MORRISON, R.K.; NETTLES Jr., W.R.; BALL, D.; VINSON, S.B. Successful oviposition by *Trichogramma pretiosum* through a synthetic membrane. *The Southwestern Entomologist*, College Station, 8(4): 248-51, 1983.
- MOUTIA, L.A. & COURTOIS, C.M. Parasites of mothbores of sugarcane in Mauritius. *Bulletin of the Entomological Research*, London, 43: 325-59, 1952.
- NETTLES, W.C.Jr. Asparagine: A host chemical essential for the growth and development of *Eucelatoria bryani*, a tachinid parasitoid of *Heliothis* spp. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Oxford, 85A(4): 697-701, 1986a.
- NETTLES, W.C.Jr. Effects of soy flour, bovine serum albumin, and three amino acid mixtures on growth and development of *Eucelatoria bryani* (Diptera: Tachinidae) reared on artificial diets. *Environmental Entomology*, College Park, 15(6): 1111-5, 1986b.
- NETTLES, W.C.Jr. Amino acid requirements for growth and development of the tachinid *Eucelatoria bryani*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Oxford, 86A(2): 349-54, 1987.

- NETTLES, W.C.Jr. In vitro rearing of parasitoids: role of host factors in nutrition. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, Oxford, 13: 167-75, 1990.
- NETTLES Jr., W.C.; WILSON, C.M.; ZISER, S.W. A diet and methods for the in vitro rearing of the tachinid, *Eucelatoria* sp. *Annals of the Entomological Society of America*, Lanham, 73(2): 180-84, 1980.
- NETTLES Jr., W.C.; MORRISON, R.K.; XIE, Z.N.; BALL, D.; SHENKIR, C.A.; VINSON, S.B. Synergistic action of potassium chloride and magnesium sulfate on parasitoid wasp oviposition. *Science*, Washington, 218: 164-6, 1982.
- NETTLES Jr., W.C.; MORRISON, R.K.; XIE, Z.N.; BALL, D.; SHENKIR, C.A.; VINSON, S.B. Effect of cations, anions and salt concentrations on oviposition by *Trichogramma pretiosum* in wax eggs. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Dordrecht, 33(3): 283-89, 1983.
- NETTLES Jr., W.C.; MORRISON, R.K.; XIE, Z.N.; BALL, D.; SHENKIR, C.A.; VINSON, S.B. Effect of artificial diet media, glucose, protein hydrolyzates and other factors on oviposition in wax eggs by *Trichogramma pretiosum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Dordrecht, 38(1): 121-9, 1985.
- NORDLUND, D.A.; LEWIS, W.J.; JONES, R.L.; GROSS, H.R. Kairomones and their use for management of entomophagous insects. IV. Effect of kairomones on productivity and longevity of *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Journal of Chemical Ecology*, New York, 2: 67-72, 1976.
- PARRA, J.R.P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: ALVES, S.A., ed. *Controle Microbiano de Insetos*. São Paulo, Editora Manole, 1986. p.348-373.
- PARRA, J.R.P. Situação atual e perspectivas do controle biológico, através de liberações inundativas, no Brasil. *Pesquisa Agrapecuária Brasileira*, Brasília, 27(s/n): 271-9, 1992.

- PARRA, J.R.P. & CÔNSOLI, F.L. In vitro rearing of *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879. *Ciência e Cultura*, Rio de Janeiro, 44(8): 407-9, 1992.
- PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; SILVEIRA NETO, S. Biological control of pests through egg parasitoids of the genera *Trichogramma* and/or *Trichogrammatoidea* In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INSECTS, 1., Rio de Janeiro, 1987. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 82(supl. 3): 153-60, 1987.
- PARRA, J.R.P.; LOPES, J.R.S.; SERRA, H.J.P.; SALES Jr., O. Metodologia de criação de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) para produção massal de *Trichogramma* spp. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Porto Alegre, 18(2): 403-5, 1989.
- PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; SILVEIRA NETO, S.; HADDAD, M.L. Biology and thermal requirements of *Trichogramma galloi* Zucchi and *T. distinctum* Zucchi, on two alternative hosts. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TRICHOGRAMMA AND OTHER EGG PARASITIDS, 3., San Antonio, 1990. p.81-4. Paris, INRA, 1991. (Les Colloques de l'Inra, 56).
- QIN, J. & WU, Z.X. Studies on cultivation of *Trichogramma* in vitro: ovipositional behaviour and larval nutritional requirements of *T. dendrolimi*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TRICHOGRAMMA AND OTHER EGG PARASITES, 2., Guangzhou, 1986. Paris, INRA, 1988. p. 379-87. (Les Colloques de l'INRA, 43).
- RAJENDRAM, G.F. Oviposition behavior of *Trichogramma californicum* on artificial substrates. *Annals of the Entomological Society of America*, Lanham, 71(1): 92-4, 1978a.
- RAJENDRAM, G.F. Some factors affecting oviposition of *Trichogramma californicum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in artificial media. *The Canadian Entomologist*, Ottawa, 110(4): 345-52, 1978b.

- RAJENDRAM, G.F. & HAGEN, K.S. *Trichogramma* oviposition into artificial substrates. *Environmental Entomology*, College Park, 3(3): 399-401, 1974.
- ROTUNDO, G.; CAVALLORO, R.; TREMBLAY, E. In vitro rearing of *Lysiphlebus fabarum* (Hym.: Braconidae). *Entomophaga*, Paris, 33(3): 261-7, 1988.
- SÁ, L.A.N. de Bioecologia de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, visando avaliar o seu potencial para controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) e *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) em milho. Piracicaba, 1991. 107p. Tese de Doutorado, ESALQ/USP.
- SÁ, L.A.N. & PARRA, J.R.P. Efeito do número e intervalo entre liberações de *Trichogramma pretiosum* Riley, no parasitismo e controle de *Helicoverpa zea* Boddie, em milho. In: Simpósio de Controle Biológico, 3., Águas de Lindóia, 1992. *Resumos*. Águas de Lindóia, EMBRAPA, 1992. p. 188.
- SALES Jr., O. Bioecologia de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 no hospedeiro natural *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) e em hospedeiros alternativos. Piracicaba, 1992. 97p. Tese de Doutorado, ESALQ/USP.
- SCRILLIO, R.B. A distribuição de Weibull como modelo de sobrevivência de insetos. *Ecossistema*, Espírito Santo do Pinhal, 7: 9-13, 1982.
- SHAPIRO, K. & IGNOFFO, C.M. Growth of *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) cells adapted to various culture media. *Annals of the Entomological Society of America*, Lanham, 66(2): 270-3, 1973.
- SINGH, P. & HOUSE, H.L. Antimicrobials: safe levels in a synthetic diet of an insect, *Agria affinis*. *Journal of Insect Physiology*, Oxford, 16: 1769-82, 1970.

- SLANSKY, F. & SCRIBER, J.M. Food consumption and utilization. In: KERKUT, G.A. & GILBERT, L.I., ed. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. New York, Pergamon Press, 1985. vol. 1, p. 81-164.
- SOHAL, R.S. Aging in insects. In: KERKUT, G.A. & GILBERT, L.I., ed.. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. New York, Pergamon Press, 1985. vol. 10, p.595-631.
- SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. *Analytical Chemistry*, Washington, 30(7): 1190-206, 1963.
- STEIN, C.P. & PARRA, J.R.P. Uso da radiação ultravioleta para inviabilizar ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) visando estudos com *Trichogramma* spp. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Porto Alegre, 16(1): 229-31, 1987.
- STRAND, M.R. & VINSON, S.B. In vitro culture of *Trichogramma pretiosum* on an artificial medium. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Dordrecht, 39(3): 203-9, 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*, Dordrecht, 48(1): 71-8, 1988.
- THOMPSON, M.S. & STINNER, R.E. The scale response of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): variation among species in host specificity and the effect of conditioning. *Entomophaga*, Paris, 35(1): 7-21, 1990.
- THOMPSON, S.N. Defined meridic and holidic diets and aseptic feeding procedures for artificially rearing the endoparasitoid *Exeristes roborator* (Fabricius). *Annals of the Entomological Society of America*, Lanham, 68(2): 220-6, 1975.

- THOMPSON, S.N. Artificial culture techniques for rearing larvae of the chalcidoid parasite, *Brachymeria intermedia*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Dordrecht, 27(2): 133-43, 1980.
- THOMPSON, S.N. Essential amino-acid requirements of four species of parasitic hymenoptera. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Oxford, 69A: 173-4, 1981a.
- THOMPSON, S.N. *Brachymeria lasus* culture in vitro of a chalcid insect parasite. *Experimental Parasitology*, San Diego, 52: 414-8, 1981b.
- THOMPSON, S.N. *Exeristes roborator*: Quantitative determination of in vitro larval growth rates in synthetic media with different glucose concentrations. *Experimental Parasitology*, San Diego, 54: 229-34, 1982.
- THOMPSON, S.N. Larval growth of the insect parasite *Brachymeria lasus* reared in vitro. *Journal of Parasitology*, Lancaster, 69(2): 425-7, 1983.
- THOMPSON, S.N. Nutrition and in vitro culture of insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*, Palo Alto, 31: 197-219, 1986.
- THOMPSON, S.N.; BEDNAR, L.; NADEL, H. Artificial culture of the insect parasite, *Pachycrepoideus vindemiae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Dordrecht, 33(1): 121-2, 1983.
- TILDEN, R.L. & FERKOVICH, S.M. Kairomonal stimulation of oviposition into an artificial substrate by the endoparasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Annals of the Entomological Society of America*, Lanham, 81(1): 152-6, 1988.
- VINSON, S.B. Parasitoid-host relationship. In: BELL, W.J. & CARDE, R.T., ed. *Chemical Ecology of Insect*. New York, Chapman & Hall Ltd., 1984. p. 205-233.

- 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*, Paris, 37(1): 141-8, 1992.
- XIE, Z.N.; NETTLES Jr., W.C.; MORRISON, R.K.; IRIE, K.; VINSON, S.B. Three methods for the in vitro culture of *Trichogramma pretiosum* Riley. *Journal of Entomological Science*, San Antonio, 21(2): 133-8, 1988a.
- 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*, Dordrecht, 42(1): 119-24, 1988b.
- YAZGAN, S. A chemically defined synthetic diet and larval nutritional requirements of the endoparasitoid *Itoplectis conquisitor* (Hymenoptera). *Journal of Insect Physiology*, Oxford, 18(12): 2123-41, 1972.
- YAZGAN, S. A meridic diet and quantitative effects of Tween 80, fatty acid mixtures and inorganic salts on development and survival of the endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. *Journal of Applied Entomology*, Hamburg, 91: 433-41, 1981.
- YAZGAN, S. & HOUSE, H.L. An hymenopterous insect, the parasitoid *Itoplectis conquisitor* reared axenically on a chemically defined synthetic diet. *The Canadian Entomologist*, 102(10): 1304-6, 1970.
- YE, Z.C. & WANG, R. Advance of biological control in China in the past decade. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 19., BEIJING, 1992. *Proceedings*. Beijing, 1992. p. 282.
- ZABORSKI, E.; TEAL, P.E.A.; LAING, J.E. Kairomone-mediated host-finding by spruce budworm egg parasite, *Trichogramma minutum*. *Journal of Chemical Ecology*, New York, 3: 113-22, 1987.

- ZHONG, L.S. & ZHANG, J.L. Influence of diet pH on the development and efficacy of reproduction of *Trichogramma confusum* (Hym.: Trichogrammatidae) in artificial rearings. *Chinese Journal of Biological Control*, Beijing, 5(3): 101-3, 1989. Apud: *Review of Agricultural Entomology*, 078-07508, 1990.
- ZHONG, L.S. & ZHANG, J.L. The effect of food dregs in pupa tissue of *Antheraea pernyi* on the development of *Trichogramma* and the treatment of the pupa tissue. In: *INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 19., BEIJING, 1992. Proceedings*. Beijing, 1992, p. 344.
- ZUCCHI, R.A. Taxonomia de espécies de *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae) associados a algumas pragas (Lepidoptera) no Brasil. Piracicaba, 1985. 77p. Tese de Livre Docência - ESALQ/USP.

ANEXOS

APENDICE 1. Dieta artificial utilizada na criação de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (BURTON, 1969).

COMPONENTES	QUANTIDADE
Feijão	112,00g
Levedura	34,10g
Germe de trigo	53,30g
Metil-paraidroxibenzoato (nipagin)	2,13g
Ácido sórbico	1,00g
Formaldeído 38%	8,53g
Água destilada	1026,60ml

APENDICE 2. Dieta artificial utilizada na criação de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (GREENE *et al.*, 1976).

COMPONENTES	QUANTIDADE
Água	3.400,00ml
Ágar	40,00g
Feijão	250,00g
Germe de trigo	200,00g
Caseína	75,00g
Levedura	125,00g
Ácido ascórbico	12,00g
Mistura vitamínica de Vanderzant	20,00ml
Tetraciclina	250,00g
Formaldeído 40%	12,00ml
Metil-paraidroxibenzoato (nipagin)	10,00g
Ácido sórbico	6,00g
Proteína de soja	100,00g

APENDICE 3. Dieta artificial utilizada na criação de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (MACEDO *et al.*, 1983).

COMPONENTES	QUANTIDADE
Germe de trigo	30,00g
Farelo de soja	108,00g
Açúcar	105,00g
Sais de Wesson	15,00g
Metil-paraidroxibenzoato (nipagin)	6,00g
Ácido ascórbico	3,75g
Cloreto de colina	0,75g
Formol 38%	1,50ml
Vita Gold®	0,75ml
Mistura vitamínica de Vanderzant	22,50ml
Wintomylon®	0,75ml
Ágar	22,50g
Água destilada	1800,00ml