

**CRIAÇÃO *IN VITRO* DE *Trichogramma galloi* ZUCCHI, 1988 E
T. pretiosum RILEY, 1879 (HYM.: TRICHOGRAMMATIDAE):
DESENVOLVIMENTO DE UM OVO ARTIFICIAL E
APRIMORAMENTO DE DIETAS ARTIFICIAIS**

FERNANDO LUÍS CÔNSOLI

Biólogo

Orientador: Dr. JOSÉ ROBERTO POSTALI PARRA

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro - 1997

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

Cônsoli, Fernando Luís

Criação in vitro de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 e *T. pretiosum* Riley, 1879 (Hym.: Trichogrammatidae): desenvolvimento de um ovo artificial e aprimoramento de dietas artificiais / Fernando Luis Cônsoli. - - Piracicaba, 1997
153 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
Bibliografia.

1. Controle biológico 2. Criação animal in vitro 3. Dieta artificial 4. Inseto parasitóide 5. Tricogramatideo I. Título

CDD 595.79

**CRIAÇÃO *IN VITRO* DE *Trichogramma galloi* ZUCCHI, 1988 E
T. pretiosum RILEY, 1879 (HYM.: TRICHOGRAMMATIDAE):
DESENVOLVIMENTO DE UM OVO ARTIFICIAL E
APRIMORAMENTO DE DIETAS ARTIFICIAIS**

FERNANDO LUÍS CÔNSOLI

Aprovada em: 23.01.98

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. José Roberto Postali Parra

ESALQ/USP

Prof. Dr. Evôneo Berti Filho

ESALQ/USP

Prof. Dr. Paulo Sérgio Machado Botelho

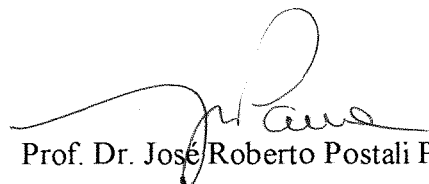
UFSCar

Prof. Dr. Benedicto Ferreira do Amaral Filho

UNICAMP

Prof. Dr. Evaldo F. Vilela

UFV


Prof. Dr. José Roberto Postali Parra
Orientador

Dedico,

À minha mais nova família,

Renata e Pedro, por tudo que

eles representam na minha vida.

São a minha força, a minha garra,

a minha alegria, o meu prazer.

São a minha vida.

Ofereço.

*Aos meus pais e irmãos, que me
proporcionaram todas as condições
para aqui chegar. A eles devo tudo.*

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. José Roberto Postali Parra, professor associado do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, pelo inestimável apoio e incentivo a minha carreira científica, bem como pelo exemplo de dedicação, conduta profissional e de valorização do reconhecimento;
- 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, pelo seu apoio ao desenvolvimento de minha carreira científica;
- Ao Dr. Elliot W. Kitajima, coordenador do Núcleo de Apoio à Pesquisa - Microscopia Eletrônica Aplicada à Agronomia (NAP-MEPA) da ESALQ/USP, pelos ensinamentos e apoio para a condução dos trabalhos com microscopia eletrônica, mas, sobretudo, pelo exemplo de dinamismo e vitalidade;
- À Engenheira Agrônoma Renata Chiarini Monteiro pela identificação das linhagens de *Trichogramma galloi* e *T. pretiosum* utilizadas nesse trabalho;
- Ao Biólogo Heraldo Negri de Oliveira, funcionário do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, pela amizade, apoio e ensinamentos transmitidos sobre técnicas fotográficas;
- À funcionária do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, Neide Graciano Zério, pela paciência, amizade e colaboração;

- 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;
- Aos funcionários do Departamento de Entomologia, especialmente a Ana Gabriela Brancalhão, João J. Forti e Cibele Maria Galvani, pela colaboração;
- Às auxiliares de bibliotecário, da Biblioteca Central da ESALQ/USP, Luzia Fátima S. Possato e Silvana Cristina N. Oliveira pelo empenho profissional e amizade;
- À Bióloga, Silvânia Machado, técnica do NAP-MEPA (ESALQ/USP), pelo auxílio prestado na utilização do microscópio eletrônico de transmissão;
- A todos os colegas do CPG em Entomologia da ESALQ/USP, especialmente aos amigos do Laboratório de Biologia de Insetos, pelo convívio e amizade.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xvii
SUMMARY.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Criação <i>in vitro</i> de parasitóides.....	3
2.1.1 Estimulantes e substratos para oviposição.....	8
2.1.2 Dietas artificiais.....	11
2.1.2.1 Dietas artificiais: consistência, pH e pressão osmótica.....	15
2.1.2.2 Dietas artificiais: anticontaminantes.....	17
2.2 Comportamento de parasitismo de <i>Trichogramma</i>	18
2.2.1 Estímulos químicos.....	18
2.2.2 Estímulos físicos.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Manutenção das populações de parasitóides.....	22
3.2 Caracterização e duração dos estágios imaturos de desenvolvimento de <i>Trichogramma galloi</i> Zucchi, 1988 e <i>T. pretiosum</i> Riley, 1879.....	22
3.3 Desenvolvimento de um “ovo artificial”.....	23
3.3.1 Estrutura da antena de fêmeas de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i>	23
3.3.2 Estrutura do ovipositor de fêmeas de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i>	24
3.3.3 Avaliação (tamanho, volume, espessura e estrutura do córion) de ovos	

dos hospedeiros naturais e alternativos de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i>	25
3.3.4 Estudo do comportamento de parasitismo de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i>	26
3.3.5 Confeção do “ovo artificial”	26
3.3.5.1 Seleção do polímero plástico	26
3.3.5.2 Determinação da proporção ideal de fêmeas dos parasitóides por “ovo artificial”	27
3.3.5.3 Determinação do efeito do tamanho do “ovo artificial” no parasiti- tismo por <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i>	29
3.4 Criação dos insetos a serem utilizados como fonte de hemolinfa ou holotecdos para a confecção de dietas artificiais.....	30
3.5 Coleta dos componentes derivados de insetos a serem utilizados no preparo de dietas artificiais	30
3.5.1 Coleta de hemolinfa.....	30
3.5.2 Coleta de holotecdos pupais	31
3.6 Preparo de dietas artificiais para a criação <i>in vitro</i>	31
3.7 Avaliação das dietas artificiais para a criação <i>in vitro</i> de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i>	32
3.8 Qualidade dos insetos produzidos <i>in vitro versus in vivo</i>	35
3.9 Efeito da idade da pupa do hospedeiro, no momento da coleta de holotecdos, na qualidade do meio artificial.....	36
3.10 Parasitismo de ovos artificiais por diferentes linhagens de <i>T. pretiosum</i>	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Caracterização e duração dos estágios imaturos de desenvolvimento de <i>Trichogramma galloi</i> Zucchi,1988 e <i>T. pretiosum</i> Riley,1879	38
4.2 Estrutura da antena de fêmeas de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i>	40
4.3 Estrutura do ovipositor de fêmeas de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i>	47
4.4 Avaliação (tamanho, volume, espessura e estrutura do córion) de ovos de ovos dos hospedeiros naturais e alternativos de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i>	52

4.5 Estudo do comportamento de parasitismo de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i>	75
4.6 Confeção do “ovo artificial”	85
4.6.1 Seleção do polímero plástico	85
4.6.2 Determinação da proporção ideal entre o número de fêmeas do parasitói- de por “ovo artificial”	88
4.6.3 Determinação do tamanho ideal do “ovo artificial”	91
4.7 Avaliação das dietas artificiais para a criação <i>in vitro</i> de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i>	93
4.8 Qualidade dos insetos produzidos <i>in vitro versus in vivo</i>	102
4.8.1 Parâmetros comportamentais.....	102
4.8.2 Parâmetros biológicos	111
4.8.3 Parâmetros morfológicos.....	119
4.9 Efeito da idade da pupa, no momento da coleta dos holotecidos, na qualidade do meio artificial	121
4.10 Parasitismo de ovos artificiais por diferentes linhagens de <i>T. pretiosum</i>	124
5. CONCLUSÕES	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela Nº	Página
1 Espécies de parasitóides criados, parcial ou totalmente, em dietas artificiais (modificado de Bratti, 1990 por Cònsoli & Parra, 1997).....	4
2 Composição (%) das dietas artificiais utilizadas para a criação <i>in vitro</i> de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i>	33
3 Duração (segundos) dos parâmetros de comportamento de avaliação, perfuração e oviposição, observados para <i>T. galloi</i> parasitando diversos hospedeiros. Temperatura: $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$	81
4 Duração (segundos) dos parâmetros de comportamento de avaliação, perfuração e oviposição, observados para <i>T. pretiosum</i> parasitando diversos hospedeiros. Temperatura: $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$	83
5 Porcentagem (%) de parasitismo e número de ovos de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i> colocados por “ovo artificial”, confeccionado com diversas películas plásticas. Temperatura: $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$	87
6 Parasitismo (%) e número de ovos de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i> colocados por “ovo artificial”, utilizando-se diferentes números de fêmeas do parasitóide: “ovo artificial”. Temperatura: $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$	90
7 Parasitismo (%) de “ovos artificiais” de diversos tamanhos e número de ovos de diversos tamanhos e número de ovos de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i> colocados por “ovo artificial”. Temperatura: $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas.....	92
8 Duração (segundos) dos parâmetros de comportamento de avaliação, perfuração e oviposição, observados para <i>T. galloi</i> criado <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , parasitando ovos de <i>D. saccharalis</i> . Temperatura: $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$	109
9 Duração (segundos) dos parâmetros de comportamento de avaliação, perfuração e oviposição, observados para <i>T. pretiosum</i> criado <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , parasitando ovos de <i>H. virescens</i> . Temperatura: $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$	110

- 10 Parasitismo de ovos de *A. kuehniella* (número médio de ovos parasitados/fêmea), porcentagem de fêmeas que parasitaram e longevidade de *T. galloi* criado *in vivo* e *in vitro*. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas..... 113
- 11 Parasitismo de ovos de *A. kuehniella* (número médio de ovos parasitados/fêmea), porcentagem de fêmeas que parasitaram e longevidade de *T. pretiosum* criado *in vivo* e *in vitro*. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas..... 114
- 12 Capacidade de parasitismo (número de ovos parasitados/fêmea), longevidade (dias) e tamanho (μm) de fêmeas de *T. galloi*, criadas em dieta artificial confeccionadas com holotécidos de pupas de *D. saccharalis* em diferentes idades (temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas) 125
- 13 Capacidade de parasitismo (número de ovos parasitados/fêmea), longevidade (dias) e tamanho (μm) de fêmeas de *T. pretiosum*, criadas em dieta artificial confeccionadas com holotécidos de pupas de *D. saccharalis* em diferentes idades (temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas) 125

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº	Página
1	Aparelho utilizado na confecção de “ovos artificiais” para a criação <i>in vitro</i> de <i>Trichogramma</i> spp. A = placa metálica; B = disco removível; C = resistência; D = bomba de vácuo; E = campânula; F = termostato..... 28
2	Ilustração do recipiente utilizado para o parasitismo de “ovos artificiais” por <i>Trichogramma</i> (A = filme plástico com “ovos artificiais”; B = porção inferior da placa plástica; C = porção superior da placa plástica) 29
3	Desenvolvimento de ovo a pupa farata de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i> . A. ovo; B. larva de 1º ínstar; C. larvas vermiformes; D. larva piriforme; E. prepupa. A seta indica o acúmulo de grânulos de sais de urato; F. pupa farata. a = cabeça; b = olhos; c = gemas alares; d = abdome; e = tegumento do último ínstar larval.... 39
4	Desenvolvimento do estágio de pupa de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i> . A-F mostram o escurecimento gradual do tegumento e a concentração dos sais de urato na região central do abdome das pupas, além de ilustrar o desenvolvimento dos apêndices dos parasitóide 41
5	Estrutura da antena de <i>Trichogramma</i> . A. escapo (E), pedicelo (P) e flagelômeros (F) (1.760 x); B. detalhe dos flagelômeros 1 a 4 (6.600 x). As setas indicam a localização da estrutura parecida a um sensilo campaniforme 43
6	Distribuição dos sensilos no último flagelômero. A. vista ventral do quinto flagelômero (2.040 x); B. vista dorsal (2.550 x); C. vista lateral (2.400 x). a = sensilo tricóideo com poro apical, b = sensilo tricóideo do tipo C com multiporos, c = sensilo tricóideo com poros, d = sensilo tricóideo sem poros, e = sensilo placóideo com multiporos, f = sensilo basicônico, g = estrutura setiforme..... 45
7	Sensilos da antena de <i>T. galloi</i> e <i>T. pretiosum</i> . A. Sensilo tricóideo do tipo C com multiporos. A seta indica o tipo de inserção (7.500 x); B. Sensilo tricóideo

- com multiporos. A seta indica o tipo de inserção (4.500 x); C. Detalhe de um sensilo tricóideo com multiporos. A seta indica a presença de poros (75.000 x); D. Sensilo tricóideo sem poros. A seta indica o tipo de inserção (7.500 x)..... 46
- 8 Sensilos da antena de *T. galloi* e *T. pretiosum*. A. sensilo tricóideo com poro apical (9.000 x); B. detalhe do ápice do sensilo tricóideo com poro apical. A seta indica a presença do poro (45.000 x); C. sensilo placóideo com multiporos (4.500 x); D. detalhe do sensilo placóideo com multiporos (45.000 x); E. sensilo basicônico (45.000 x); F. estrutura parecida a um sensilo campaniforme (15.000 x)..... 48
- 9 Corte transversal do ovipositor de fêmeas de *Trichogramma*. A. ovipositor recolhido no interior da cápsula genital (6.000 x). No detalhe: ovipositor retirado da cápsula genital (2.000 x); B = detalhe do ovipositor (9.000 x) (V1 = valvífero 1, v2 = Valvífero 2, b = bainha da cápsula genital, SN = células nervosas) (Escala: A = 1,1 μ m - detalhe = 2,5 μ m, B = 1,7 μ m)..... 50
- 10 Estrutura do ovipositor de *Trichogramma*. A. ovipositor parcialmente retirado da bainha da cápsula genital (1.500 x). A seta indica a disposição da estrutura dentiforme presente ao longo do ovipositor. A mesma estrutura em detalhe (22.500x); B. elevações cuticulares da porção inferior do estilete do ovipositor de *Trichogramma* (7.500x); C. Constrição cuticular na porção superior do estilete (4.500 x); D. sensilos do ápice do ovipositor de *Trichogramma*. a = sensilo (A); b = sensilo (B); c = sensilo (C); d = sensilo (D). A seta indica a presença de um poro (7.500 x) (detalhe: 30.000 x); E. Presença de quatro estruturas pontiagudas no ápice da porção inferior do ovipositor (15.000 x); F. Detalhe das projeções cuticulares presentes no interior dos estiletos (18.000 x) 51
- 11 Ovo de *S. cerealella*. A. vista geral do ovo (225 x); B. micrópila e aerópilas juntas na região anterior (1.050 x); C. aerópilas na porção posterior do ovo (1.275 x); D. microestrutura (textura) do córion (15.000 x) 53
- 12 Estrutura fina do córion de *S. cerealella*. A. estrutura geral (15.000 x); B. detalhe do córion (24.000 x); C. Córion mostrando alteração na espessura da

- camada trabecular (15.000 x) (cm = camada de muco; end = endocóron; exo = exocóron; m = membrana; Mv = membrana vitelínica, Oo = ooplasma; tr = camada trabecular) (Escala: A e C = 1,1 μm ; B = 0,4 μm) 54
- 13 Ovo de *A. kuehniella*. A. vista geral do ovo (270 x); B. região micropilar (1.500 x). Detalhe da micrópila (2.500x); C. aerópilas na porção posterior do ovo (750 x); D. microestrutura (textura) do córon (15.000 x) 56
- 14 Estrutura fina do córon de *A. kuehniella*. A. estrutura geral (13.000x). No detalhe: córon em estágio de desenvolvimento atrasado, mostrando a ocorrência da camada Mv 2 da membrana vitelínica dividida em duas camadas distintas (22.000 x). B. detalhe do córon (27.000 x) (end = endocóron; exo = exocóron; m = membrana; Mv = membrana vitelínica; Oo = ooplasma; tr = camada trabecular) (Escala: A = 1,7 μm ; detalhe e B = 0,6 μm) 57
- 15 Ovo de *C. cephalonica*. A. vista geral (255 x); B. micrópila (1.500 x); C. aerópilas (750 x); D. microestrutura (textura) do córon (4.500 x) 59
- 16 Estrutura fina do córon de *C. cephalonica*. A. estrutura geral. Notar o afilamento da camada trabecular (9.000 x); B. detalhe do córon (27.000 x) (cm = camada de muco; end = endocóron; exo = exocóron; m = membrana; mc = mesocóron; Mv = membrana vitelínica; Oo = ooplasma; tr = camada trabecular) (Escala: A = 2,5 μm ; B = 0,6 μm)..... 60
- 17 Ovo de *D. saccharalis*. A. vista geral da postura (200 x); B. ovo isolado (150 x); C. Região da micrópila (1.500 x); D. esculturação do córon (300 x); E. aerópila (750 x); F. microestrutura (textura) do córon (7.500 x)..... 62
- 18 Estrutura fina do córon de *D. saccharalis*. A. estrutura geral (6.600x); B. detalhe do córon (22.000 x). Notar as alterações na espessura da camada trabecular; C. córon em detalhe. Notar camada trabecular (30.000 x); D. detalhe da membrana vitelínica (10.000 x) (cm = camada de muco; end = endocóron; exo = exocóron; m = membrana; Mv = membrana vitelínica; Oo = ooplasma; tr = camada trabecular) (Escala: A e D = 1,7 μm ; B = 1,1 μm ; C = 0,4 μm)..... 63

- 19 Ovo de *H. virescens*. A. vista lateral (225 x); B. vista superior, mostrando em detalhe a região da micrópila e aerópilas (setas) (450 x); C. aerópilas da região lateral do ovo; D. microestrutura (textura) do córion (7.500 x) 65
- 20 Estrutura fina do córion de *H. virescens*. A. estrutura geral (7.000 x); B. detalhe do córion (15.000 x); C e D. Detalhe da camada de muco de diferentes espessuras, contendo corpos de inclusão (18.000 e 40.000 x) (Escala: A = 1,7 µm; B e C = 0,6 µm; D = 0,4 µm) (ci = corpo de inclusão; cm = camada de muco; end = endocóron; exo = exocóron; m = membrana; Mv = membrana vitelínica; Oo = ooplasma; tr = camada trabecular)..... 66
- 21 Ovo de *A. gemmatalis*. A. vista superior (217 x); B. vista lateral (202 x); C. micrópila (450 x); D. aerópilas (750 x); E. microestrutura (textura) do córion na região das células primárias que envolvem a micrópila (7.500 x); F. microestrutura (textura) geral do córion (7.500 x) 68
- 22 Estrutura fina do córion de *A. gemmatalis*. A. detalhe do córion (9.000 x); B. detalhe da membrana vitelínica (9.000 x); C. estrutura geral (16.000 x); D. detalhe do córion mostrando a disposição diferenciada da camada trabecular (25.000 x) (cm = camada de muco; end = endocóron; exo = exocóron; m = membrana; Mv = membrana vitelínica; Oo = ooplasma; tr = camada trabecular) (Escala: A e B = 1,1 µm; C = 0,6 µm; D = 0,4 µm) 69
- 23 Ovo de *S. frugiperda*. A. vista geral da postura realizada por fêmea recém-emergida (75 x). No detalhe: Pêlo que recobre a postura (10.000 x); B. vista geral da postura realizada por fêmea de idade mais avançada (90 x); C. vista geral de um ovo individualizado. Notar a ausência de esculturação do córion no terço inferior do mesmo (150 x); D. área micropilar (750 x); E. aerópila (1.500 x); F. microestrutura (textura) do córion (7.500 x) 72
- 24 Estrutura fina do córion de *S. frugiperda*. A. detalhe do córion mostrando elevação da sua superfície (6.600 x); B. detalhe da membrana vitelínica (3.800 x); C. detalhe do córion (25.000 x); D. Pêlo recobrindo ovo de *S. frugiperda*. Notar a espessura do pêlo em relação ao córion (10.500 x) (cm = camada de muco; end

- = endocóron; exo = exocóron; m = membrana; Mv = membrana vitelínica; Oo = ooplasma; tr = camada trabecular) (Escala: A = 1,7 μ m; B = 2,5 μ m; C = 0,4 μ m; D = 1,1 μ m)..... 73
- 25 Principais etapas do comportamento de parasitismo de fêmeas de *Trichogramma*. A. contato, B. avaliação, C. e D. perfuração, E. oviposição, F. alimentação. (Por P. Milano)..... 77
- 26 Porcentagem (%) de fêmeas de *T. galloi* (A) e *T. pretiosum* (B) que aceitaram, rejeitaram ou permaneceram inativas, quando às mesmas foram oferecidos ovos de diversos hospedeiros naturais e alternativos. Temperatura: 24 \pm 1°C; umidade relativa: 60 \pm 10%..... 79
- 27 Tempo de procura (segundos) utilizado por fêmeas de *T. galloi* (A) e *T. pretiosum* (B) para a localização de diversos hospedeiros naturais e alternativos. Temperatura: 24 \pm 1°C; umidade relativa: 60 \pm 10%. 80
- 28 Tempo de avaliação (segundos) dos três primeiros ovos de diversos hospedeiros parasitados por *T. galloi* (A) e *T. pretiosum* (B). Temperatura: 24 \pm 2°C; umidade relativa: 60 \pm 10%..... 82
- 29 Estrutura superficial das membranas plásticas após a utilização do processo térmico para a confecção dos ovos artificiais. A. polietileno 7-8 μ m, B. polietileno 9-10 μ m, C. polietileno 8-9 μ m, D. polipropileno 12-13 μ m, E. polietileno 50 μ m, F. poliestireno 12-15 μ m. 89
- 30 Número médio de ovos de *T. galloi* e *T. pretiosum* depositados por ovo artificial, contendo diversas dietas artificiais como substrato de criação. As linhas vermelhas indicam os valores extremos ideais do número de larvas do parasitóide/ovo artificial (9-87). Temperatura: 25 \pm 1°C; umidade relativa: 60 \pm 10%; fotofase: 14 horas..... 95
- 31 Ilustração do desenvolvimento *in vitro* de ovo a adulto de *Trichogramma*. A. fêmeas de *Trichogramma* parasitando ovo artificial. Detalhe: fêmea em close-up; B. larvas no final do desenvolvimento (notar secreção dos grânulos escuros); C. pupas no início do desenvolvimento (estágio de olhos vermelhos);

- D. detalhe das pupas; E. escurecimento do tegumento das pupas (próximo à emergência); F. adulto emergindo do ovo artificial 97
- 32 Viabilidade (%) das fases larval e pupal de *T. galloi* e *T. pretiosum*, em dietas artificiais em que houve o desenvolvimento de ovo a adulto. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas 99
- 33 Porcentagem (%) de fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum*, criadas *in vivo* e *in vitro*, que aceitaram, rejeitaram ou permaneceram inativas, quando às mesmas foram oferecidos ovos dos respectivos hospedeiros naturais, *D. saccharalis* e *H. virescens*. Temperatura: $24 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$ 103
- 34 Tempo de procura (segundos) utilizado por fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum*, criadas *in vivo* e *in vitro*, para a localização dos respectivos hospedeiros naturais, *D. saccharalis* e *H. virescens*. Temperatura: $24 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$ 106
- 35 Tempo total (segundos) para o parasitismo de um hospedeiro (pontos) e a proporção do período empregado para as fases de avaliação, perfuração e oviposição (barras) por *T. galloi* e *T. pretiosum*, criados *in vivo* e *in vitro*, parasitando os seus respectivos hospedeiros naturais, *D. saccharalis* e *H. virescens*. Temperatura: $24 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$ 108
- 36 Parasitismo acumulado (%) de *T. galloi* e *T. pretiosum*, criados *in vivo* e *in vitro*, em três intervalos de tempo (agressividade). Temperatura: $24 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$ 112
- 37 Número de ovos de *A. kuehniella* parasitados/fêmea/dia por *T. galloi* e *T. pretiosum*, criados em algumas dietas artificiais e nos seus respectivos hospedeiros naturais e no hospedeiro alternativo (temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas)..... 116
- 38 Parasitismo acumulado (%) de ovos de *A. kuehniella* por *T. galloi* e *T. pretiosum*, criados em algumas dietas artificiais e nos seus respectivos hospedeiros naturais e no hospedeiro alternativo (temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas)..... 118

- 39 Tamanho médio (μm) (barra vermelha) e intervalo de variação (indicado pela barra azul) da tíbia posterior de fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum*, criadas *in vivo* e *in vitro*. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas..... 120
- 40 Parasitismo de ovos artificiais, por *T. galloi* e *T. pretiosum*, contendo dietas confeccionadas com holotecidos de pupas de *D. saccharalis* em diferentes idades (1-2 dias, 3-4 dias e 5-6 dias) (temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas)..... 122
- 41 Viabilidade (%) larval e pupal de *T. galloi* e *T. pretiosum*, criados em dietas artificiais confeccionadas com holotecidos pupais de *D. saccharalis* em diferentes idades (temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas) 123
- 42 Parasitismo (número de ovos do parasitóide/ovo artificial) de ovos artificiais por diversas linhagens de *T. pretiosum* (temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas)..... 126
- 43 Viabilidade (%) larval e pupal das diferentes linhagens de *T. pretiosum* criadas em dieta artificial (temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas) 127

CRIAÇÃO *IN VITRO* DE *Trichogramma galloi* ZUCCHI, 1988 E *T. pretiosum* RILEY, 1879 (HYM.: TRICHOGRAMMATIDAE): DESENVOLVIMENTO DE UM OVO ARTIFICIAL E APRIMORAMENTO DE DIETAS ARTIFICIAIS.

Autor: FERNANDO LUÍS CÔNSOLI

Orientador: Dr. JOSÉ ROBERTO POSTALI PARRA

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo desenvolver um substrato artificial, que pudesse, além de acondicionar a dieta artificial, servir como substrato de postura e desenvolvimento de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 e *T. pretiosum* Riley, 1879. Paralelamente, buscou-se o aprimoramento de dietas artificiais previamente desenvolvidas para essas espécies. Para o desenvolvimento do ovo artificial foram realizados estudos básicos, como: 1) duração do desenvolvimento imaturo; 2) caracterização de sensilos das antenas e ovipositor de *T. galloi* e *T. pretiosum*, responsáveis pelo reconhecimento e aceitação do hospedeiro; 3) determinação da estrutura fina do córion dos diversos hospedeiros; 4) comportamento de parasitismo de *T. galloi* e *T. pretiosum* em vários hospedeiros e 5) seleção de polímeros plásticos para a confecção de ovos artificiais. Após a seleção do polímero plástico, avaliou-se o melhor tamanho do ovo artificial, bem como a densidade de fêmeas do parasitóide a ser utilizada por ovo artificial. Foram desenvolvidas 36 dietas, contendo como nutriente básico hemolinfa de lagartas ou holotécidos pupais derivados de quatro espécies de insetos, associados a diferentes proporções de gema de ovo, soro fetal bovino, meio de Grace, hidrolisado de lactoalbumina, solução de extrato de levedura e Yeastolate^R. Foram testadas várias

formas de extração de holotécidos pupais, além da melhor idade de pupas para a sua obtenção. Também foi avaliada a aceitação e o desenvolvimento de diferentes linhagens de *T. pretiosum* em ovos artificiais. Os resultados indicaram que o estímulo físico, fornecido pela textura da superfície do polímero plástico, foi suficiente para a aceitação dos ovos artificiais por *T. pretiosum* e *T. galloi*. Membranas de polietileno de 7-8 e 9-10 µm de espessura foram as mais adequadas para o desenvolvimento de ovos artificiais. Ovos com 5 mm de diâmetro foram selecionados para a criação *in vitro* por propiciarem o maior parasitismo, além de permitirem o desenvolvimento do maior número de indivíduos devido à possibilidade de utilização de maior volume de dieta. A densidade de fêmeas do parasitóide por ovo artificial selecionada foi a de 6 fêmeas: ovo, devido à obtenção de 100% de parasitismo com o maior número de ovos do parasitóide por ovo artificial. *T. galloi* e *T. pretiosum* se desenvolveram até o estágio adulto em 11 das 36 dietas estudadas. As dietas que resultaram em melhor desenvolvimento dos parasitóides foram aquelas compostas por holotécidos pupais de *D. saccharalis*, contando com a adição de hidrolisado de lactoalbumina e de extrato de levedura. Os adultos criados nessas dietas artificiais apresentaram características biológicas (capacidade de parasitismo, longevidade), comportamentais e morfológicas (tamanho) comparáveis àquelas de insetos criados em ovos dos respectivos hospedeiros naturais ou alternativos. A idade da pupa do hospedeiro afetou a qualidade nutricional do meio, não ocorrendo o desenvolvimento do parasitóide em dietas formuladas com holotécidos de pupas em estágio de desenvolvimento próximo à emergência dos adultos. O parasitismo e a viabilidade do período pré-imaginal foi variável dependendo da linhagem de *T. pretiosum* analisada.

***IN VITRO* REARING OF *Trichogramma galloi* ZUCCHI, 1988 AND *T. pretiosum* RILEY, 1879 (HYM.: TRICHOGRAMMATIDAE): DEVELOPMENT OF AN ARTIFICIAL HOST EGG AND IMPROVEMENT OF ARTIFICIAL DIETS.**

Author: FERNANDO LUÍS CÔNSOLI

Advisor: Prof. JOSÉ ROBERTO POSTALI PARRA

The main goal of this research was to develop an artificial host egg to be useful not only as a container but also as a host, allowing parasitization and development of *Trichogramma galloi* and *T. pretiosum*, as well as to improve previously developed artificial diets. Basic research was performed in order to develop an artificial host egg, especially that involving the parasitoid immature development, the antennal and ovipositor sensillar structures of *T. galloi* and *T. pretiosum* females related with host recognition and acceptance, the chorionic fine structure of hosts that are commonly parasitized by these species, the parasitization behavior of *T. galloi* and *T. pretiosum* on natural and factitious hosts and the selection of plastic membranes to manufacture artificial host eggs. After the selection of this membrane, it was evaluated the best size for the artificial egg and the parasitization pressure (number of females/artificial egg) to get the ideal parasitization for the development of both parasitoids. Thirty-six artificial diets were developed using larval hemolymph or pupal holotissues derivated from many host species as the main component, mixed with different proportions of egg yolk, bovine fetal serum, Grace's medium, protein hydrolisates, yeast extract solution and Yeastolate^R. It was also tested different ways of extracting pupal holotissues as well as the best pupal stage to do it. The acceptance of the artificial eggs by different *T. pretiosum* strains was also evaluated. Our results show the physical stimulus from the texture of the plastic egg

surface was enough to elicit host acceptance by *T. galloi* and *T. pretiosum*. Seven to eight and 9-10 μm thick polyethylene where the most adequated membranes to produce artificial eggs. Artificial eggs of 5 mm in diameter were selected for the *in vitro* rearing process because they allow the utilization of the highest volume of diet. Hundred percent of parasitization of artificial eggs and the higher number of parasitoid eggs/artificial egg (number ranging from 9 to 87 determined as the ideal number of parasitoids to develop in 1 μl of artificial diet) were found when using 6 females for each artificial host egg. *T. galloi* and *T. pretiosum* successfully developed on 11 out of the 36 diets tested for each parasitoid. Diets composed of pupal holotissues from *D. saccharalis*, egg yolk, bovine fetal serum, yeast extract solution or lactoalbumin hydrolisates allow the best development of *T. galloi* and *T. pretiosum*. Parasitoid adults reared on artificial diets showed biological (parasitization capacity), behavioural, and morphological (size) traits comparable with adults emerged from the natural or the factitious hosts. The quality of the artificial diet was affected by the pupal age. Diets composed with holotissues from aged pupae did not allowed the complete development of the parasitoids. The parasitization of artificial eggs and the immature stage survivorship of different strains of *T. pretiosum* were quite different.

1. INTRODUÇÃO

O sistema de criação de um inimigo natural para programas aplicados de controle de pragas é de fundamental importância para a viabilização desse organismo como um agente biológico de controle. Esse sistema de criação deve permitir a obtenção de um grande número de indivíduos, com a mínima mão-de-obra e a um custo compatível aos benefícios alcançados com a sua utilização. No caso de insetos entomófagos, como parasitóides e predadores, onde o sistema de produção do agente requer, necessariamente, a criação de um segundo organismo (hospedeiro ou presa), os custos de tal criação podem inviabilizar o uso desses insetos em programas de controle em áreas extensas, principalmente quando o inseto é utilizado em liberações inundativas (Cônoli & Parra, 1997a).

Parasitóides de ovos do gênero *Trichogramma* são um exemplo onde o sistema de produção é dependente da criação de um segundo inseto. Nesse caso, porém, a possibilidade de utilização de hospedeiros alternativos (diversas espécies de traças de grãos armazenados) na produção massal de *Trichogramma*, aliada a sua eficiência no controle de inúmeras pragas, nos mais diversos agroecossistemas, tornam esse inseto um dos organismos mais requisitados em programas de controle biológico em todo o mundo. Apesar da existência de técnicas bem estabelecidas na produção de *Trichogramma* sobre hospedeiros alternativos (criação *in vivo*), um novo sistema de criação desse parasitóide vem sendo desenvolvido, onde se prescinde da criação da espécie hospedeira, passando-se a utilizar dietas artificiais (criação *in vitro*) para a produção do mesmo, reduzindo-se, assim, várias etapas do processo de criação. Dos países que iniciaram as pesquisas de criação *in vitro* de *Trichogramma* no final da década de 70, apenas a China domina essa técnica de produção em larga escala, o que permite a liberação de insetos em áreas extensas, para o controle das mais diversas pragas. Países como França, E.U.A. e, recentemente, o Brasil também buscam o desenvolvimento e aprimoramento dessa

nova técnica de criação, que proporcionará, indubitavelmente, grandes avanços no sistema de criação de parasitóides (Grenier, 1997).

No entanto, vários são os problemas a serem solucionados para que a criação *in vitro* possa ser utilizada rotineiramente como um sistema de produção desse inimigo natural em larga escala. Ainda são necessários estudos sobre a anatomia, fisiologia e nutrição do parasitóide, além de estudos da relação entre o hospedeiro e o parasitóide. Assim, esse trabalho teve por objetivo realizar estudos básicos do desenvolvimento imaturo, estrutura das antenas e ovipositor de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 e *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, como também verificar a estrutura e as características de vários de seus hospedeiros, para o desenvolvimento de um "ovo artificial" para a criação *in vitro* desses insetos. Paralelamente ao desenvolvimento desse "ovo artificial", buscou-se o aprimoramento de dietas artificiais para a criação desses parasitóides.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Criação *in vitro* de parasitóides

Os primeiros trabalhos buscando a criação de parasitóides em dietas artificiais estavam relacionados a estudos de biologia, fisiologia e nutrição desses insetos (House, 1954abc; House & Barlow, 1964; Thompson, 1974, 1975, 1976, 1977, 1979; Grenier *et al.*, 1974, 1975, 1978). Prell (1915) foi o primeiro a tentar a criação de um parasitóide, *Parasetigena agilis* (Rob. - Desv.) (Dip.: Tachinidae), em dieta artificial para estudos de biologia. Shannon (1923) alcançou resultados positivos ao criar *Sarcophaga cimbicis* (Ins.) e *Sarcophaga sarracenoides* (Ald.) (Dip.: Sarcophagidae) em meios oligídicos. Os estudos de exigências nutricionais de *Agria affinis* (Fallen) (Dip.: Sarcophagidae) iniciados por House & Traer (1948) e House (1954abc) permitiram um maior desenvolvimento das pesquisas nessa área. Entretanto, o interesse pela utilização dessa técnica de criação para a produção de insetos para uso em programas de controle biológico começou a aumentar na década de 70, quando alguns parasitóides da Ordem Hymenoptera foram criados com sucesso em meios artificiais (Yazgan & House, 1970; Hoffman *et al.*, 1975; Guan *et al.*, 1978).

Os estudos para o estabelecimento de técnicas de criação *in vitro* de parasitóides já permitiram o desenvolvimento de 71 espécies de parasitóides, obtendo-se adultos em 53 espécies. As pesquisas são concentradas nas Ordens Diptera (16 espécies) e Hymenoptera (55 espécies), sendo que esta última apresentou o maior número de casos bem-sucedidos (Tabela 1). Apesar da existência de vários fatores limitantes na criação *in vitro* de parasitóides, como falta de conhecimento das relações fisiológicas existentes entre hospedeiro e parasitóide, exigências nutricionais e fisiologia do desenvolvimento, vários deles podem ser criados por gerações sucessivas em meios artificiais (House & Traer, 1948; Arthur & Coppel, 1953; Smith, 1958; Gao *et al.*, 1982; Guerra *et al.*, 1993).

Tabela 1. Espécies de parasitóides criados, parcial ou totalmente, em dietas artificiais (modificado de Bratti, 1990 por Cónsoli & Parra, 1997a).

FAMÍLIA	ESPÉCIE	AUTOR(ES)
HYMENOPTERA		
Braconidae		
	<i>Aphidius ervi</i> Haliday	Digilio <i>et al.</i> (1996)
	<i>Bracon hebetor</i> (Say)*	Xie <i>et al.</i> (1989)
	<i>B. greeni</i> Ashmead*	Li (1992)
	<i>B. mellitor</i> Say*	Guerra (1992), Guerra <i>et al.</i> (1993)
	<i>Cardiochiles nigriceps</i> Viereck	Pennacchio <i>et al.</i> (1992)
	<i>Cotesia kariyai</i> (Watanabe)	Yagi <i>et al.</i> (1996)
	<i>C. marginiventris</i> (Cresson)	Greany (1980, 1981, 1986)
	<i>Dibrachys cavus</i> Walker*	Lu & Lang (1981)
	<i>Lysiphlebus fabarum</i> (Marshall)*	Rotundo <i>et al.</i> (1988)
	<i>Microplitis croceipes</i> (Cresson)	Greany (1986), Ferkovich <i>et al.</i> (1996)
Chalcididae		
	<i>Brachymeria intermedia</i> (Nees)	Thompson (1980)
	<i>B. lasus</i> (Walker)*	Thompson (1981b, 1983)
	<i>B. ovata</i> (Say)	Thompson (1981a)
Elasmidae		
	<i>Elasmus albipennis</i> Thompson*	Yazlovetsky <i>et al.</i> (1992)
Encyrtidae		
	<i>Ageniaspis fuscicollis</i> Dalm.	Nenon (1972)
	<i>Ooencyrtus pityocampae</i> (Mercet)*	Battisti <i>et al.</i> (1990), Masutti <i>et al.</i> (1991, 1992, 1993)
	<i>O. kuvanae</i> Howard	Lee & Lee (1994)
	<i>O. nezarae</i> Ishii	Takasu & Yagi (1992)

Continuação da Tabela 1.

FAMÍLIA	ESPÉCIE	AUTOR(ES)
→ Eulophidae	<i>Melittobia digitata</i> Dahms	Cooperband <i>et al.</i> (1996)
Eupelmidae	<i>Anastatus japonicum</i> Ashmead*	Li (1992)
Ichneumonidae	<i>Campolepis distincta</i> (Provancher)	Vanderzant citado por Thompson (1981a)
	<i>Cryptus albitarsus</i> (Cresson)*	Greany (1996)
	<i>Diapetimorpha introita</i> (Cresson)*	Carpenter & Greany (1996)
	<i>Exeristes roborator</i> (Fabr.)*	Thompson (1975, 1976)
	<i>Itopectis conquisitor</i> (Say)*	Yazgan & House (1970), Yazgan (1972), House (1978)
	<i>Pimpla turionellae</i> (L.)*	Bronskill & House (1957), Yazgan (1981), Awuitor <i>et al.</i> (1984)
	<i>Venturia canescens</i> (Gravenhorst)	Ohbayashi <i>et al.</i> (1994)
Pteromalidae	<i>Catolaccus grandis</i> (Burks)*	Guerra (1992), Guerra <i>et al.</i> (1993), Guerra & Martinez (1994)
	<i>Muscidifurax zaraptor</i> Kogan & Legner*	Fanti & Vinson (1996)
	<i>Nasomia viripennis</i> (Walker)*	Fanti & Vinson (1996)
	<i>Pachycrepoides vindemiae</i> Rond.*	Thompson <i>et al.</i> (1983)
	<i>Pteromalus puparum</i> L.*	Bouletreau (1968, 1972), Hoffman <i>et al.</i> (1973), Hoffman & Ignoffo (1974)
	<i>Spalangia endius</i> Walker*	Fanti & Vinson (1996)
Scelionidae	<i>Telenomus heliothidis</i> Ashmead*	Strand <i>et al.</i> (1988)
	<i>T. dendrolimi</i> Chu*	Li (1992)
	<i>Trissolcus basalis</i> (Woll.)	Volkoff <i>et al.</i> (1992)

Continuação da Tabela 1.

FAMÍLIA	ESPÉCIE	AUTOR(ES)
Tetrastichidae	<i>Tetrastichus schoenobii</i> Ferr.*	Ding <i>et al.</i> (1980)
Trichogrammatidae	<i>Trichogramma cacoeciae</i> Marchal*	Li <i>et al.</i> (1988), Li (1989)
	<i>T. californicum</i> Nagaraja & Nagarkatti*	Rajendram (1978a)
	<i>T. chilostraea</i> Nagaraja & Nagarkatti*	Li (1989)
	<i>T. closterae</i> Pang & Chen*	Li (1989)
	<i>T. confusum</i> Viggiani*	Liu & Wu (1982)
	<i>T. cordubensis</i> Vargas & Cabello*	Li (1989)
	<i>T. dendrolimi</i> Matsumara*	Guan <i>et al.</i> (1978), Liu <i>et al.</i> (1979), Li <i>et al.</i> (1988), Li (1989)
	<i>T. embryophagum</i> Hartig*	Li (1989)
	<i>T. evanences</i> Westwood*	Li <i>et al.</i> (1988), Li (1989)
	<i>T. galloi</i> Zucchi*	Cônsoi (1993)
	<i>T. japonicum</i> Ashmead*	Li <i>et al.</i> (1988), Li (1989)
	<i>T. maidis</i> Pintureau & Voegelé*	Li <i>et al.</i> (1988), Li (1989)
	<i>T. nagarkatti</i> Voegelé*	Li (1989)
	<i>T. nubilale</i> Ertle & Davis*	Li <i>et al.</i> (1988), Li (1989)
	<i>T. ostrinae</i> Pang & Chen*	Li <i>et al.</i> (1988), Li (1989)
	<i>T. pretiosum</i> Riley*	Hoffman <i>et al.</i> (1975), Liu & Wu (1982), Strand & Vinson (1985), Xie <i>et al.</i> (1986a,b), Parrá & Cônsoi (1992), Cônsoi (1993)
	<i>T. trjapitzimi</i> Sorokina*	Li (1989)
Diptera		
Sarcophagidae	<i>Agria affinis</i> (Fallen)*	House & Traer (1948), House (1954a)
	<i>Sarcophaga aldrichi</i> (Park.)*	Arthur & Coppel (1953)

Continuação da Tabela 1.

FAMÍLIA	ESPÉCIE	AUTOR(ES)
Sarcophagidae (cont.)	<i>Sarcophaga cimbicis</i> (Ins.)*	Shannon (1923)
	<i>S. kelyi</i> (Ald.)*	Smith (1958)
	<i>S. sarracenooides</i> (Ald.)*	Shannon (1923)
	<i>Archylas marmoratus</i> (Townsend)	Bratti (1990)
Tachinidae	<i>Eucelatoria bryani</i> Sab.*	Nettles <i>et al.</i> (1980), Nettles (1986a,b)
	<i>Exorista larvarum</i> L.*	Mellini <i>et al.</i> (1993a,b)
	<i>E. japonica</i> (Townsend)*	Yagi <i>et al.</i> (1996)
	<i>E. sorbillans</i> (Wiedemann)*	Watanabe & Mitsuhashi. (1995)
	<i>Lixophaga diatraeae</i> (Townsend)*	Grenier <i>et al.</i> (1978), Grenier (1979)
	<i>Lydella thompsoni</i> Hert.*	Bratti (1989) citado por Bratti (1990)
	<i>Palexorista laxa</i> (Curran)*	Bratti & Nettles (1989)
	<i>Parasetigena agilis</i> (Rob. - Desv.)	Prell (1915)
	<i>Phryxe caudata</i> (Rond.)	Grenier <i>et al.</i> (1974, 1975), Grenier (1979)
	<i>Pseudogonia rufifrons</i> Wiedman*	Baronio & Sehnal (1980), Bratti & Monti (1988), Fanti & Bratti (1991)
	<i>Pseudoperichaeta nigrolineata</i> (Walker)	Bonnot <i>et al.</i> (1984)

* : Parasitóides criados até o estágio adulto, partindo-se de ovos ou larvas de 1º ou 2º ínstar.

O interesse por essa nova técnica de produção resultou na publicação de algumas revisões sobre o assunto, com diferentes abordagens (Mellini, 1975; Greany, 1986; Grenier *et al.*, 1986, 1994; Thompson, 1986; Campadelli & Dindo, 1987; Bratti, 1990; Yazlovetsky, 1992; Grenier, 1994).

2.1.1 Estimulantes e substratos para oviposição

Ovos e/ou larvas neonatas de parasitóides para a criação em dietas artificiais eram obtidos, na grande maioria dos trabalhos, através da dissecação do hospedeiro para a retirada e posterior inclusão dos mesmos em meio artificial. Essa forma de obtenção dos estágios iniciais foi utilizada para parasitóides de ovos, de larvas e de pupas (Bouletreau, 1968; Hoffman *et al.*, 1975; Grenier, 1979; Nettles *et al.*, 1980; Bonnot *et al.*, 1984; Greany, 1986; Bratti & Monti, 1988; Dindo, 1990; Parra & Cònsoli, 1992). Essa técnica, no entanto, além de ser extremamente trabalhosa, inviabilizaria o processo de produção *in vitro*, pois ainda seria necessária a manutenção de criações do hospedeiro. Para facilitar esse processo haveria a necessidade de se desenvolverem substratos artificiais que fossem atrativos aos parasitóides, permitindo a fácil coleta dos ovos. Outros autores ainda buscaram solucionar esse problema, obtendo formas imaturas recém-eclodidas dos parasitóides pela incubação extra-uterina de seus ovos (Grenier, 1979; Mellini & Campadelli, 1988).

Arthur *et al.* (1969) foram os primeiros autores a relatar a existência de compostos químicos na hemolinfa do hospedeiro, que funcionariam como estimulantes de oviposição para o parasitóide *Itopectis conquisitor* (Say) (Hym.: Ichneumonidae). A fração responsável pela indução da oviposição desse parasitóide foi isolada da hemolinfa de pupas de *Galleria mellonella* (Stainton) (Lep.: Pyralidae), sendo caracterizada por apresentar peso molecular ao redor de 7.000 daltons. Essa característica indicava que o componente ativo poderia ser de caráter protéico, possivelmente um polipeptídeo. Estudos subseqüentes, utilizando tubos de parafilme como substrato de postura, indicaram que os aminoácidos alanina, em altas concentrações, ou arginina, em baixas concentrações, adicionados individualmente à serina, resultavam em maior indução da postura por esse parasitóide. A lisina apresentou eficiência em amplo intervalo de concentrações, sendo a treonina o único

aminoácido a ser ineficaz na indução do parasitismo por *I. conquisitor*. Íons como Na^+ e Mg^{+2} (estimulantes), Ca^+ e P^{+4} (inibidores) e K^+ (indiferente) também influenciaram a oviposição desse parasitóide (Arthur *et al.*, 1972).

* Os primeiros trabalhos buscando a oviposição de *Trichogramma* em substratos artificiais (Rajendram & Hagen, 1974; Rajendram, 1978ab) empregaram adaptações de técnicas desenvolvidas para a alimentação de predadores (Hagen & Tassan, 1965). Esse procedimento também foi utilizado para a obtenção de ovos de *Lysiphlebus fabarum* (Marshall) (Hym.: Braconidae) (Rotundo *et al.*, 1988). Essa técnica permitia a confecção de glóbulos de parafina:vaselina (3:1), que eram processadas da seguinte forma: 1) 0,5 g da mistura parafina:vaselina, adicionada a 13 ml da solução teste, aquecida em temperatura próxima ao ponto de fusão da parafina (45-50°C); 2) uma pipeta Pasteur era imersa nesse líquido; 3) posteriormente, a pipeta era tocada em um filme de parafilme, onde os glóbulos de parafina:vaselina eram depositados. Esse processo resultava na obtenção de glóbulos de 2-3 mm de diâmetro por 1,5-2,0 mm de altura.

Através da utilização destas esferas de parafina:vaselina, para a encapsulação de componentes estimulantes de oviposição, foi verificado o efeito da água destilada, solução fisiológica, mistura de aminoácidos e sais de Neisenheimer como estimulantes de oviposição, além do material utilizado para a confecção dos "ovos artificiais" e a proporção ideal de *Trichogramma californicum* Nagaraja & Nagakarti (Hym.: Trichogrammatidae) a ser utilizada para o parasitismo desses ovos. Não ocorreu o parasitismo de *T. californicum* em soluções de NaCl com concentração diferente à do intervalo entre 0,43% e 1,28%, sendo necessário um número mínimo de 48 fêmeas/"ovo artificial" para que a postura ocorresse. Materiais com elevado ponto de fusão (> 70°C) afetaram o comportamento de parasitismo desse inseto, principalmente pela restrição à penetração do ovipositor, devido à sua resistência e viscosidade. Ceras com ponto de fusão intermediário (48°C) permitiram os melhores resultados (Rajendram & Hagen, 1974; Rajendram 1978ab).

Os estudos realizados para *I. conquisitor*, que constataram a existência de compostos químicos na hemolinfa de insetos que induziam a oviposição (Arthur *et al.*, 1969, 1972; Hegdekar & Arthur, 1973), levaram ao desenvolvimento do mais eficiente meio estimulante para a oviposição de *T. pretiosum* Riley e *T. minutum* Riley (Hym.:

Trichogrammatidae), através da análise química da composição da hemolinfa e dos holotécidos de lagartas de *Heliothis* spp. (Nettles *et al.*, 1982, 1983). O meio estimulante era composto de uma mistura dos sais KCl-MgSO₄ em concentrações superiores em cerca de 50% àquela apresentada pelos holotécidos de *Heliothis* spp. Uma avaliação sobre o papel dos íons na indução da oviposição de *T. pretiosum* e *T. minutum* sugeriu que o íon K⁺ atuou como estimulante, sendo o Mg⁺² um agente sinérgico (Nettles *et al.*, 1982, 1983). A adição de compostos como glicose e hidrolisado de caseína à solução de KCl-MgSO₄ e o íon NH⁺⁴ inibem drasticamente a oviposição de *T. pretiosum* (Nettles *et al.*, 1985). Aminoácidos também podem ser fortes indutores da oviposição de *T. dendrolimi* Matsumara (Hym.: Trichogrammatidae). Esse parasitóide foi estimulado a ovipositar em solução composta de leucina, fenilalanina e isoleucina. Os resultados obtidos com misturas desses aminoácidos foram sempre superiores aos obtidos quando os mesmos eram empregados isoladamente (Qin & Wu, 1988).

Vários autores utilizaram o próprio meio artificial de desenvolvimento do parasitóide como meio estimulante de oviposição para *Trichogramma* (Liu *et al.*, 1979; Gao, 1982; Liu & Wu, 1982; Li *et al.*, 1988; Grenier & Bonnot, 1988; Li, 1989, 1992), sendo que Grenier *et al.* (1993) ainda utilizaram um cairomônio de contato para a atração de fêmeas de *T. brassicae* Voegelé (Hym.: Trichogrammatidae), composto de extrato de escamas de *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lep.: Pyralidae), que era aplicado à superfície de deformações semi-esféricas impressas em películas plásticas de polietileno (20-30 µm de espessura). A utilização desse extrato permitiu um aumento de 15 vezes na oviposição desse parasitóide.

Os substratos mais comuns utilizados para a oviposição de *Trichogramma*, os quais também serviram ao desenvolvimento pré-imaginal do parasitóide, são formados por inúmeros polímeros plásticos (polietileno, polipropileno, silicone-carbamato) deformados mecanicamente para que se obtenha uma semi-esfera na superfície superior desse plástico, funcionando, assim, como "ovo artificial". Existe uma relação de preferência entre a espécie do parasitóide e o tipo e espessura da membrana plástica utilizada, determinada provavelmente pelo comprimento do ovipositor das fêmeas de *Trichogramma* e pelas características físicas dessa membrana, como textura, resistência e elasticidade. *T.*

dendrolimi, *T. cordubensis* Vargas, *T. closterae* Pang & Chen e *T. confusum* Viggiani (Hym.: Trichogrammatidae) preferiram ovipositar em membranas de polietileno e polipropileno mais espessas, variando de 34-65 μm e 32-36 μm , respectivamente. Espécies como *T. nubilale* Ertle & Davis, *T. chilostrae* Nagaraja & Nagarkatti, *T. japonicum* Ashmead, *T. evanescens* Westwood, *T. ostrinae* Pang & Chen, *T. pretiosum*, *T. embryophagum* Hartig, *T. cacoeciae* Marchal, *T. nagarkatti* Voegelé e *T. trjapitzini* Sorokina (Hym.: Trichogrammatidae) apresentaram maior postura em películas de polietileno de 10-18 μm (Li *et al.*, 1988; Li, 1989), sendo que a oviposição de *T. brassicae* foi obtida em película plástica de polietileno de 20-30 μm (Grenier *et al.*, 1993). Morrison *et al.* (1983) foram os únicos a relatar a postura de *T. pretiosum* em uma película plana de silicone-carbamato.

Para a obtenção de ovos de *Ooencyrtus pityocampae* (Mercet) (Hym.: Encyrtidae), foram utilizadas membranas plásticas de PVC (0,1 mm), vinil acetato e polietileno (40 μm de espessura), sendo o parasitismo nas duas últimas membranas plásticas bem superior àquele obtido no PVC (Battisti *et al.*, 1990; Masutti *et al.*, 1991).

Tilden & Ferkovich (1988) foram os primeiros a relatar um substrato artificial para a coleta de ovos de um parasitóide larval, *Microplitis croceipes* (Cresson) (Hym.: Braconidae). Esses autores solucionaram a exaustiva tarefa de obtenção de ovos de *M. croceipes*, pela dissecação de lagartas do hospedeiro, através da utilização de uma solução de agarose a 0,75%, com adição de hemolinfa como estimulante de oviposição,

2.1.2 Dietas artificiais

As dietas artificiais utilizadas na criação *in vitro* de parasitóides são muito variáveis, podendo ser utilizados meios oligídicos, merídicos e holídicos, de acordo com a terminologia empregada para dietas de insetos fitófagos (Dougherty, 1959).

Os meios oligídicos são os mais comumente utilizados, sendo compostos por materiais de composição química não definida (matéria crua). Para parasitóides da Ordem Diptera, esses meios foram compostos por homogeneizado de fígado e carne de porco para *A. affinis* (House & Traer, 1948), homogeneizado de pupas de *G. mellonella* para *Pseudogonia rufifrons* Wiedman (Dip.: Tachinidae) (Bratti & Monti, 1988), hemolinfa de

lagartas de *Manduca sexta* (Cresson) (Lep.: Sphingidae) e resíduos de soja (Fi-Pro[®]) para *Palexorista laxa* (Curran) (Dip.: Tachinidae) (Bratti & Nettles, 1989).

Esse tipo de dieta também é predominante para os parasitóides da Ordem Hymenoptera, consistindo basicamente de componentes derivados do hospedeiro, seja hemolinfa de larvas ou pupas e holotécidos de pupas, tendo sido utilizada nas criações de *Pteromalus puparum* L. (Hym.: Pteromalidae) (Bouletreau, 1968, 1972, Hoffman *et al.*, 1973), *Pimpla instigator* Fabr. (Hym.: Ichneumonidae) (Awuitor *et al.*, 1984), *Brachimeria intermedia* (Nees) (Hym.: Chalcididae) (Dindo, 1990), *T. pretiosum* (Hoffman *et al.*, 1975) e *Dibrachys cavus* Walker (Hym.: Braconidae) (Li, 1992). Entre os Hymenoptera, apenas *Pimpla turionellae* (L.) (Hym.: Ichneumonidae) foi criada em meio composto por tecidos derivados de vertebrados (fígado de porco + solução aquosa de cloreto de sódio).

No entanto, certos componentes foram adicionados à hemolinfa ou holotécidos do hospedeiro para o desenvolvimento de outros insetos. Várias espécies de *Trichogramma* e *Anastatus japonicus* Ashmead (Hym.: Eupelmidae) foram criados com sucesso até o estágio adulto, em dietas compostas de hemolinfa ou holotécidos de diversos Lepidoptera, gema de ovo de galinha e solução aquosa de leite em pó (Liu *et al.*, 1979; Li, 1982, 1989, 1992; Gao *et al.*, 1982; Xie *et al.*, 1986a; Dai *et al.*, 1988; Parra & Cônsoli, 1992). Variações na composição dessa dieta foram obtidas com a adição de água destilada, solução salina de Neisenheimer, soro fetal bovino, soro de albumina bovina, malte e extrato de ovos do hospedeiro, visando aumentar a viabilidade do desenvolvimento *in vitro* de *Trichogramma* spp. (Xie *et al.*, 1986b; Li *et al.*, 1988; Grenier & Bonnot, 1988; Li, 1989; Zhong & Zhang, 1989; Cônsoli, 1993). Esse meio artificial, desenvolvido inicialmente para a criação de *Trichogramma*, serviu como base para o desenvolvimento de dietas para a criação de outros parasitóides, pertencentes a outras famílias de Hymenoptera, como *Trissolcus basalis* (Woll.) (Hym.: Scelionidae) (Volkoff *et al.*, 1992), *Bracon mellitor* Say (Hym.: Braconidae) e *Catolaccus grandis* (Burks) (Hym.: Pteromalidae) (Guerra, 1992), *Habrobracon hebetor* (Say) (Hym.: Braconidae) e *Telenomus dendrolimusi* (Hym.: Scelionidae) (Li, 1992).

Também foram desenvolvidas dietas oligídicas para Hymenoptera, livres de componentes derivados de insetos. *O. pytiocampae* foi criado em meio composto de gema

de ovo de galinha, hidrolisado de caseína e de levedura, trealose, solução de ácido ribonucléico, sais de Wesson, mistura vitamínica de Vanderzant e colesterol (Masutti *et al.*, 1992).

As dietas merídicas, empregadas na criação *in vitro* de parasitóides, muitas vezes eram compostas por meios oligídicos suplementados com uma série de substâncias de caráter químico definido, como aminoácidos livres, carboidratos, ácidos graxos, lipídeos, soluções vitamínicas, sais minerais, oligoelementos e meios artificiais utilizados na cultura de tecido de células de insetos (Meio de Grace, IPL-52, Mitsuashi e Maramorosch, Hink TN-HFK, Shields e Sang, BML-TC 10, entre outros). Nettles (1986a), através da adição de farinha de soja ou Yeastolate[®] + farinha de soja à dieta holidica desenvolvida por Nettles *et al.* (1980), formulou inúmeras dietas merídicas para o desenvolvimento de *Eucelatoria bryani* Sab. (Dip.: Tachinidae). Esse mesmo parasitóide foi criado em diferentes meios durante o estágio de desenvolvimento pré-imaginal. Assim, durante os primeiros ínstaras foi utilizada uma dieta merídica (Nettles, 1986a), sendo que, ao completarem o 3º ínstar, as larvas eram transferidas para outro meio merídico, composto de farinha de soja, solução de aminoácidos livres e gema de ovo (Bratti & Nettles, 1992). Fanti & Bratti (1991) também criaram outro Diptera, *P. rufifrons*, em um meio merídico, que apresentava hemolinfa de lagartas de *M. sexta* como um dos componentes básicos.

Para Hymenoptera, a grande maioria das dietas merídicas desenvolvidas traziam em sua composição meios de cultura de tecido como um componente básico. Assim, o meio de cultura de Grace foi utilizado em dietas merídicas para a criação de *P. puparum* (Hoffman & Ignoffo, 1974), *P. rufifrons* (Baronio & Sehnal, 1980), *T. confusum* e *T. dendrolimi* (Liu & Wu, 1982) e *T. basalis* (Volkoff *et al.*, 1992). *T. schoenobii* foi criado em dieta contendo o meio BML-TC 10, acrescido de soro fetal bovino, hemolinfa e gema de ovo (Ding *et al.*, 1980), sendo que *T. pretiosum* (Strand & Vinson, 1985), *Cotesia marginiventris* (Cresson) e *Microplitis croceipes* (Cresson) (Hym.: Braconidae) (Greany, 1986) foram criados em dietas contendo os meios IPL-52 B e IPL-41. O meio de Hink TN-HFK, Shields & Sang e Mitsuashi & Maramorosch, e MGM-443 foram empregados, respectivamente, para a criação de *Telenomus heliothidis* Ashmead (Hym.: Scelionidae) (Strand *et al.*, 1988), *L. fabarum* (Rotundo *et al.*, 1988) e *Oencyrtus nezarae* Ishii (Hym.:

Encyrtidae) (Takasu & Yagi, 1992). Outras dietas merídicas, que não apresentavam meios de cultura de tecido como um dos componentes, também foram desenvolvidas para a criação de alguns parasitóides. Thompson (1980) testou cerca de 100 dietas merídicas para a criação de *B. intermedia*, preparadas com cerca de 6% de proteínas, 2% de carboidratos, 0,5% de sais inorgânicos e 0,25% de vitaminas. Outros meios semi-sintéticos também foram utilizados nas criações de *O. pytiocampae*, *B. mellitor* e *C. grandis* (Battisti *et al.*, 1990; Guerra *et al.*, 1993).

Dietas holídicas foram desenvolvidas buscando principalmente o estudo das exigências nutricionais desses parasitóides. Essas dietas permitem, muitas vezes, a identificação de certos componentes básicos, essenciais ao desenvolvimento do inseto em estudo, os quais não podem ser sintetizados pelas vias metabólicas normais do inseto ou mesmo metabolizado, quando oferecido em estruturas mais complexas. As dietas holídicas são formuladas exclusivamente por compostos quimicamente definidos, sendo utilizados aminoácidos livres, vitaminas, sais minerais, sais inorgânicos, carboidratos, lipídeos, ácidos graxos e oligoelementos, entre outros. Essas dietas podem ser formuladas "arbitrariamente", ou contar com o auxílio de métodos de análises químicas mais sofisticados, que permitem, através da análise da composição do hospedeiro (ovo, lagarta ou pupa), determinar os níveis dos vários nutrientes que compõem o meio nutritivo de desenvolvimento do inseto. Outro método possível de ser empregado é a análise dos componentes do corpo do parasitóide ("análise de carcaça"), que permite uma estimativa dos componentes nutricionais necessários ao crescimento. A primeira dieta holídica desenvolvida para a criação *in vitro* de um parasitóide, baseando-se em dieta oligídica para *A. affinis* (House & Traer, 1948), era composta de solução de aminoácidos livres, ácido ribonucléico, colesterol, dextrose, mistura de sais e vitaminas e resultou no desenvolvimento completo desse parasitóide (House, 1954a). Essa mesma dieta permitiu inúmeros trabalhos sobre as exigências nutricionais de *A. affinis* (House, 1954a,b,c,d; House & Barlow, 1964; House, 1966) e o desenvolvimento de outros meios holídicos para *I. conquisitor* (Yazgan & House, 1970; Yazgan, 1972; House, 1978). Entretanto, dietas holídicas desenvolvidas para a criação de *Phryxe caudata* (Rond.) e *Lixophaga diatraeae* (Townsend) (Dip.: Tachinidae) contaram com análises químicas do hospedeiro e de

estágios imaturos dos parasitóides (Grenier *et al.*, 1974, 1975, 1978; Bonnot *et al.*, 1984). Os parasitóides *Eucelatoria bryani* Sab. (Dip.: Tachinidae), *P. rufifrons*, *Exeristes roborator* (Fabr.) (Hym.: Ichneumonidae), *Brachymeria lasus* (Walker) e *B. ovata* (Say) (Hym.: Chalcididae) e *Pachycrepoideus vindemiae* Rond. (Hym.: Pteromalidae) também foram criados em meios artificiais sintéticos (Thompson, 1975, 1982, 1981a; Nettles *et al.*, 1980; Nettles, 1986a).

2.1.2.1 Dietas artificiais: consistência, pH e pressão osmótica

A consistência da dieta artificial está diretamente associada à forma de desenvolvimento do parasitóide. Ectoparasitóides (alguns Braconidae) e endoparasitóides (Tachinidae) que apresentam sistema respiratório peripnêustico, metapnêustico ou anfipnêustico, ou seja, que dependem do suprimento de oxigênio por via dos espiráculos, necessitam, obrigatoriamente, de um meio semi-sólido. No entanto, endoparasitóides que apresentem respiração cutânea, onde a troca gasosa pode ser feita diretamente pela cutícula em contato com o meio alimentar, podem ser criados em dietas líquidas ou semi-sólidas (Mellini, 1975). Assim, na criação de parasitóides em dietas semi-sólidas, quando se faz necessária a utilização de um agente gelatinizante (comumente ágar), há um outro problema de origem morfológica, que é a estrutura do aparelho digestivo desses insetos. Esses parasitóides apresentam o final do mesêntero como local de armazenamento de todo o resíduo da digestão do alimento, visto que a ligação dessa parte do aparelho digestivo com o proctodéu só ocorrerá ao final do desenvolvimento pré-imaginal, quando então poderão ser eliminados, ou aguardarão a emergência dos adultos para tal. O acúmulo de substâncias inertes (agentes gelatinizantes) no mesêntero, durante o estágio larval dos parasitóides, poderia afetar seu desenvolvimento (Mellini, 1975; Yazlovetsky, 1992). Os níveis de agentes gelatinizantes das dietas têm sido variáveis para os diversos parasitóides, sendo de 0,25-0,5% para *I. conquisitor* (Yazgan & House, 1970; House, 1978), 0,6% para *P. turionellae* (Yazgan, 1981), 0,75% para *A. affinis* (House, 1954a), 0,7% para *L. diatraeae* (Grenier *et al.*, 1978), *C. grandis* e *B. mellitor* (Guerra *et al.*, 1993), 1,0% para *P. rufifrons* (Bratti & Monti, 1988), 0,5-2,0% para *B. intermedia*, *B. lasus*, *B. ovata* e *P. vindemiae* (Thompson, 1980) e 1,5% para *E. bryani* (Nettles *et al.*, 1980). Thompson

(1975) utilizou a albumina que, quando denaturada pelo aquecimento do meio artificial, conferia à dieta um aspecto granular, aumentando a consistência do meio.

Outros compostos foram testados na tentativa de se eliminar os efeitos prejudiciais, causados por esses agentes gelatinizantes ao desenvolvimento dos parasitóides. Foram testados componentes que permitissem a sustentação das larvas dos parasitóides na superfície de dietas líquidas, evitando, dessa forma, que elas morressem por permanecerem submersas no meio artificial. Assim, foram utilizados o gel Sephadex G-50 e LH-20 (Thompson, 1975, 1980), resíduos de soja Fi-Pro[®] (Bratti & Nettles, 1989) e principalmente fibras de algodão hidrófilo esterilizadas (Bratti & Nettles, 1992; Guerra *et al.*, 1993; Mellini *et al.*, 1993a).

A **pressão osmótica** da dieta artificial é importante principalmente para os endoparasitóides, que podem sofrer hipo ou hipertrofia dos tecidos se presentes em meios hipertônicos ou hipotônicos, respectivamente. Na maioria das vezes, essas alterações podem levar o inseto à morte. Apesar de alguns parasitóides suportarem grandes variações nos valores de osmolaridade do meio artificial, como o caso de *E. roborator*, que se desenvolve em dietas com osmolaridade de até 1700 mOsm, outros insetos só o fazem em valores bem restritos, como *B. lasus* e *P. vindemiae*, que se desenvolvem em meios com valores de 400 a 525 mOsm (Thompson, 1981a; Thompson *et al.*, 1983). No entanto, a osmolaridade que parece ser a ideal ao desenvolvimento de muitos parasitóides é aquela encontrada na hemolinfa de Lepidoptera (350 mOsm). Valores próximos a esse (340-400 mOsm) foram relatados como ideais ao desenvolvimento de *P. caudata*, *L. diatraeae*, *M. croceipes*, *C. marginiventris* e *T. heliothidis* (Grenier *et al.*, 1974, 1975, 1978; Greany, 1986; Strand *et al.*, 1988). Para *T. pretiosum*, foi relatado o desenvolvimento em meio artificial com osmolaridade ao redor de 490 mOsm (Strand & Vinson, 1985).

O **pH**, assim como a pressão osmótica, é um fator que pode definir o sucesso do desenvolvimento do inseto em um meio artificial. Em meios merídicos e holídicos, onde os aminoácidos livres estão presentes em grande quantidade, o pH fica ao redor de 4,5-5,0. A maioria das dietas empregadas para a criação *in vitro* de parasitóides apresentava valores de pH próximos à neutralidade (6,5-7,5). Esses valores podem ser obtidos com a utilização de soluções de hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de sódio (NaOH) e/ou fosfato

monoácido de potássio (K_2HPO_4) (House, 1954a; Yazgan & House, 1970; Yazgan, 1972, 1981; Thompson, 1975; Strand & Vinson, 1985; Nettles, 1986a,b; Strand *et al.*, 1988; Zhong & Zhang, 1989). No entanto, vale ressaltar que esses valores e a variação de pH aceitos por muitas espécies são bem diferentes. Enquanto *E. bryani* pode desenvolver-se em dieta com pH dentro de uma faixa de 5,5-8,0 (Nettles, 1986a), *T. confusum* apresentou uma redução de 30% na sua viabilidade quando o pH da dieta foi modificado de 6,70-6,96 para 6,40 (Zhong & Zhang, 1989). O pH do meio também tem demonstrado certa importância na oviposição de parasitóides em substratos artificiais. Alguns autores relataram para *I. conquisitor*, *T. californicum* e *T. pretiosum* meios de oviposição com pH 7,0 como sendo o ideal ao parasitismo, sendo que para *T. pretiosum* é possível obter a oviposição dentro do intervalo de pH de 6,5 a 9,0 (Arthur *et al.*, 1972; Rajendram & Hagen, 1974; Nettles *et al.*, 1983).

2.1.2.2 Dietas artificiais: anticontaminantes

Os meios artificiais desenvolvidos para a criação *in vitro* de parasitóides, sejam eles holidícos, merídicos ou oligídicos, são extremamente ricos em nutrientes, favorecendo o crescimento de organismos contaminantes, principalmente fungos e bactérias. Para solucionar os problemas com contaminações, devem-se utilizar agentes anticontaminantes nas dietas, além das técnicas de assepsia a serem seguidas durante o preparo do meio artificial (Bratti, 1990; Grenier, 1994). São poucos os estudos que verificaram a toxicidade de anticontaminantes ao desenvolvimento de parasitóides, sendo empregados, na maioria dos trabalhos, agentes antibióticos, bacteriostáticos e fungistáticos. Singh & House (1970) foram os primeiros a verificar a toxicidade de vários anticontaminantes ao desenvolvimento de *A. affinis*. Os 21 produtos testados foram separados em quatro classes distintas, em função do seu efeito, em: **seguros**, **inibidores primários**, **inibidores secundários** e **tóxicos**. A presença e a intensidade dos efeitos encontrados dependeram das concentrações utilizadas, tendo normalmente se manifestado pelo prolongamento do desenvolvimento imaturo e/ou aumento da mortalidade larval e pupal. Trabalho semelhante relatou a eficiência da geneticina, anfotericina-B e nistatin, dentro das dosagens estabelecidas, no controle de fungos e bactérias em meios artificiais desenvolvidos para a criação de *T.*

dendrolimi (Grenier & Liu, 1990). Relata-se, ainda, que o metil parahidroxibenzoato (Nipagin[®]), um dos produtos mais comuns utilizados em meios artificiais para o controle de contaminações por fungos, foi extremamente tóxico ao desenvolvimento imaturo de *P. caudata* e *T. pretiosum* (Grenier, 1977; Xie *et al.*, 1986a).

2.2 Comportamento de parasitismo de *Trichogramma*

O comportamento de parasitismo envolve estímulos que levam desde a localização do habitat do hospedeiro até a sua aceitação. *Trichogramma* utiliza vários estímulos até que o parasitismo de um hospedeiro se efetive, sendo a localização e aceitação do hospedeiro influenciadas principalmente por estímulos químicos e físicos.

2.2.1 Estímulos químicos

Existem vários componentes químicos que atuam no comportamento de forrageamento de *Trichogramma*, influenciando desde a localização do habitat do hospedeiro até do hospedeiro propriamente dito. Assim, esses parasitóides podem utilizar fontes químicas provenientes de plantas, feromônio sexual do hospedeiro e componentes químicos de contato associados ao ovo do hospedeiro (Lewis *et al.*, 1971, 1972, 1975; Altieri *et al.*, 1981, 1982; Noldus & van Lenteren, 1985b; Pak & Jong, 1987; Noldus *et al.*, 1988ab).

- **Odores de plantas:** o efeito de odores de plantas na localização do habitat do hospedeiro por *Trichogramma* foi inicialmente sugerido por pesquisadores, baseando-se no fato de que muitas vezes a eficiência de parasitismo de uma determinada espécie de *Trichogramma*, sobre uma mesma praga, era variável em diferentes culturas (Rabb & Bradley, 1968; Kemp & Simmons, 1978; Bar *et al.*, 1979; Martin *et al.*, 1981), ou pelos resultados obtidos em cultivos consorciados, que em certos casos mostrou-se positivo, resultando em maior eficiência do parasitóide (Altieri *et al.*, 1981; Nordlund *et al.*, 1984), sendo que alguns autores relataram índices de parasitismo superiores em monocultivos (Andow & Risch, 1987).

Essas evidências indiretas não permitem assegurar que fontes químicas emitidas pelas plantas estivessem realmente atuando sobre a localização do hospedeiro, visto que as diferenças encontradas entre as eficiências de parasitismo nas culturas poderiam estar ocorrendo devido às características peculiares de cada planta cultivada, como a presença de determinadas estruturas com substâncias aderentes (tricomas) ou pêlos, que estariam limitando o caminhar do parasitóide, reduzindo, assim, sua eficiência na localização do hospedeiro (Rabb & Bradley, 1968; Treacy *et al.*, 1986; Keller, 1987).

No entanto, alguns trabalhos forneceram evidências diretas sobre o efeito de odores de plantas no parasitismo por *Trichogramma*, sejam eles em testes onde plantas foram pulverizadas com determinados extratos vegetais, aumentando o parasitismo (Altieri *et al.*, 1981, 1982; Nordlund *et al.*, 1985ab), ou em testes de olfatômetro, onde se verificou o efeito atrativo ou repelente desses extratos (Bar *et al.*, 1979).

- **Feromônio sexual do hospedeiro:** o efeito do feromônio sexual do hospedeiro sobre o comportamento de localização e utilização do hospedeiro foi observado por Lewis *et al.* (1982), que relataram um aumento do parasitismo de ovos por *Trichogramma* em plantas de algodão pulverizadas com feromônio sintético de *H. zea*. A resposta positiva de outras espécies de *Trichogramma*, aos odores liberados por fêmeas virgens do hospedeiro em estágio de liberação do feromônio sexual, também foi verificada em testes de olfatômetro. No entanto, testes realizados para essas mesmas espécies em túnel de vento demonstraram que *T. evanescens* e *T. pretiosum* não foram atraídos pelo feromônio de *Mamestra brassicae* e *H. zea*, respectivamente (Noldus & van Lenteren, 1985a; Noldus, 1988). Alguns autores verificaram que o efeito sobre os parasitóides se dá pela inibição do vôo pelo fototropismo, levando o parasitóide a permanecer por períodos prolongados na região onde essa fonte química estava presente (Noldus *et al.*, 1988ab).

- **Escamas do hospedeiro:** fontes químicas presentes nas escamas do corpo dos hospedeiros atuam como caimônio de contato, fazendo com que o parasitóide permaneça por um período maior nas áreas em que se encontram. As primeiras observações sobre o efeito de substâncias deixadas pelos hospedeiros no comportamento de parasitismo de

Trichogramma foram realizadas por Laing (1937), que demonstrou que o contato de *T. evanescens* com resíduos de substâncias provenientes de adultos de *S. cerealella* e *M. brassicae* aumentou a permanência desse parasitóide nessas áreas, levando a uma maior taxa de encontro do hospedeiro. Lewis *et al.* (1971) verificaram resultado semelhante para *T. evanescens*, que apresentou maior parasitismo em áreas que continham componentes deixados por fêmeas de *H. zea* e *Plodia interpunctella* em estágio de oviposição. Trabalhos subsequentes verificaram que extratos de escamas do corpo dos adultos dos hospedeiros de *Trichogramma* podiam aumentar o parasitismo em condições de laboratório, casa-de-vegetação e campo. Análises químicas identificaram o composto tricosano como sendo o componente mais ativo para *T. evanescens* (Jones *et al.*, 1973). Outros componentes presentes, como ácidos inorgânicos (Gueldner *et al.*, 1984), dimetil-nonatriacantanos (Shu & Jones, 1988) e hidrocarbonetos saturados (Grenier *et al.*, 1993), também foram relatados como apresentando algum efeito no comportamento de diferentes espécies de *Trichogramma*.

Os componentes químicos presentes nas escamas dos hospedeiros parecem atuar de forma a inibir o vôo e a clinocinese, levando o parasitóide a intensificar a sua procura pelo hospedeiro em áreas contaminadas, aumentando, assim, o sucesso no encontro com o hospedeiro (Beevers *et al.*, 1981; Morrison & Lewis, 1981; Gardner & van Lenteren, 1986; Zaborski *et al.*, 1987; Thomson & Stinner, 1990).

- **Componentes químicos de contato associados ao ovo do hospedeiro:** após a localização de um possível hospedeiro em seu habitat, a fêmea do parasitóide passa para uma segunda etapa do processo de parasitismo, que é a de avaliar várias características (reconhecimento do hospedeiro), até que o hospedeiro seja efetivamente parasitado (aceitação do hospedeiro). No processo de reconhecimento, além dos estímulos físicos, as fêmeas do parasitóide podem utilizar estímulos químicos presentes na superfície dos ovos do hospedeiro. Esses estímulos foram identificados como sendo provenientes de secreções das glândulas acessórias dos adultos, que recobrem o ovo quando depositado sobre o substrato de postura (Ables *et al.*, 1981; Noldus & van Lenteren, 1985b; Nordlund *et al.*, 1987; Pak & Jong, 1987). No entanto, a resposta a esses componentes tem sido variável,

podendo resultar na aceitação ou rejeição do hospedeiro (Pak & Jong, 1987). A origem química da(s) substância(s) envolvida(s) ainda é desconhecida, podendo se tratar, possivelmente, de substâncias protéicas de baixa volatilidade (Nordlund *et al.*, 1987).

2.2.2 Estímulos físicos

Após a localização do hospedeiro, que envolve basicamente estímulos químicos, as fêmeas passam para o reconhecimento do hospedeiro, que envolve diversos estímulos físicos. Nessa etapa do processo de parasitismo é reconhecida a existência do efeito de fatores como: formato, tamanho, textura e cor do hospedeiro, além da emissão de sons ou de movimentos pelo hospedeiro, para diversos parasitóides (Vinson, 1976, 1984).

Para parasitóides do gênero *Trichogramma*, o tamanho do hospedeiro é tido como um dos fatores mais importantes no processo de reconhecimento durante o parasitismo (Salt, 1935; Klomp & Teerink, 1962; Schmidt & Smith, 1985a, 1987a). Porém, vários outros aspectos, como cor, forma e textura do hospedeiro, também foram identificados como fatores que influenciam o reconhecimento e aceitação do hospedeiro (Pak, 1988).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção das populações de parasitóides

Trichogramma galloi Zucchi, 1988 e *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 foram criados em ovos do hospedeiro alternativo, *Anagasta kuehniella* (Zeller), produzido em dietas artificiais à base de farinha de milho (60%) + farinha de trigo integral (40%) ou farinha de trigo integral (97%) + levedura de cerveja (3%) (Parra *et al.*, 1989; Parra, 1997). Ovos do hospedeiro alternativo eram aderidos, com auxílio de goma arábica diluída, em cartolina, inviabilizados em lâmpada germicida e oferecidos aos parasitóides na proporção de 1 fêmea: 10 ovos, por um período de 24 horas. Os ovos parasitados eram mantidos em condições controladas de temperatura ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($60\pm 10\%$) e fotofase de 14 horas.

3.2 Caracterização e duração dos estágios imaturos de desenvolvimento de *T. galloi* e *T. pretiosum*

Para as observações dos estágios de desenvolvimento de *T. galloi* e *T. pretiosum*, ovos de *A. kuehniella* foram submetidos ao parasitismo por um período de 1-2 horas, na proporção de 1:5 e 1:10 (fêmea:ovo), respectivamente. Posteriormente, os ovos foram colocados em câmara climatizada (temperatura: $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; UR: $60\pm 10\%$; fotofase: 14 horas), sendo retirada uma amostra desses ovos a intervalos de 4 horas. Os ovos amostrados foram submetidos ao processo de coloração com azul de toluidina até o desenvolvimento do estágio de prepupa, possível de ser identificado pelo escurecimento característico do córion do ovo do hospedeiro. A partir desse estágio, as observações foram realizadas pela dissecação do ovo parasitado, para a identificação do estágio de desenvolvimento do parasitóide.

O procedimento de coloração (Pizzol, 1978) consistiu na fixação do ovo do

hospedeiro parasitado em Carnoy (etanol:clorofórmio:ácido acético na proporção de 6:3:1), por um período mínimo de 30 minutos. A coloração do material foi realizada em solução saturada de azul de toluidina em álcool etílico (70%), durante 45 minutos. Após a coloração, o material era colocado em álcool etílico 80% acrescido de algumas gotas de ácido acético, por 2 minutos, para que o processo de coloração fosse interrompido. A desidratação do material foi conduzida em gradiente de álcool etílico, passando-se o material por banhos sucessivos em álcool 80% (2 banhos de 15 minutos), 95% (2 banhos de 10 minutos) e absoluto (2 banhos de 10 minutos), com desidratação final sendo feita em tolueno (2 banhos de 10 minutos). Tanto o material corado, como aquele obtido pela dissecação dos ovos do hospedeiro, foram montados em lâminas de microscopia em bálsamo-do-Canadá e observados em microscopia ótica. Ovos do hospedeiro, após diferentes intervalos de parasitismo (0, 12, 24 e 30 horas), foram submetidos à técnica de esfregaço e corados com safranina, para a melhor visualização dos estágios de ovo e primeiro ínstar larval ou embrião livre.

3.3 Desenvolvimento de um "ovo artificial"

3.3.1 Estrutura da antena de fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum*

Fêmeas recém-emergidas de *T. galloi* e *T. pretiosum* foram mortas em vapor de éter e fixadas em solução de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato de sódio (pH 7,2; 0,1M), por um período mínimo de 2 horas. Posteriormente, os insetos foram desidratados em gradiente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%), em banhos sucessivos de 15 minutos. A desidratação final foi feita em aparelho de secagem ao ponto crítico (Balzers Critical Point Dryer CPD 030) com CO₂. Após a desidratação final, os insetos foram montados em fita adesiva de carbono de dupla face, colocada sobre um suporte metálico ("stub") para microscopia eletrônica de varredura (MEV). Esses insetos foram cobertos com uma fina camada de ouro (Sputtering Balzers Union Med 010) e levados ao MEV (Zeiss DSM 940A) para as observações. As observações ao MEV foram conduzidas com corrente de emissão de 0,80 µA, corrente do filamento de 3,50 A e voltagem de aceleração entre 5-15 kV.

As estruturas identificadas nas antenas de fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum* foram classificadas de acordo com a sua morfologia externa, seguindo a terminologia de Snodgrass

(1935) e Zacharuk (1980). As denominações específicas adotadas para os sensilos das antenas das fêmeas dos parasitóides estudados foram baseadas no trabalho de Olson & Andow (1993).

3.3.2 Estrutura do ovipositor de fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum*

Fêmeas dos parasitóides foram submetidas aos processos de fixação e desidratação semelhantes aos descritos em 3.3.1, para as observações da morfologia externa da genitália. Esse mesmo procedimento permitiu a observação de algumas características da porção distal do ovipositor desses insetos, quando o ovipositor permanecia colocado externamente à sua bainha, após o procedimento de preparo. No entanto, para observações detalhadas do ovipositor desses parasitóides, fêmeas recém-emergidas eram mortas em vapor de éter, coladas em posição ventral sobre uma lâmina de microscopia ótica, para a dissecação do ovipositor em microscópio estereoscópico. A extremidade proximal do ovipositor era então colocada sobre uma gotícula de cola em uma lamínula, a qual era posteriormente posicionada sobre a fita de carbono do "stub". O material era recoberto com uma fina camada de ouro e observado no MEV. Observações realizadas com corrente de emissão de 0,80 μ A, corrente do filamento de 3,50 A e voltagem entre 5-15 kV.

Para a realização de observações em microscopia eletrônica de transmissão, as fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum* foram fixadas em solução de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato de sódio (pH 7,2; 0,1M), por um período mínimo de 2 horas. Após a fixação o material passou por 2 banhos sucessivos de 10 minutos em tampão fosfato e 2 banhos em tampão cacodilato (pH 7,2; 0,05M) e foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato, por 2 horas. O material foi lavado em água destilada e desidratado em gradiente de acetona (30% a 100%), e emblocado em resina "spurr". Cortes ultrafinos (cortes de 60-70 nm - Reichert Ultracut E) foram montados em tela de cobre (200 mesh) e contrastados com acetato de uranila a 3% e citrato de chumbo.

3.3.3 Avaliação (tamanho, volume, espessura e estrutura do córion) de ovos dos hospedeiros naturais e alternativos de *T. galloi* e *T. pretiosum*

Ovos de 0-24 horas de idade dos hospedeiros alternativos, *Sitotroga cerealella* (Oliv.), *A. kuehniella* e *Corcyra cephalonica* (Stainton), e dos naturais, *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (hospedeiro de *T. galloi*), *Heliothis virescens* Fabr., *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (hospedeiros de *T. pretiosum*), foram montados diretamente sobre o "stub", cobertos com ouro e observados em MEV, para que fossem realizadas as medições das suas dimensões (maior comprimento e largura). Esse procedimento também permitiu a observação das características estruturais da superfície do córion desses ovos. As observações foram realizadas com corrente de emissão de 0,80 μ A, corrente do filamento de 3,50 A e voltagem entre 5-10 kV.

Com os valores de comprimento e largura dos ovos dos diversos hospedeiros estudados, foi possível o cálculo do seu volume aproximado. Para ovos de *H. virescens* foi utilizada a expressão de cálculo de volume de um cilindro, dada por $V = \pi.r^2.h$, e para os demais hospedeiros, utilizou-se a expressão $V = 4/3\pi ab^2$, empregada para o cálculo do volume do elipsóide de revolução, onde V = volume; r = raio; h = altura; a = 1/2 do maior comprimento e b = 1/2 do menor comprimento (Pimentel Gomes & Nogueira, 1980).

A estrutura fina do córion dos diversos hospedeiros de *T. galloi* e *T. pretiosum* abordados nesse estudo foi verificada em microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para isso, ovos recém-colocados (0-24 horas de idade) de cada hospedeiro foram perfurados com um fino estilete em solução tampão de cacodilato (pH 7,2; 0,05M) e transferidos para fixador de paraformaldeído (2%) + glutaraldeído (2,5%) em tampão cacodilato (pH 7,2; 0,05M), com cloreto de cálcio (CaCl_2) a 0,001M, por um período mínimo de 24 h. A seguir, o material foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) por 2 horas, desidratado em gradiente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e incluídos em resina plástica ("spurr"). Cortes ultrafinos (cortes de 60-70 nm - Reichert Ultracut E) foram montados em tela de cobre (200 mesh), contrastados com acetato de uranila (3%) e citrato de chumbo. As observações foram realizadas ao MET Zeiss EM 900, com corrente de 50 e 80 kV.

3.3.4 Estudo do comportamento de parasitismo de *T. galloi* e *T. pretiosum*

O comportamento de parasitismo de *T. galloi* e *T. pretiosum* foi estudado para os diferentes hospedeiros alternativos e naturais anteriormente mencionados (item 3.3.3). Para esse estudo, fêmeas “naives” com 0-24 horas de idade foram individualizadas em tubos de vidro (3,0 x 0,8 cm). A essas fêmeas foi oferecido um cartão (2,5 x 0,5 cm) contendo cinco ovos (0-24 horas de desenvolvimento embrionário) do hospedeiro em estudo, aderidos à sua região central. Esse tubo de vidro era colocado sob um microscópio estereoscópico (Leica - Wild M10) acoplado a um sistema de vídeo-camera (CCD Camera - AS), sendo o comportamento da fêmea do parasitóide observado por 35 minutos. Fêmeas que não entraram em contato com o hospedeiro durante os 15 minutos iniciais foram consideradas inativas e, para aquelas que efetuaram o contato com o hospedeiro, mas não prosseguiram com o comportamento de parasitismo, foi assumida a rejeição do hospedeiro. Foram observados o tempo gasto em cada etapa do parasitismo do ovo hospedeiro, sendo anotado o tempo para o encontro do primeiro hospedeiro e o tempo de avaliação, perfuração e oviposição para os três primeiros ovos parasitados. Também foi verificada a ocorrência ou não da alimentação do adulto sobre o hospedeiro e da marcação desse ovo. Foram realizadas de 15 a 20 repetições por tratamento, sendo cada fêmea do parasitóide considerada uma repetição.

3.3.5 Confeção do "ovo artificial"

3.3.5.1 Seleção do polímero plástico

Para a confecção dos "ovos artificiais" foram utilizadas membranas plásticas de diversas espessuras de polietileno (60, 50, 9-10, 8-9 e 7-8 μm), polipropileno (40, 30, 20 e 12-13 μm) e poliestireno (12-15 μm), facilmente encontradas no mercado. Essas películas foram submetidas a um processo térmico de deformação, para que fossem produzidas depressões semi-esféricas em sua superfície (Figura 1). Esse processo de deformação térmica consistia no aquecimento de uma placa metálica, onde se colocava o filme plástico a ser deformado. Essa placa metálica apresenta um disco removível em sua região central, com 64 perfurações. Abaixo desse disco removível existe uma campânula ligada a uma bomba de vácuo. Assim, após a colocação do filme plástico sobre a placa aquecida, acionava-se a bomba de

vácuo, formando, dessa forma, uma pressão negativa no interior da campânula, forçando o filme plástico a se expandir para o interior dos orifícios da placa, o que permitia a impressão de depressões semi-esféricas no plástico utilizado (Figura 1).

Os ovos assim confeccionados eram transferidos para capela de fluxo laminar, onde a sua superfície interna (parte côncava) era exposta ao tratamento com lâmpada germicida durante 3-5 minutos. Esses ovos eram então colocados sobre a porção inferior de uma placa plástica, com a parte convexa dos ovos voltada para o interior da mesma, onde se encontravam as fêmeas dos parasitóides (6 fêmeas: "ovo artificial"). A porção côncava das depressões semi-esféricas era preenchida com hemolinfa de lagartas de último instar de *Helicoverpa zea* (Boddie), diluída a 70% em água destilada (concentração utilizada nas dietas artificiais), e a porção superior da placa plástica era utilizada para fechar o conjunto (Figura 2). Os parasitóides permaneciam em contato com os "ovos artificiais" por 24 horas, quando então era feita a avaliação do parasitismo, retirando-se a hemolinfa, utilizada como estimulante de oviposição, com o auxílio de uma micro-pipeta para a posterior contagem do número de ovos do parasitóide por "ovo artificial" em microscópio ótico. Foram amostrados 16 dos 64 "ovos artificiais" de cada cartela plástica para a avaliação do parasitismo por *T. galloi* e *T. pretiosum*.

3.3.5.2 Determinação da proporção ideal de fêmeas dos parasitóides por "ovo artificial"

A proporção ideal de fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum* a ser utilizada para o parasitismo de "ovos artificiais" foi avaliada utilizando-se fêmeas recém-emergidas dos parasitóides nas proporções de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 e 6:1 (fêmeas:ovo). Os ovos artificiais foram confeccionados de forma semelhante ao procedimento descrito no item 3.3.5.1, sendo utilizado filme plástico de polietileno de 9-10 μm de espessura, com o disco contendo orifícios de 4 mm de diâmetro. As avaliações de parasitismo foram realizadas através da contagem do número de ovos dos parasitóides por "ovo artificial" em microscópio ótico, após intervalo de parasitismo de 24 horas.

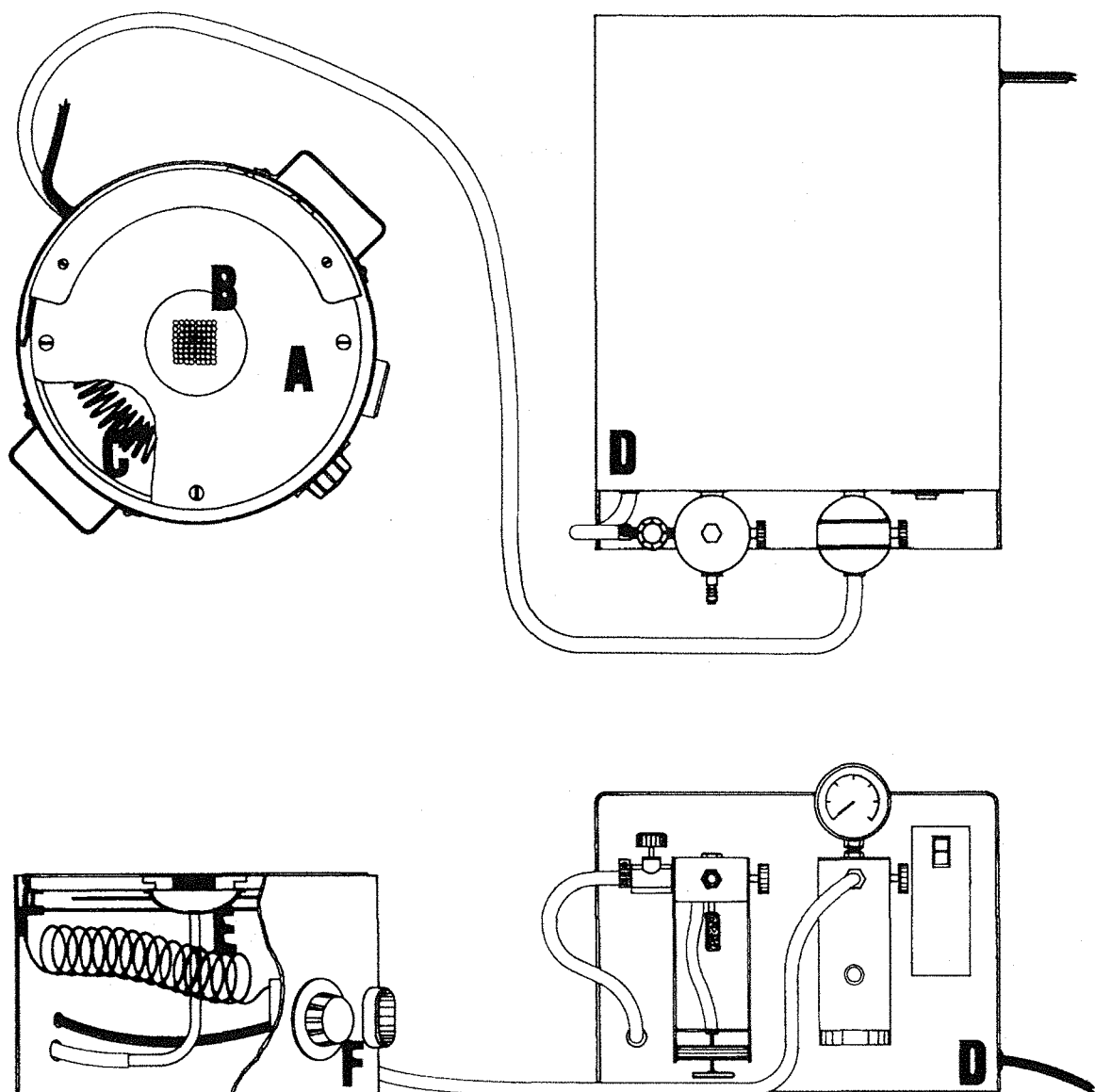


Figura 1. Aparelho utilizado na confecção de "ovos artificiais" para a criação *in vitro* de *Trichogramma* spp. A = placa metálica; B = disco removível; C = resistência; D = bomba de vácuo; E = campânula; F = termostato.

Para se determinar o número de parasitóides adequado por unidade de volume da dieta (1 μ l), que seria utilizado para selecionar a melhor proporção de fêmeas a ser utilizada no parasitismo de ovos artificiais, foi calculado o número de parasitóides que poderia se desenvolver com sucesso em 1 μ l de dieta, utilizando o volume do menor e do maior hospedeiro utilizados por esses parasitóides. Nesse cálculo ainda foi levado em consideração o menor e o maior número de parasitóides que utilizam esses hospedeiros, o que permitiu determinar os limites inferior e superior de parasitóides que poderiam se desenvolver com sucesso no volume de dieta estudado, evitando o excesso ou a falta de dieta ao final do desenvolvimento larval desses insetos.

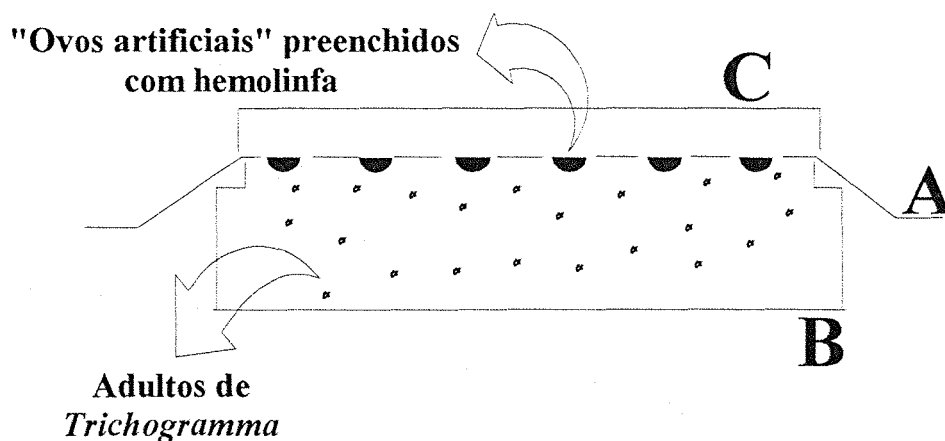


Figura 2. Ilustração do recipiente utilizado para o parasitismo de "ovos artificiais" por *Trichogramma* (A = filme plástico com "ovos artificiais"; B = porção inferior da placa plástica; C = porção superior da placa plástica).

3.3.5.3 Determinação do efeito do tamanho do "ovo artificial" no parasitismo por *T. galloi* e *T. pretiosum*

Para a confecção de "ovos artificiais" de diferentes tamanhos, foram utilizados diversos discos metálicos contendo perfurações de diâmetro variável de 1, 2, 3, 4 e 5 mm. Esses discos metálicos podem ser removidos do aparelho descrito em 3.3.5.1, permitindo,

assim, a confecção de depressões semi-esféricas de diferentes tamanhos (Figura 1). Após a seleção do disco metálico a ser utilizado, todo o procedimento de preparo do "ovo artificial" e a avaliação do parasitismo foram feitos de forma idêntica à descrita em 3.3.5.1. Para esses testes foi utilizada a película de polietileno de 9-10 μm de espessura.

3.4 Criação dos insetos a serem utilizados como fonte de hemolinfa ou holotécidos para a confecção de dietas artificiais

Foram criadas *Helicoverpa zea*, *Anticarsia gemmatalis*, *Diatraea saccharalis* e *Bombyx mori* L. para servirem como fonte de hemolinfa ou de holotécidos pupais para a confecção de dietas artificiais a serem utilizadas na criação *in vitro* de *T. galloi* e *T. pretiosum*.

H. zea, *A. gemmatalis* e *D. saccharalis* foram criadas em condições controladas (temperatura: $25\pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60\pm 10\%$; fotofase: 14 h.), utilizando-se meios artificiais como fonte alimentar, enquanto *B. mori* foi criada em folhas de híbridos de amoreira. Assim, *H. zea* foi criada em dieta à base de feijão, germe de trigo e levedura de cerveja (Burton, 1969); *A. gemmatalis* foi mantida em dieta contendo feijão, germe de trigo, caseína e levedura de cerveja como fontes protéicas (Greene *et al.*, 1976); *D. saccharalis* foi produzida em dieta à base de farelo de soja e germe de trigo (Macedo *et al.*, 1983).

3.5 Coleta dos componentes derivados de insetos a serem utilizados no preparo de dietas artificiais

3.5.1 Coleta de hemolinfa

A hemolinfa foi coletada apenas de lagartas de último ínstar de *H. zea* e *B. mori*. O procedimento de coleta do material foi idêntico ao descrito por Parra & Cònsoli (1992), consistindo do tratamento térmico das lagartas ($60-62^\circ\text{C}$, durante 12-15 minutos), para evitar a melanização da hemolinfa. Posteriormente, as lagartas foram esterilizadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio a 2% (10 minutos). As lagartas eram então transferidas para o interior de uma capela de fluxo laminar, tendo um par de falsas pernas cortado, sendo a hemolinfa coletada com o auxílio de uma seringa descartável. O material coletado era imediatamente utilizado ou armazenado à temperatura de -18°C até a confecção das dietas.

3.5.2 Coleta de holotécidos pupais

A. gemmatalis, *D. saccharalis* e *B. mori* foram utilizadas para a obtenção de holotécidos pupais.

Pupas dos insetos eram submetidas a tratamento térmico idêntico ao utilizado para a inativação das fenoloxidasas, enzimas responsáveis pela melanização da hemolinfa, descrito no item anterior (3.5.1). Em seguida, o material era esterilizado superficialmente utilizando-se solução de hipoclorito de sódio (2%, durante 10 minutos). Após esse tratamento, os holotécidos desses insetos foram obtidos das seguintes formas:

1) as pupas eram colocadas dentro de uma seringa descartável de 10 ml e comprimidas com o auxílio do êmbolo, sendo o líquido obtido coletado em recipiente adequado;

2) as pupas foram colocadas em estufa a 60°C até atingirem peso constante, sendo posteriormente trituradas com o auxílio de uma bastão de vidro.

Ambos os materiais foram utilizados logo após a sua obtenção ou armazenados a -18°C até o momento do preparo das dietas.

3.6 Preparo de dietas artificiais para a criação *in vitro*

Para a confecção de dietas artificiais para a criação *in vitro* de *T. galloi* e *T. pretiosum*, a hemolinfa e os holotécidos foram preparados de diversas formas, sendo identificados como:

- *Hemolinfa*: a hemolinfa de lagartas de *H. zea* e *B. mori* foram centrifugadas (1.000 rpm, durante 1 minuto) e o sobrenadante foi filtrado em filtro Millipore de 0,22 µm para a eliminação de possíveis agentes contaminantes;

- *Holotécidos pupais*: holotécidos pupais de *A. gemmatalis*, *D. saccharalis* e *B. mori* coletados após as pupas serem comprimidas em seringa, foram utilizados da forma como coletado;

- *Centrifugado de holotécidos pupais*: holotécidos coletados de pupas comprimidas em seringa descartável e que foram centrifugados (2.000 rpm, durante 1 minuto). O material precipitado foi descartado, sendo utilizado apenas o sobrenadante. A seguir, esse material foi

filtrado em diversos filtros de tamanho distintos, até ser possível a utilização de filtro Millipore de 0,22 μm ;

- *Suspensão de holotécidos pupais*: os holotécidos obtidos na forma de farinha foram ressuspensos em água destilada na proporção de 1:8 (p/v) e agitados até que se obtivesse uma suspensão de coloração turva. Posteriormente, o mesmo era centrifugado por 1 minuto a 1.000 rpm, sendo o sobrenadante filtrado várias vezes até passar por filtragem em filtro Millipore de 0,22 μm .

Esses componentes, adicionados a outros nutrientes, variando as proporções entre os mesmos, permitiram a confecção de várias dietas artificiais para a criação *in vitro* de *T. galloi* e *T. pretiosum* (Tabela 2). Todo o procedimento de preparo das dietas foi realizado em capela de fluxo laminar mantendo as condições assépticas do meio.

3.7 Avaliação das dietas artificiais para a criação *in vitro* de *T. galloi* e *T. pretiosum*

As dietas foram avaliadas utilizando-se "ovos artificiais" de 5 mm de diâmetro, confeccionados com películas de polietileno de 9-10 μm de espessura, conforme descrito em 3.3.5.1. Cartelas plásticas, contendo 64 "ovos artificiais", foram submetidas ao parasitismo na proporção de 1 "ovo artificial": 5 fêmeas do parasitóide, durante o período de 24 horas. Em cada "ovo artificial" foi colocado 1 μl da dieta artificial estudada. O parasitismo foi conduzido em condições semelhantes àquela descrita no item 3.3.5.1. Após o período de parasitismo, as fêmeas dos parasitóides eram eliminadas e o material acondicionado em câmara climatizada (temperatura: $25\pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60\pm 10\%$; fotofase: 14 horas) para o acompanhamento do desenvolvimento dos parasitóides. Cada tratamento consistiu de 5 repetições, sendo cada cartela de 64 "ovos artificiais" considerada como uma repetição.

Para avaliar o número inicial de ovos dos parasitóides depositados por "ovo artificial", bem como a qualidade do meio artificial como estimulante de oviposição do parasitóide, foram amostrados 16 "ovos artificiais"/repetição logo após o término do período de parasitismo. A dieta amostrada, contendo os ovos do parasitóide, foi colocada sobre uma lâmina de microscopia e levada ao microscópio óptico para a contagem do número de ovos.

Tabela 2. Composição (%) das dietas artificiais utilizadas para a criação *in vitro* de *T. galloi* e *T. pretiosum*.

	DIETAS																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Hemolinfa																				
- <i>H. zea</i>	-	-	-	-	70	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	20	-
- <i>B. mori</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Suspensão de holotocidos pupais																				
- <i>B. mori</i>	60	70	40	20	-	40	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- <i>D. saccharalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	70	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- <i>A. gemmatalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Holotocidos pupais																				
- <i>B. mori</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70	-	-	-
- <i>D. saccharalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70	-	-	-	-	-	-
Centrifugado de holotocidos pupais																				
- <i>B. mori</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70	50	-	-	-	-
- <i>D. saccharalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70	50	-	-	-	-	-	-	-
gema de ovo	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
soro feral bovino	10	10	10	20	10	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	30
meio de Grace	10	-	20	20	-	10	10	-	10	-	10	-	10	-	10	-	10	-	10	30
hidrolisado de proteínas do milho	-	-	10	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yeastolate ^R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
solução de extrato de levedura	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hidrolisado de lactalbumina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mistura nutritiva F12K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
anticonstaminantes ¹	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

1. anticontaminantes: dietas 1 a 32: estreptomina

Tabela 2. Composição (%) das dietas artificiais utilizadas para a criação *in vitro* de *T. galloi* e *T. pretiosum* (Cont.).

	DIETAS																
	21	22	23 ²	24 ²	25 ²	26 ²	27 ³	28	29 ³	30 ³	31 ³	32 ³	33	34	35	36 ⁴	37 ⁴
Hemolinfa																	
- <i>H. zea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- <i>B. mori</i>	70	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Suspensão de holotécidos pupais																	
- <i>B. mori</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- <i>D. saccharalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- <i>A. gemmatilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Holotécidos pupais																	
- <i>B. mori</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- <i>D. saccharalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Centrifugado de holotécidos pupais																	
- <i>B. mori</i>	-	-	70	50	64	50	50	-	52	52	60	60	-	-	-	-	-
- <i>D. saccharalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	50	-	-	-	-	65	65	55	65	65
gema de ovo	20	20	20	20	18	20	20	20	15	14	16	16	18	18	15	18	18
soro fetal bovino	10	20	10	20	18	20	20	20	11	6,8	8	12	8,5	8,5	7,6	8,5	8,5
meio de Grace	-	10	-	10	-	10	-	10	-	6,8	8	-	-	-	-	-	-
hidrolisado de proteínas do milho	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yeastolate ^R	-	-	-	-	-	-	10	-	-	6,8	-	12	-	-	-	-	-
solução de extrato de levedura	-	-	-	-	-	-	-	-	11	6,8	8	-	8,5	-	7,4	8,5	-
hidrolisado de lactalbumina	-	-	-	-	-	-	-	-	11	6,8	-	-	-	8,5	7,6	-	8,5
mistura nutritiva F12K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,4	-	-
anticonstaminantes	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3

1. Anticonstaminantes: dietas 1 a 32: estreptomina; dietas 33 a 37: 0,15% de estreptomina + 0,15% de anfotericina B; 2. Pupas com 10 dias de idade, após o início da formação do casulo; 3. Pupas com 2 a 7 dias de idade, após a formação do casulo; 4. Centrifugação a 1.200 rpm.

Os 48 "ovos artificiais" restantes, para cada repetição, foram utilizados para avaliar o número de larvas maduras, viabilidade (%) larval e pupal e porcentagem de adultos deformados. Assim, a média de cada repetição foi dada pela média dos 48 "ovos artificiais".

3.8 Qualidade dos insetos produzidos *in vitro* versus *in vivo*

A qualidade dos parasitóides criados *in vitro* foi avaliada observando-se aspectos da sua biologia (capacidade de parasitismo, agressividade e longevidade), do seu comportamento de parasitismo e morfologia (tamanho), comparados aos dos insetos criados *in vivo*.

A capacidade de parasitismo de *T. galloi* e *T. pretiosum* criados em dieta artificial foi avaliada utilizando-se 25 fêmeas recém-emergidas desses insetos. As fêmeas eram individualizadas em tubos de vidro (8,5 x 2,5 cm) e alimentadas com gotícula de mel puro, depositada na lateral do tubo. O parasitismo foi avaliado em condições controladas (temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas) oferecendo-se ovos (0-24 h de desenvolvimento embrionário) do hospedeiro alternativo, *A. kuehniella*. Os ovos do hospedeiro alternativo, após serem colados, com auxílio de goma-arábica, a uma área de 0,25 cm² de cartões de 4,0 x 0,5 cm, correspondendo, aproximadamente, a 100-120 ovos, eram esterilizados com luz ultra-violeta (Stein & Parra, 1987). Os cartões contendo ovos do hospedeiro eram trocados diariamente, acompanhando-se também a longevidade das fêmeas.

O comportamento de parasitismo dos insetos criados *in vitro* foi avaliado utilizando-se ovos dos respectivos hospedeiros naturais, *D. saccharalis* para *T. galloi* e *H. virescens* para *T. pretiosum*. O método de estudo empregado foi previamente descrito no item 3.3.4, quando foi avaliado o comportamento de parasitismo desses parasitóides em diversos hospedeiros. Nesse caso, o tempo de observação foi de 30 minutos, assumindo-se os mesmos parâmetros descritos no item 3.3.4 para a classificação de fêmeas como inativas ou da rejeição do hospedeiro. A agressividade (período que o parasitóide leva para parasitar o maior número de hospedeiros, isto é, quanto menor o período que o parasitóide gastar para parasitar o maior número de ovos, maior será a sua agressividade) foi avaliada utilizando-se dos dados fornecidos pelo estudo de comportamento. Esse parâmetro foi medido observando-se a porcentagem média acumulada de parasitismo durante o período de observação, dividindo o

mesmo em três períodos: de 0 a 10 minutos, de 10 a 20 minutos e de 20 a 30 minutos.

O tamanho dos adultos oriundos das diferentes dietas foi calculado através de medições da tibia posterior dos mesmos (Bigler *et al.*, 1987; Parra *et al.*, 1997). Para essas medições, adultos recém-emergidos foram fixados em álcool etílico 60% por 24 horas, desidratados em banhos sucessivos (10 minutos/cada) em gradiente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e desidratação final em aparelho de ponto crítico. Na seqüência o material foi montado sobre fita de carbono em suporte metálico apropriado ("stub"), metalizado e observado em microscópio eletrônico de varredura, processando-se então as medições.

Todos esses parâmetros também foram observados para parasitóides criados no hospedeiro alternativo, *A. kuehniella*, servindo como fonte de comparação.

3.9 Efeito da idade da pupa do hospedeiro, no momento da coleta de holotécidos, na qualidade do meio artificial

Para se verificar se a idade da pupa do hospedeiro, da qual se coletavam os holotécidos pupais, poderia estar influenciando a qualidade nutricional do meio desenvolvido para a criação *in vitro* de *T. galloi* e *T. pretiosum*, foram testadas dietas utilizando pupas de *D. saccharalis* de três intervalos de idade distintas. Assim, pupas de *D. saccharalis* foram agrupadas nos intervalos de idade de 1-2, 3-4 e 5-6 dias, sendo processadas de forma análoga àquela descrita no item 3.6, para a coleta de holotécidos pupais. Esses tecidos foram adicionados aos demais componentes utilizados na preparação da dieta 34, e os experimentos para a avaliação da qualidade dessas dietas foram conduzidos como descrito em 3.7. Foram avaliados os parâmetros: porcentagem de parasitismo, número de ovos do parasitóide depositados por ovo artificial, viabilidade larval e pupal, capacidade de parasitismo, tamanho e deformações dos adultos.

3.10 Parasitismo de ovos artificiais por diferentes linhagens de *T. pretiosum*

A aceitação de ovos artificiais para o parasitismo por *T. pretiosum* foi avaliada utilizando-se três outras linhagens em comparação àquela que já vinha sendo utilizada (linhagem 2 - L2). As linhagens estudadas foram: L1 (hospedeiro: *H. zea*, cultura: tomateiro,

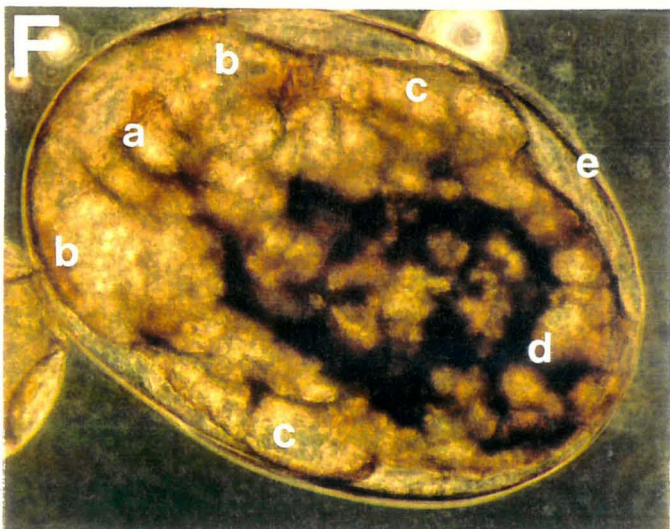
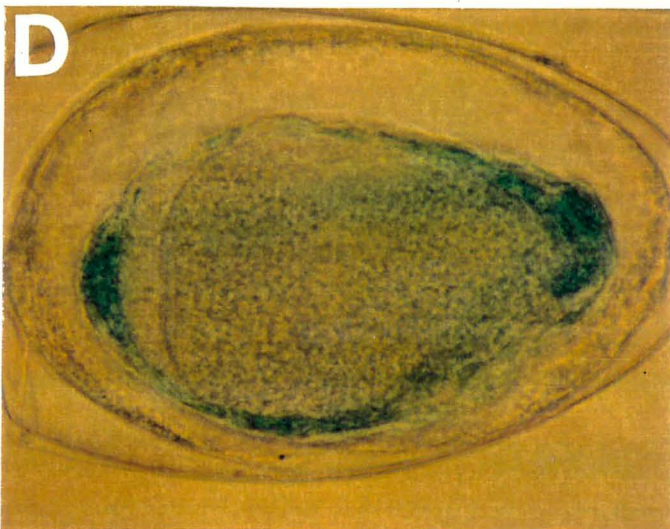
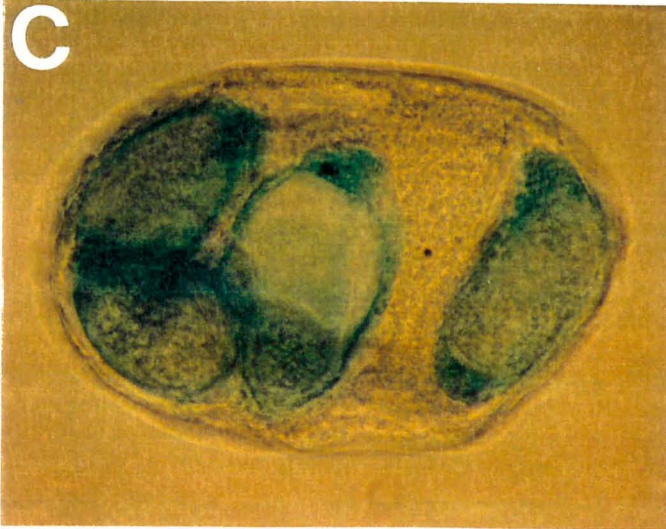
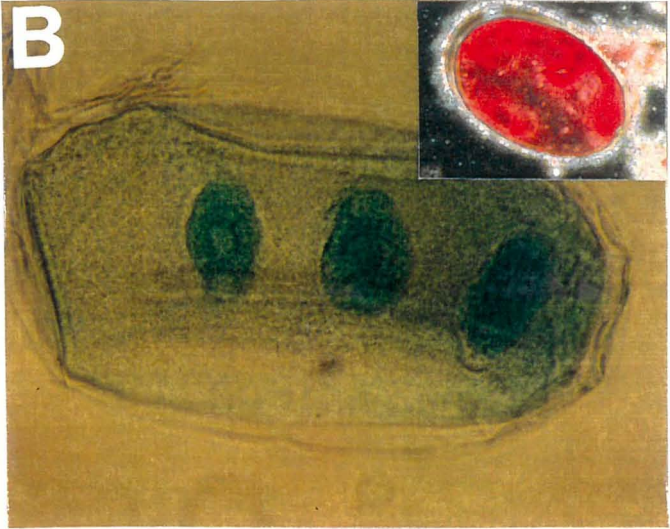
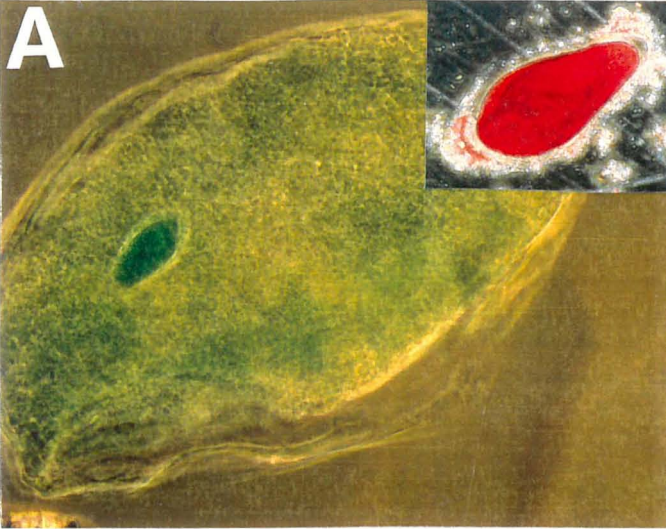
local: Alegre/ES, razão sexual: 1 - linhagem telítoca), L2 (hospedeiro: *H. zea*, cultura: milho, local: Jaguariúna/SP, razão sexual: 1 - linhagem telítoca), L4 (hospedeiro: *H. zea*, cultura: tomateiro, local: Jerônimo Monteiro/ES, razão sexual: 0,95) e L8 (hospedeiro: *H. zea*, cultura: milho, local: Piracicaba/SP, razão sexual: 0,66), normalmente mantidas na coleção de linhagens do Laboratório de Biologia - ESALQ/USP. A proporção de fêmeas utilizada por ovo artificial nesse experimento foi idêntica àquela determinada para a linhagem L2, nos estudos descritos no item 3.3.5.2. Além da aceitação de ovos artificiais, medida pela porcentagem de ovos parasitados e pelo número de ovos depositados/ovo artificial, também foi avaliada a variação na sobrevivência durante o desenvolvimento imaturo dessas linhagens quando criadas em dieta artificial. Para esse teste foi utilizada a dieta 34, composta de holotecidos pupais de *D. saccharalis* (65%), gema de ovo (18%), soro fetal bovino (8,5%), hidrolisado de lactoalbumina (8,5%) e anticontaminantes (0,3%). A confecção da dieta e a condução do experimento seguiram método descrito anteriormente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização e duração dos estágios imaturos de desenvolvimento de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 e *T. pretiosum* Riley, 1879

O desenvolvimento dos estágios imaturos de *T. galloi* e *T. pretiosum* não apresentou diferenças ao microscópio ótico, assemelhando-se a outras espécies de *Trichogramma* quanto ao aspecto geral dos estágios de desenvolvimento (Flanders, 1937; Krishnamurti, 1937; Clausen, 1940; Chumakova, 1968; Pak & Oatman, 1982; Volkoff *et al.*, 1995).

A duração dos períodos de ovo e de larva de *T. galloi* e *T. pretiosum* foi avaliada conjuntamente, devido ao rápido desenvolvimento da fase de ovo e às incertezas, ainda existentes, quanto a caracterização do início do estágio larval (Volkoff *et al.*, 1995). A duração do período ovo-larva para *T. galloi* e *T. pretiosum* foi de 2,8 e 2,9 dias, respectivamente. O ovo de ambas as espécies de parasitóides apresentou formato fusiforme (Figura 3A), aumentando o seu tamanho durante o desenvolvimento embrionário, até a eclosão de um segundo estágio de desenvolvimento, de formato oval (Figura 3B). A denominação desse estágio de desenvolvimento ainda não é consenso, podendo ser considerado larva de primeiro ínstar ou um estágio denominado de embrião livre (Volkoff *et al.*, 1995). Com o desenvolvimento do parasitóide, os estágios larvais mais adiantados vão assumindo formatos distintos, como o vermiforme e o piriforme (Figura 3C-D). A identificação do número de ínstars larvais em *Trichogramma* tem sido realizada pela determinação do tamanho da mandíbula dos mesmos, sendo, por isso, sugerida a existência de um número variável de 3 a 4 ínstars (Flanders, 1937; Krishnamurti, 1937; Clausen, 1940; Chumakova, 1968; Pak & Oatman, 1982). No entanto, estudos mais detalhados, utilizando técnicas de microscopia eletrônica, verificaram que não ocorre crescimento da mandíbula



durante o desenvolvimento larval. A larva recém-eclodida já apresenta a sua mandíbula completamente desenvolvida, sendo que, parte dela encontra-se retraída. A sua completa exposição será alcançada ao final do desenvolvimento larval, quando a larva atinge o seu crescimento máximo (Volkoff *et al.*, 1995; Dahlan & Gordh, 1996). Outra observação que tem sugerido a existência de um único ínstar é a localização de apenas um tegumento aderido ao corpo da larva, que se refere ao córion, pois não foi verificada a presença de mandíbulas nesse tegumento (Dahlan & Gordh, 1996).

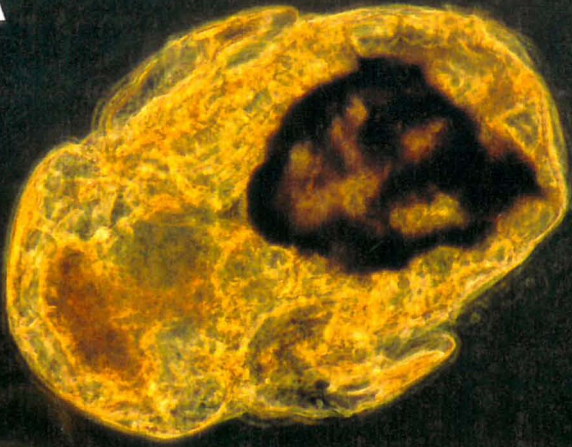
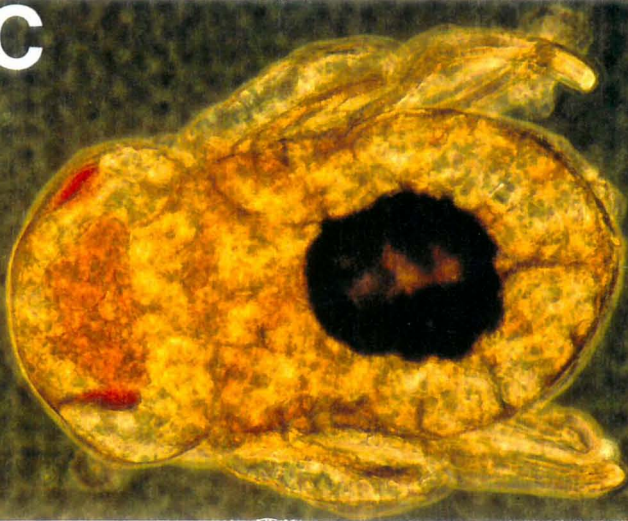
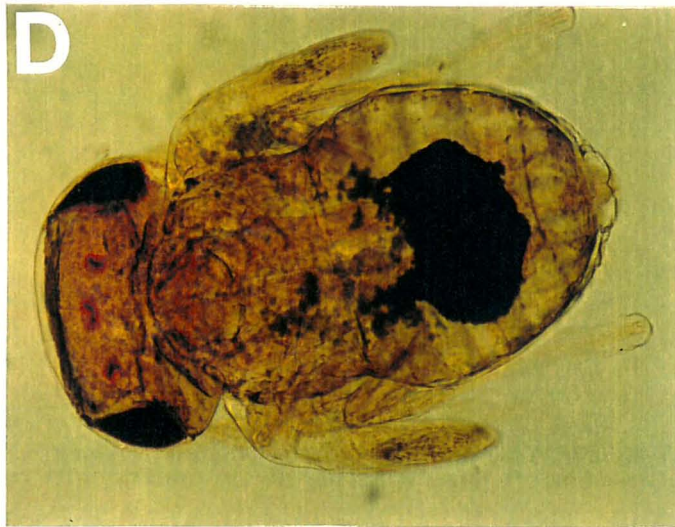
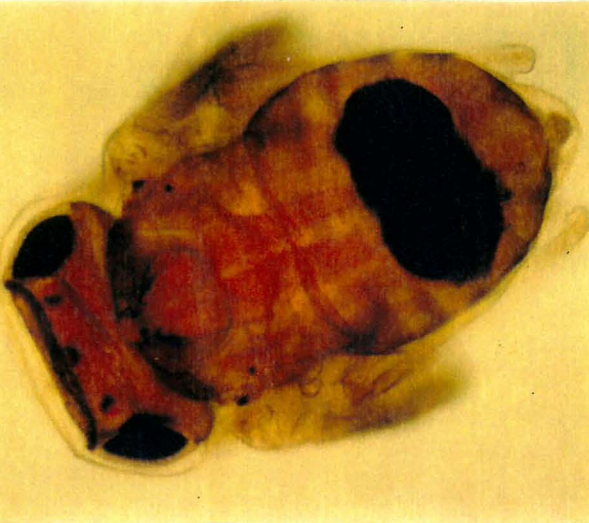
A fase de pré-pupa pode ser facilmente caracterizada pela presença do acúmulo de sais de urato, que são observados através de todo o tegumento do inseto (Figura 3E). Durante o desenvolvimento desse estágio, já se pode visualizar no seu interior, onde está se formando a pupa farata, o início da segmentação da cabeça e a formação dos olhos e dos apêndices alares (Figura 3F). Esse estágio apresentou duração de 2,5 e 1,4 dias para *T. galloi* e *T. pretiosum*, respectivamente.

O estágio de pupa foi o mais longo para ambos os parasitóides, com duração de 5,2 dias para *T. galloi* e de 6,1 dias para *T. pretiosum*. A pupa, do tipo livre, apresenta segmentação do corpo bem definida, com olhos e ocelos inicialmente de coloração rósea, assumindo, posteriormente, coloração vermelha. A coloração do inseto vai se tornando mais escura à medida que o seu desenvolvimento avança, devido à esclerotização da cutícula. Os sais de urato, que durante o período inicial do desenvolvimento da prepupa encontravam-se dispersos pelo tegumento e que ao final desse estágio já começavam a se concentrar, estão localizados na região central do abdome da pupa, formando uma massa única escura (Figura 4A-F).

4.2 Estrutura da antena de fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum*

Foram encontradas seis estruturas sensilares morfológicamente distintas, uma estrutura setiforme e uma estrutura parecida a um sensilo campaniforme nas antenas de *T. galloi* e *T. pretiosum*. A estrutura geral da antena das fêmeas desses parasitóides é idêntica àquela descrita para outras espécies de *Trichogramma* (Voegelé *et al.*, 1975; Olson & Andow, 1993).

Figura 4. Desenvolvimento do estágio de pupa de *T. galloi* e *T. pretiosum*. A-F mostram o escurecimento gradual do tegumento e a concentração dos sais de urato na região central do abdome das pupas, além de ilustrar o desenvolvimento dos apêndices do parasitóide.

A**B****C****D****E****F**

Antena:

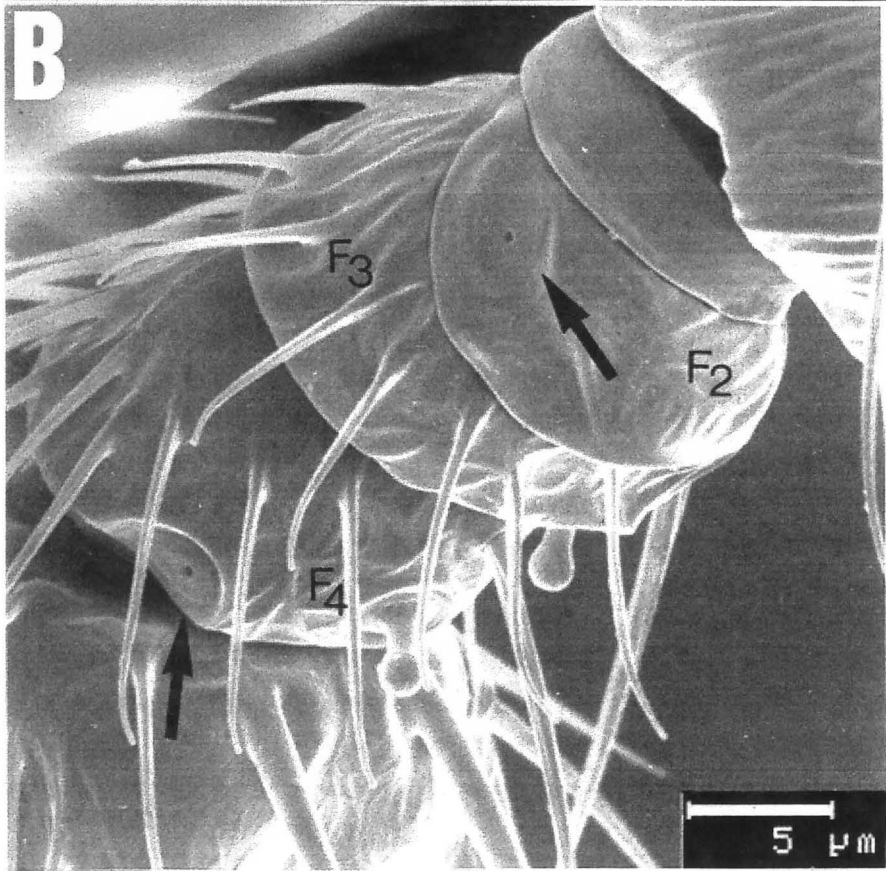
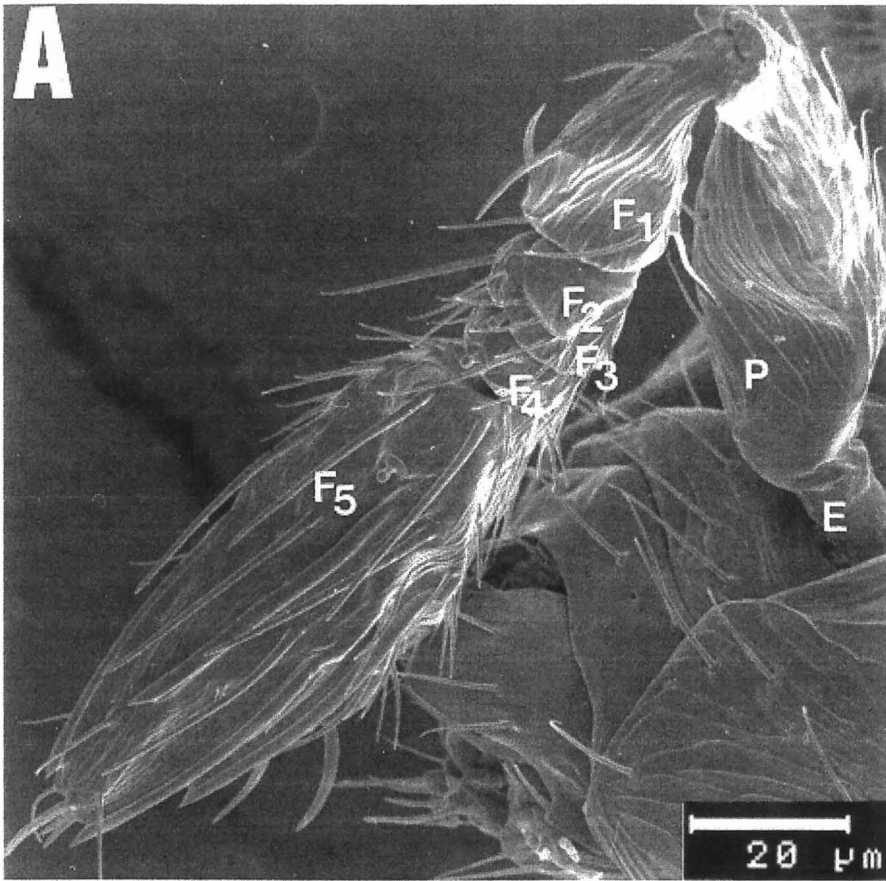
A antena de fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum* é composta por sete segmentos, divididos em escapo, pedicelo e flagelo (com cinco flagelômeros). O primeiro segmento do flagelo é cilíndrico, curto e levemente mais comprido do que largo. O segmento seguinte é de tamanho reduzido e, quando visto lateralmente, sobrepõe, em parte, o terceiro flagelômero. O terceiro e quarto flagelômeros apresentam tamanho e formato semelhantes. São cilíndricos, de comprimento aproximado à largura. O último flagelômero, mais desenvolvido, apresenta formato de clava e contém o maior número de sensilos (Figuras 5 e 6).

Sensilos:

- **Sensilo tricóide com multiporos:** foram encontrados dois sensilos tricóides com multiporos nas antenas de *T. galloi* e *T. pretiosum*, que diferem entre si em sua localização e tipo de inserção basal. O sensilo tricóide do tipo C, localizado na face ventral do último flagelômero, é uma estrutura curva, achatada lateralmente, com saliências oblíquas percorrendo toda a sua extensão (Figuras 6 e 7A). Os poros são localizados na margem externa do sensilo, no ponto de convergência das saliências. Apresenta função mista, químico e mecanorreceptora. O número desses sensilos foi significativamente variável ($F = 60,6$; g.l. = 1, 45; $P < 0,05$, pelo teste de Tukey) entre os dois parasitóides estudados, com um número médio superior em *T. pretiosum* (30,7) em relação a *T. galloi* (26,6). O seu número parece ser espécie-específico, pois Voegelé *et al.* (1975) já haviam relatado a presença de um número distinto desses sensilos para *Trichogramma maltbyi*, *T. brasiliensis* e *T. evanescens*, sugerindo, inclusive, a possibilidade de utilização desse carácter como uma forma de distinção entre as espécies, baseando-se em exemplares fêmeas do parasitóide, visto que a taxonomia desse grupo é baseada exclusivamente no macho. Alguma especulação é feita sobre a possibilidade de que a diferença no número desses sensilos entre as espécies de *Trichogramma*, esteja relacionada à eficiência de exploração de diferentes hospedeiros (Olson & Andow, 1993).

O outro sensilo tricóide com multiporos apresenta uma inserção basal contínua com o tegumento do inseto, com um número bastante reduzido de poros. Localizado dorso-

Figura 5. Estrutura da antena de *Trichogramma*. A. escapo (E), pedicelo (P) e flagelômeros (F) (1.760 x); B. detalhe dos flagelômeros 1 a 4 (6.600 x). As setas indicam a localização da estrutura parecida a um sensilo campaniforme.



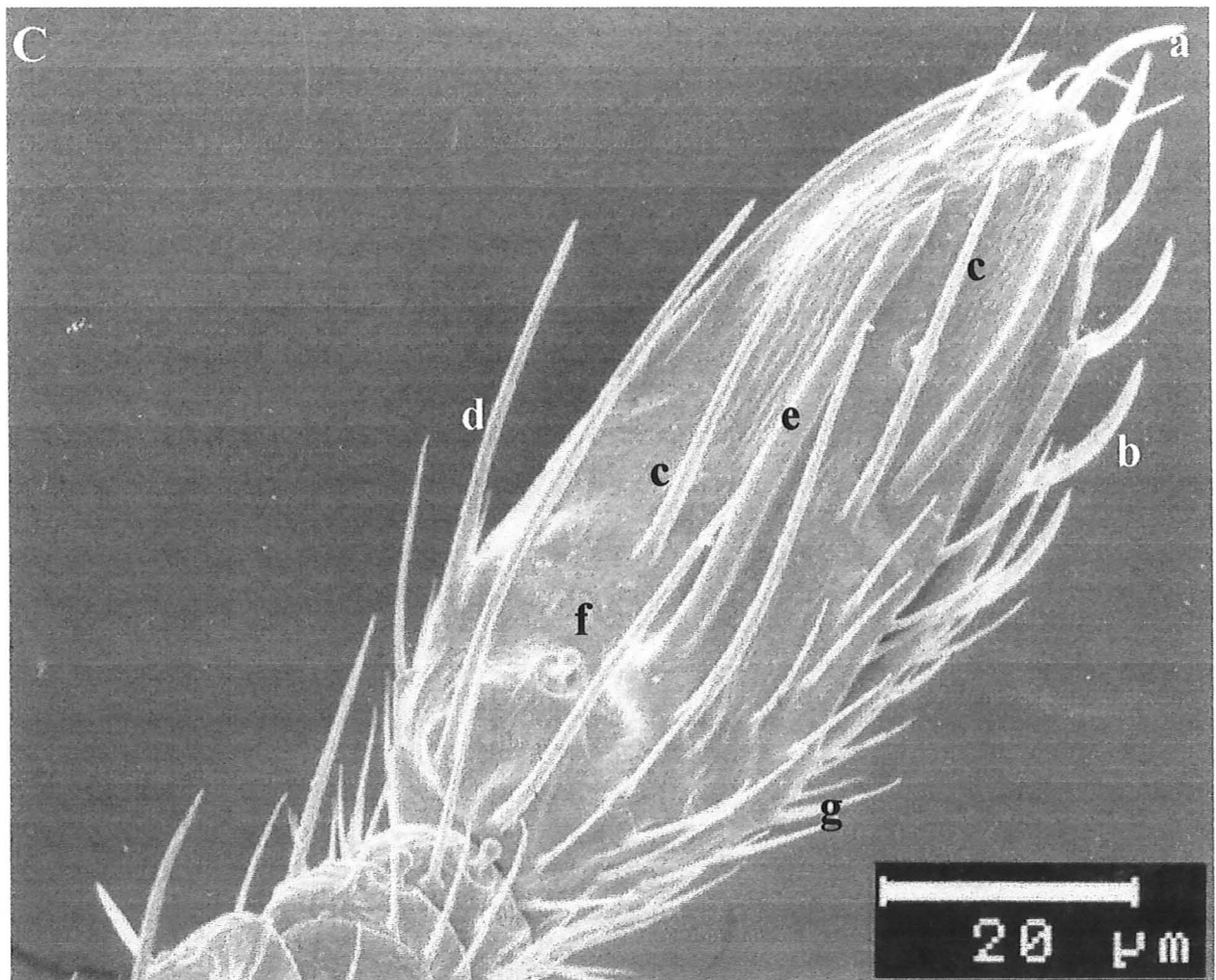
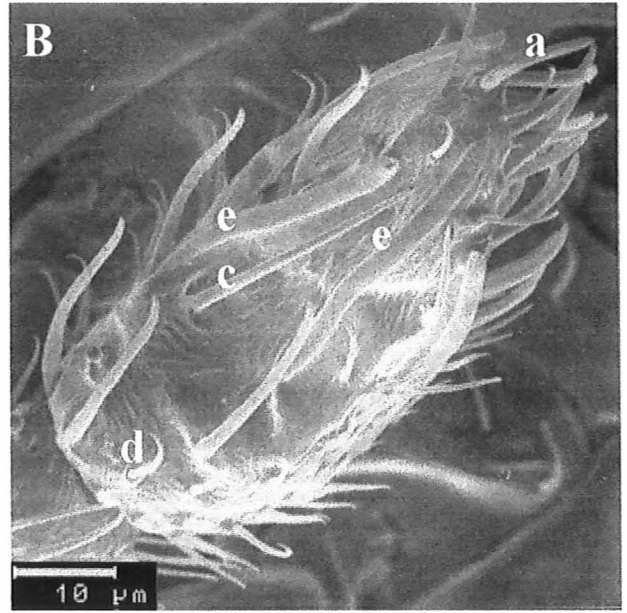
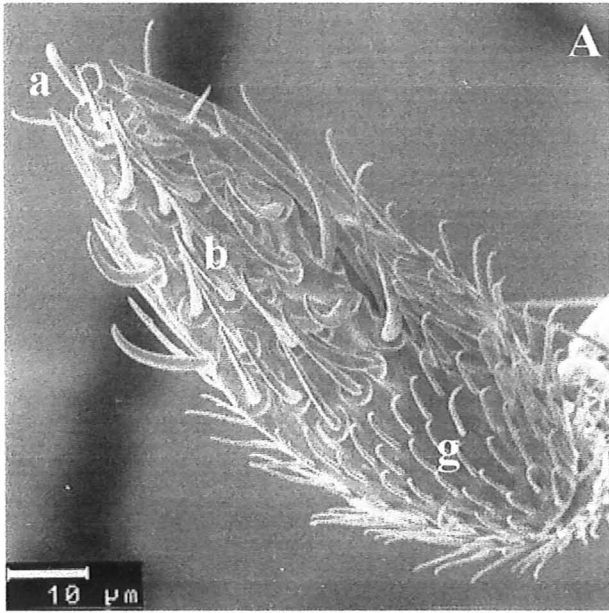
lateralmente no último flagelômero (Figuras 6 e 7B-C). Devido à presença de poros, relacionaram-no com a função de olfato (Olson & Andow, 1993).

- **Sensilo tricóideo sem poros:** presente no escapo, pedicelo e flagelo. No escapo e flagelo é a única estrutura sensilar presente. Reconhecido como estrutura de função mecanorreceptora, usualmente utilizado como receptor tátil, mas que também pode desempenhar função na recepção de vibrações causadas pelo movimento do ar (McIver, 1975). No flagelo, está localizado principalmente na lateral interna dos flagelômeros (Figuras 6 e 7D). Devido à sua posição, foi sugerido que esse sensilo possa desempenhar alguma função no comportamento de procura do hospedeiro, por informar ao parasitóide a posição de suas antenas em relação ao substrato (Olson & Andow, 1993).

- **Sensilo tricóideo com 1 poro apical:** é um sensilo único. Localizado no ápice da extremidade distal da antena, em sua face ventral. Apresenta área basal de inserção distinta e elevada. Presença de elevações ao longo do seu eixo longitudinal (Figuras 6 e 8A-B). Pelas suas características morfológicas, apresenta provável função mecanorreceptora e quimiorreceptora de contato, visto que a sua extremidade distal, na qual está localizado o poro, está sempre em contato com a superfície do objeto em que a fêmea do parasitóide desempenha o seu comportamento de parasitismo.

- **Sensilo placóideo com multiporos:** são cinco estruturas achatadas, colocadas nas faces laterais e dorsal do último flagelômero, percorrendo longitudinalmente toda a sua superfície. Presença de quantidade abundante de poros (Figuras 6 e 8C-D). Doult (1964) sugeriu que esses sensilos podem ser utilizados para orientar os parasitóides para fontes químicas que atuam à distância, servindo para detectar atraentes emitidos pelo hospedeiro em seu hábitat. Para o caso específico de *Trichogramma* poderiam ser esses os sensilos utilizados para a percepção do feromônio sexual liberado pelas mariposas, os quais atuam na atração desses parasitóides para o ambiente em que o provável hospedeiro se encontra. O feromônio sexual ao lado de secreções das glândulas acessórias e compostos químicos presentes nas

Figura 6. Distribuição dos sensilos no último flagelômero. A. vista ventral do quinto flagelômero (2.040 x); B. vista dorsal (2.550 x); C. vista lateral (2.400 x). a = sensilo tricóideo com poro apical, b = sensilo tricóideo do tipo C com multiporos, c = sensilo tricóideo com poros, d = sensilo tricóideo sem poros, e = sensilo placóideo com multiporos, f = sensilo basicônico, g = estrutura setiforme.



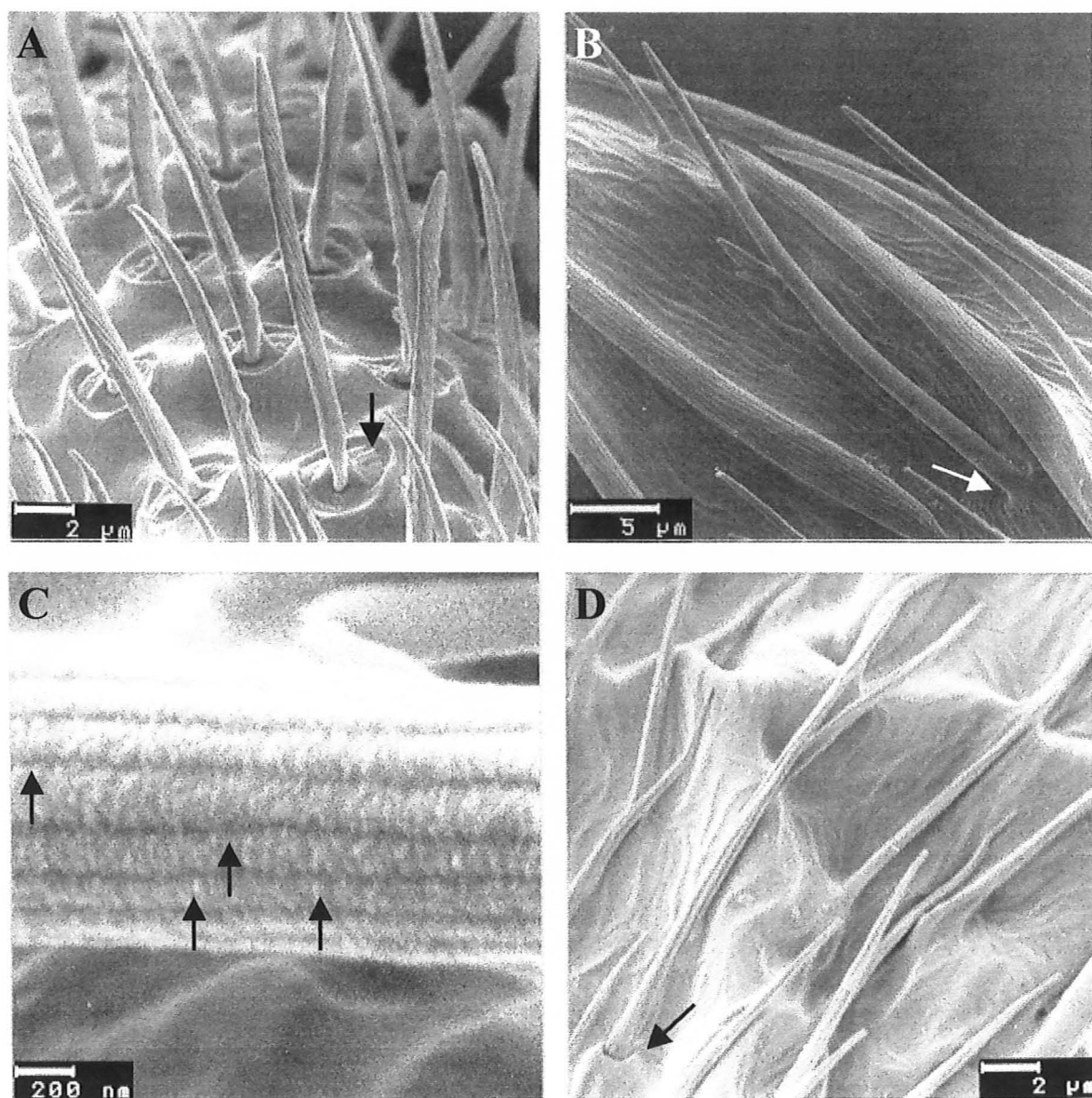


Figura 7. Sensilos da antena de *T. galloi* e *T. pretiosum*. A. Sensilo tricóideo do tipo C com multiporos. A seta indica o tipo de inserção (7.500 x); B. Sensilo tricóideo com multiporos. A seta indica o tipo de inserção (4.500 x); C. Detalhe de um sensilo tricóideo com multiporos. A seta indica a presença de poros (75.000 x); D. Sensilo tricóideo sem poros. A seta indica o tipo de inserção (7.500 x).

escamas dos adultos, que permanecem aderidas aos ovos, são as principais substâncias químicas envolvidas no comportamento de forrageamento de *Trichogramma* (Noldus, 1989).

- **Sensilo basicônico com multiporos:** poros distribuídos longitudinalmente na porção do bulbo. São localizados no terceiro, quarto e quinto flagelômeros (Figuras 6 e 8E). *T. pretiosum* apresentou dois destes sensilos no quarto flagelômero, enquanto *T. galloi*, apenas um. Esse sensilo parece desempenhar função quimiorreceptora. Também pode se apresentar como sensilo termo e/ou higrossensível (Olson & Andow, 1993).

- **Estrutura parecida a um sensilo campaniforme:** localizada nos segmentos 2 e 4 do flagelo (Figuras 5 e 8F). Olson & Andow (1993) verificaram esta estrutura nos segmentos 3, 4 e 5 do flagelo de fêmeas de *T. mubilale*, sendo que Voegelé *et al.* (1975) as encontraram nos segmentos 4 e 5 do flagelo das antenas de *T. evanescens*. Essa estrutura apresenta função desconhecida.

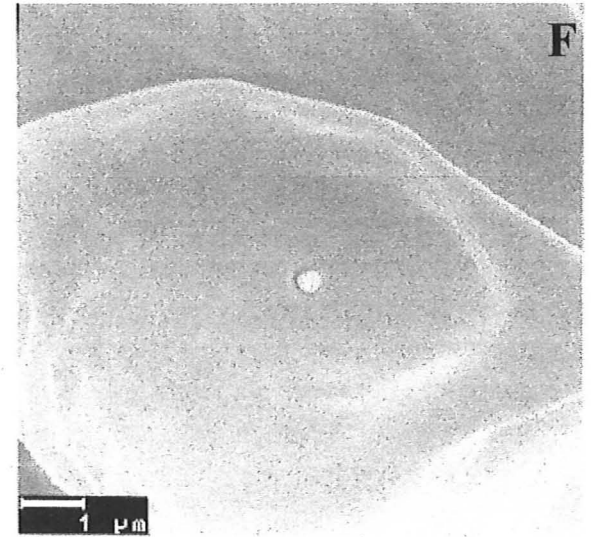
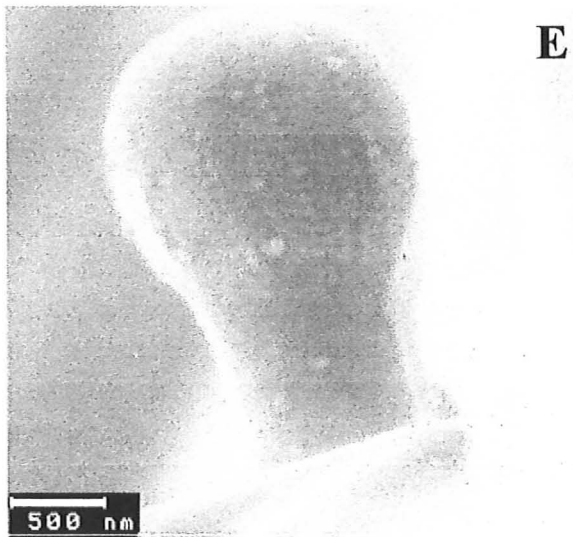
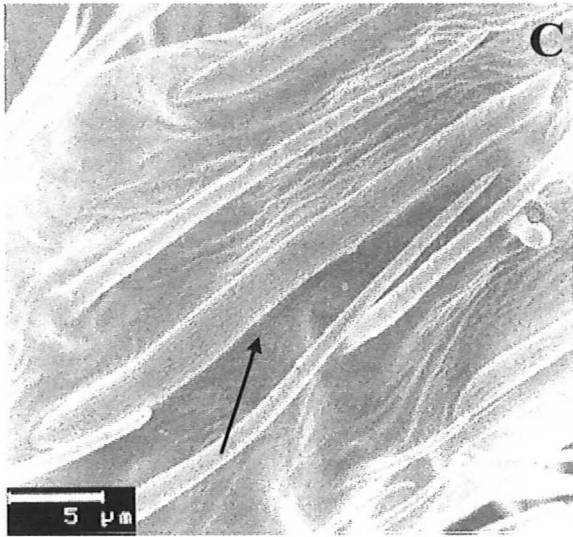
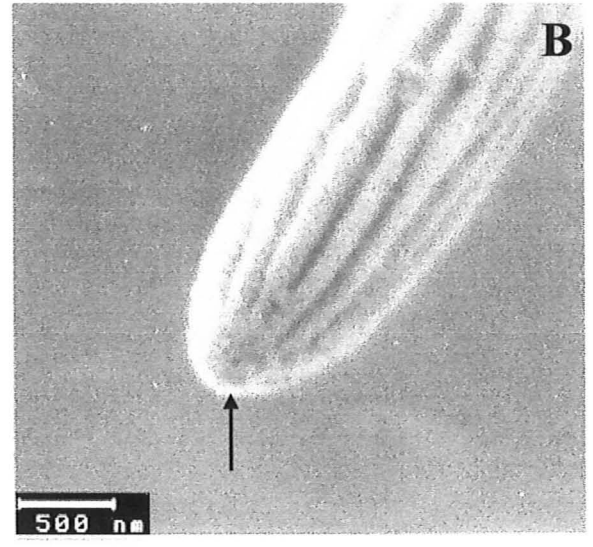
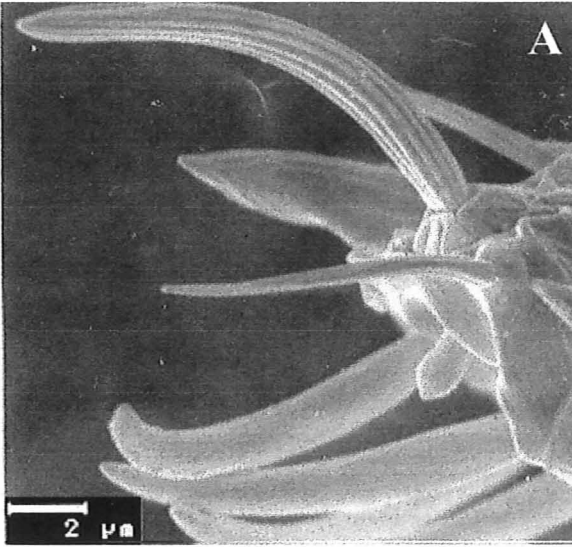
- **Estrutura setiforme:** apresenta ausência de poros e inserção basal indistinta. Considerada sem função sensorial. Estão presentes em grande número, principalmente na porção ventral do quinto flagelômero, junto à sua base (Figura 6A). Devido ao seu número e posição, alguns autores têm sugerido a função de proteção para essas estruturas (Olson & Andow, 1993).

4.3 Estrutura do ovipositor de fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum*

A organização da genitália das fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum* é semelhante àquela descrita para *Trichogramma maidis* por Le Ralec & Wajnberg (1990), sendo constituída de 2 pares de valvíferas e 3 pares de valvas derivadas do 8º e 9º segmentos abdominais, a qual não difere da estrutura básica da genitália de Hymenoptera (Smith, 1970).

O ovipositor de *T. galloi* e *T. pretiosum* se aloja dentro da bainha formada pela cápsula genital, apresentando apenas a sua extremidade proximal presa ao tegumento por uma série de músculos. O ovipositor desses parasitóides é uma estrutura cilíndrica e pontiaguda. É

Figura 8. Sensilos da antena de *T. galloi* e *T. pretiosum*. A. sensilo tricóideo com poro apical (9.000 x); B. detalhe do ápice do sensilo tricóideo com poro apical. A seta indica a presença do poro (45.000 x); C. sensilo placóideo com multiporos (4.500 x); D. detalhe do sensilo placóideo com multiporos (45.000 x); E. sensilo basicônico (45.000 x); F. estrutura parecida a um sensilo campaniforme (15.000 x).



formado por três estiletes que se acoplam (duas valvas 1 e uma valva 2), apresentando vários sensilos na sua região distal (Figuras 9 e 10A). A valva 2, porção do ovipositor voltada para o abdome, apresenta uma concavidade próxima a região distal, sendo que, na extremidade dessa região são encontradas várias elevações da cutícula, além de uma série de quatro projeções laterais pontiagudas de cada lado desse estilete (Figura 10B-C). Essas projeções pontiagudas são inclinadas em direção à base do ovipositor, em formato de ponta de flecha, conferindo a esse estilete ação perfurante. Ambas as valvas 1 apresentam quatro tipos distintos de sensilos, que se distribuem em direção proximal, logo após duas expansões laterais da cutícula, no ápice da extremidade distal dessas valvas (Figura 10D). Na extremidade distal das valvas 1 estão presentes dois sensilos (A), que são expansões cuticulares em forma de gancho, apresentando um poro em sua base (Figura 10D). Esses sensilos estão colocados em uma depressão ovóide da cutícula. Em direção à região proximal desse estilete, colocado ventralmente em relação aos sensilos (A), encontra-se um sensilo (B), de estrutura cuticular deprimida e irregular (Figura 10D). Na seqüência, é encontrado um processo dentiforme (C) (Figura 10D-E), que se distribui regularmente ao longo de toda a extensão desse estilete, logo após a constrição cuticular presente (Figura 10F). Após o primeiro processo dentiforme e anterior à constrição da cutícula, encontra-se uma estrutura pouco diferenciada, formada por uma depressão circular da cutícula (D), aproximando-se do formato de um sensilo campaniforme (Figura 10D). A estrutura geral, o número e o tipo de sensilos presentes no ovipositor de *T. galloi* e *T. pretiosum* foram semelhantes, não diferindo daquela descrita para *T. maidis* (Le Ralec & Wajnberg, 1990).

A função dos sensilos presentes no ovipositor desses parasitóides poderia ser explicada por estudos da estrutura interna desses sensilos. Estudos da ultraestrutura desses órgãos relatam a presença de sensilos com função quimiorreceptora, mecanorreceptora e mista para outras espécies de parasitóides (Hawke *et al.*, 1973; Greany *et al.*, 1977; van Veen & van Wilk, 1985). No entanto, Le Ralec & Wajnberg (1990) conferiram suposta função mista aos sensilos (A) e mecanorreceptora aos (C) e (D). Para o sensilo (B), devido às peculiaridades da sua estrutura, não foi levantada nenhuma possível função.

Figura 9. Corte transversal do ovipositor de fêmeas de *Trichogramma*. A. ovipositor recolhido no interior da cápsula genital (6.000 x). No detalhe: ovipositor retirado da cápsula genital (2.000 x); B = detalhe do ovipositor (9.000 x) (V_1 = valvífero 1, V_2 = valvífero 2, b= bainha da cápsula genital, SN = células nervosas) (Escala: A = 1,1 μm - detalhe = 2,5 μm , B = 1,7 μm).

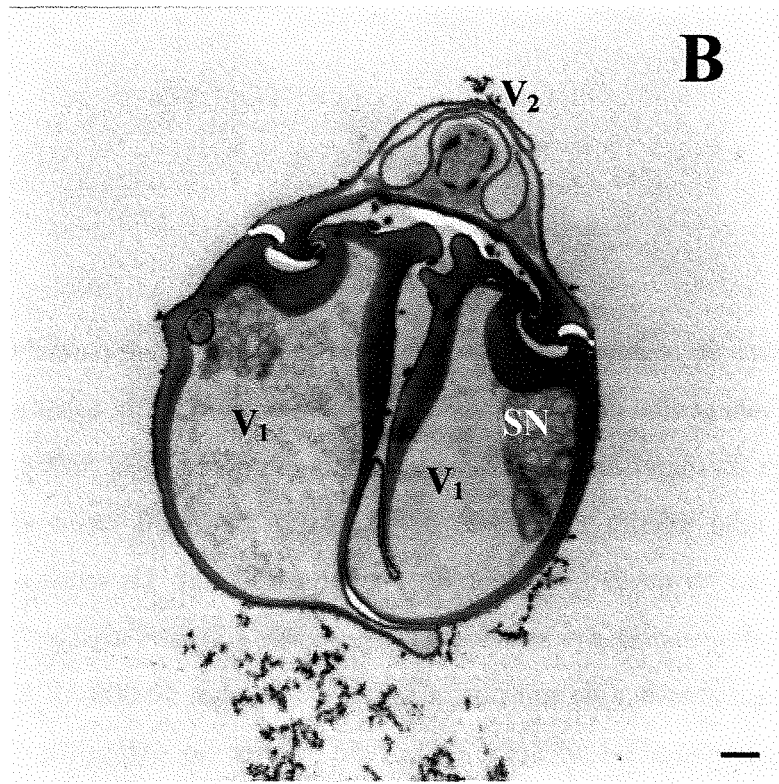
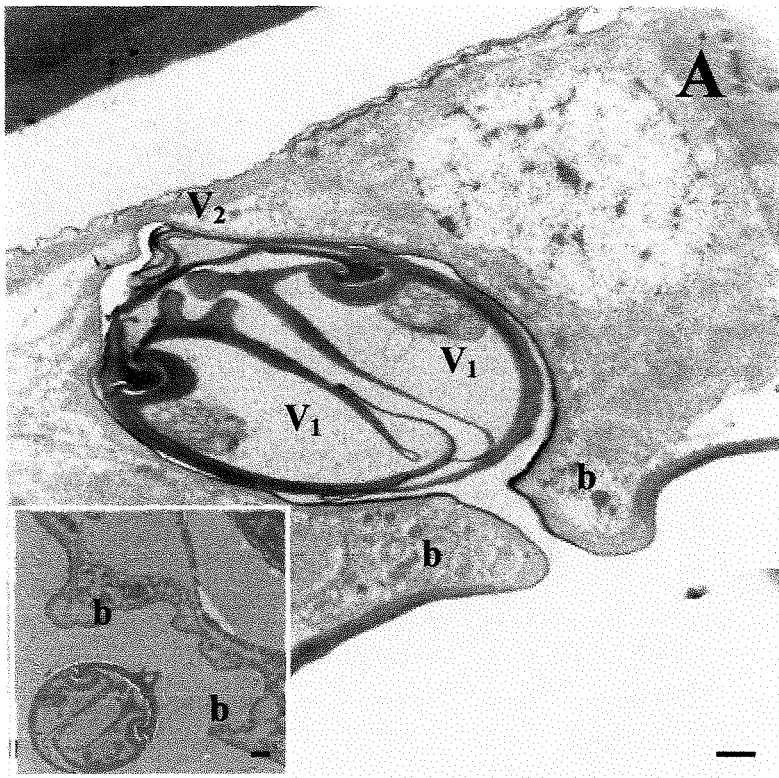
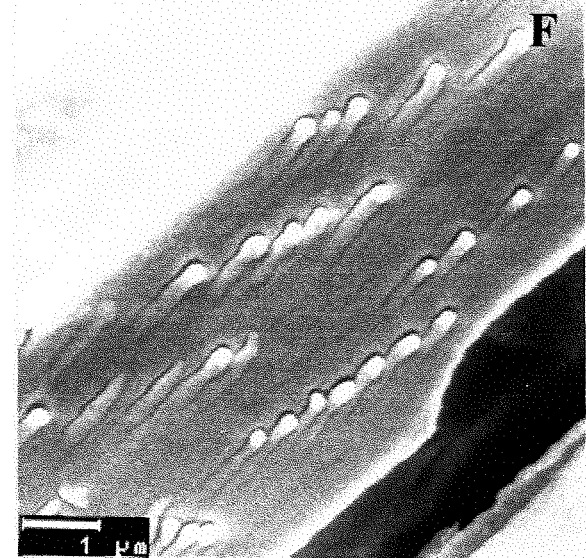
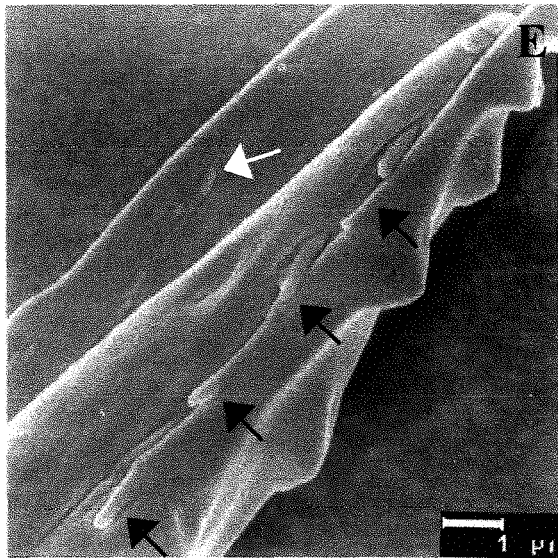
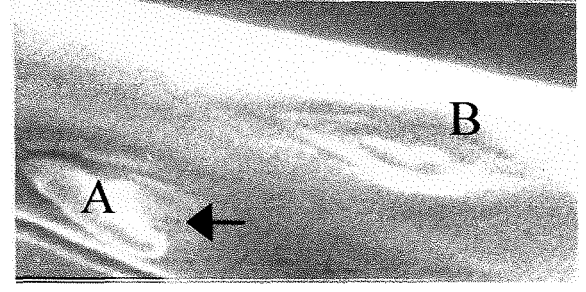
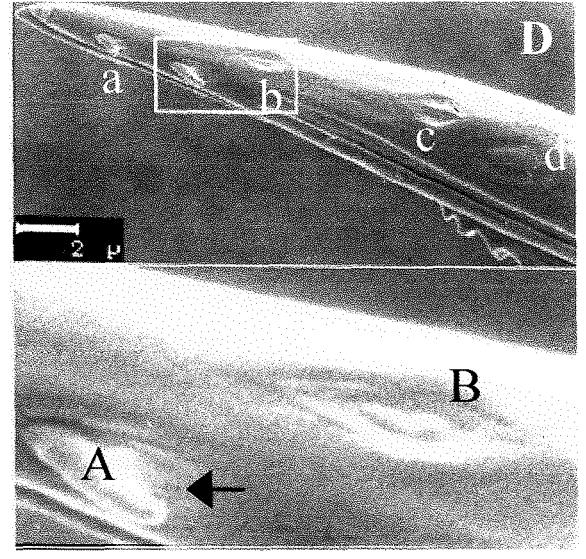
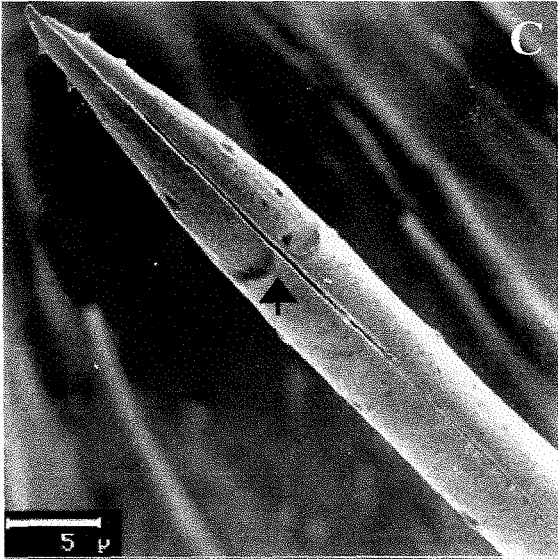
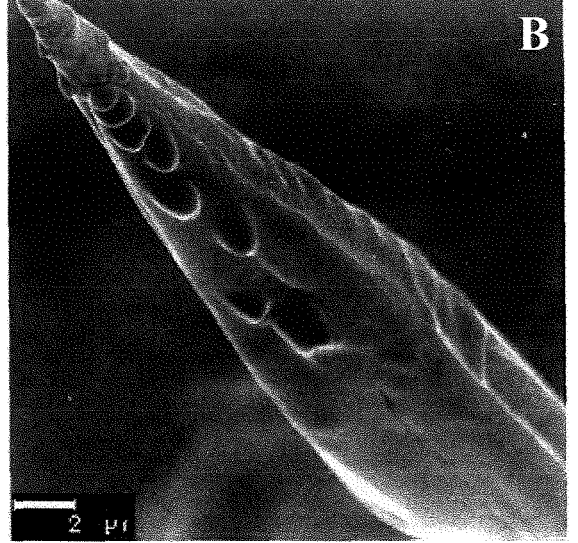
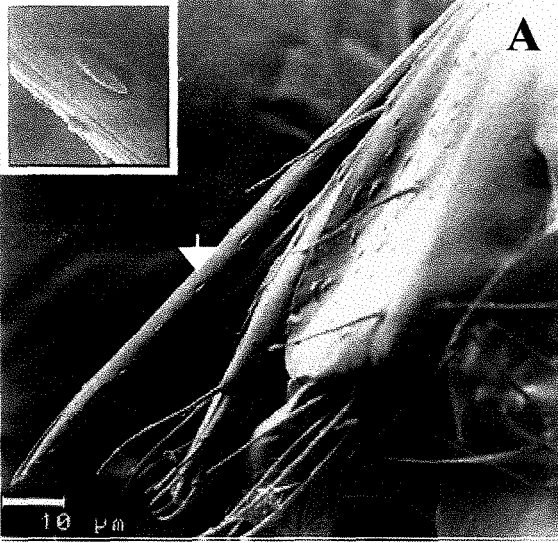


Figura 10. Estrutura do ovipositor de *Trichogramma*. A. ovipositor parcialmente retirado da bainha da cápsula genital (1.500 x). A seta indica a disposição da estrutura dentiforme presente ao longo do ovipositor. A mesma estrutura em detalhe (22.500x); B. elevações cuticulares da porção inferior do estilete do ovipositor de *Trichogramma* (7.500x); C. Constrição cuticular na porção superior do estilete (4.500 x); D. sensilos do ápice do ovipositor de *Trichogramma*. a = sensilo (A); b = sensilo (B); c = sensilo (C); d = sensilo (D). A seta indica a presença de um poro (7.500 x) (detalhe: 30.000 x); E. Presença de quatro estruturas pontiagudas no ápice da porção inferior do ovipositor (15.000 x); F. Detalhe das projeções cuticulares presentes no interior dos estiletos (18.000 x)



4.4 Avaliação (tamanho, volume, espessura e estrutura do córion) de ovos de hospedeiros naturais e alternativos de *T. galloi* e *T. pretiosum*

Os ovos dos hospedeiros naturais e alternativos, estudados para *T. galloi* e *T. pretiosum*, apresentaram diferenças quanto ao seu tamanho, formato, coloração, volume, espessura e esculturação do córion. Essas características são descritas para ovos de:

- *S. cerealella*: hospedeiro alternativo. Postura agrupada, com os ovos colocados lado a lado, em camada única. Ovo de coloração branca, passando ao amarelo-palha no início do desenvolvimento embrionário até atingir a coloração vermelha, próximo à eclosão da lagarta. Formato fusiforme (584,7 μm x 263,4 μm), com a extremidade posterior arredondada e a anterior truncada. Região micropilar localizada em uma depressão da porção anterior. Superfície do córion apresentando saliências longitudinais conspícuas, que percorrem o ovo em todo a sua extensão, até a região da micrópila. Essas saliências longitudinais são ligadas por outras que percorrem o ovo transversalmente, delimitando pequenas áreas de formato quase retangular. O formato dessas áreas pode ser distinto na extremidade posterior, variando do triangular ao poligonal. Córion de textura granular. O número de aerópilas em ovos de *S. cerealella* é bastante reduzido, estando localizado na extremidade posterior do ovo (Figura 11). O volume do ovo é de aproximadamente 0,021 mm^3 . O córion é formado por 5 camadas, sendo a primeira delas, a que recobre externamente o ovo, formada por muco. A sua distribuição é irregular sobre a superfície do ovo, chegando quase à inexistência em determinados pontos, e apresenta espessura oscilando entre 0,13 a 0,26 μm (Figura 12). A camada subsequente é uma fina membrana, com cerca de 20 nm de espessura, colocada logo acima do exocóron, que apresenta estrutura lamelar, medindo entre 4,00 e 4,27 μm . A camada trabecular (0,40 - 0,53 μm) é sustentada por colunas que raramente se ramificam, e quando o fazem, a ramificação ocorre na base. O endocóron é uma fina camada de cerca de 13,33 nm. Essas camadas resultam em um córion com espessura variável entre 4,54 a 4,81 μm (Figura 12). A membrana vitelínica (6,9 μm) é bi-partida, com a sua camada mais externa apresentando alta densidade e espessura de 0,27 a 0,54 μm . A outra camada, a interna, única, apresenta aspecto esponjoso, com elevada elétron densidade. Arbogast *et al.* (1980)

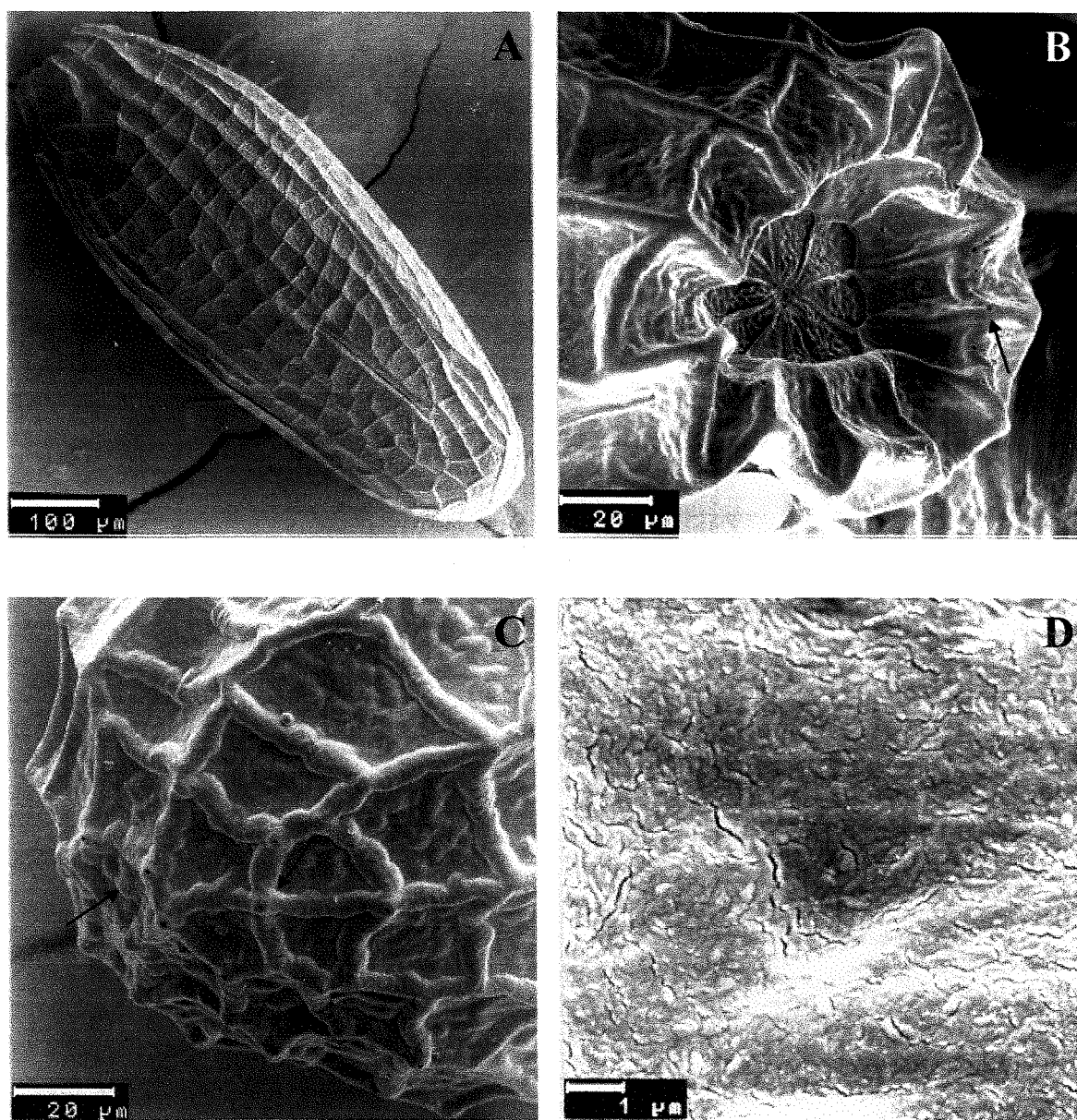
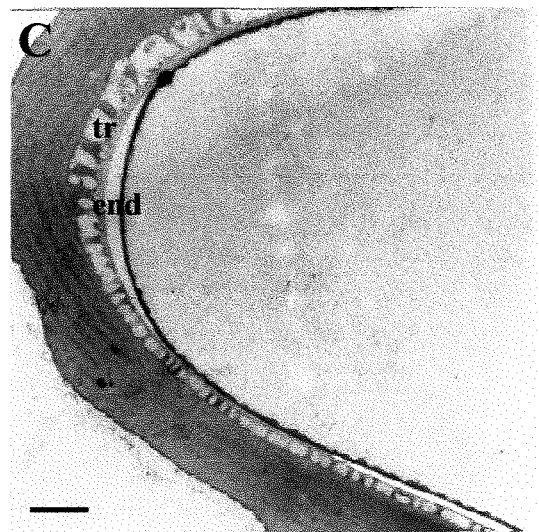
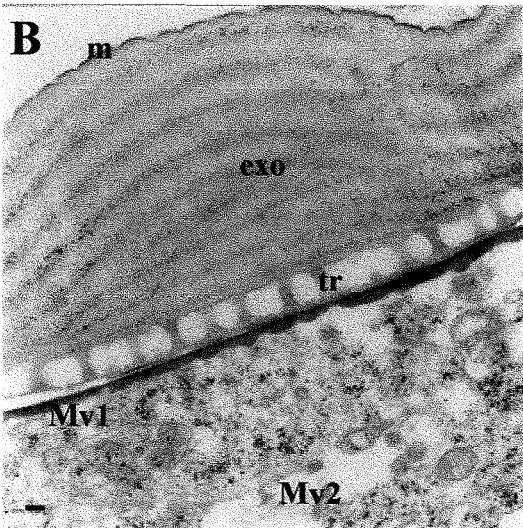
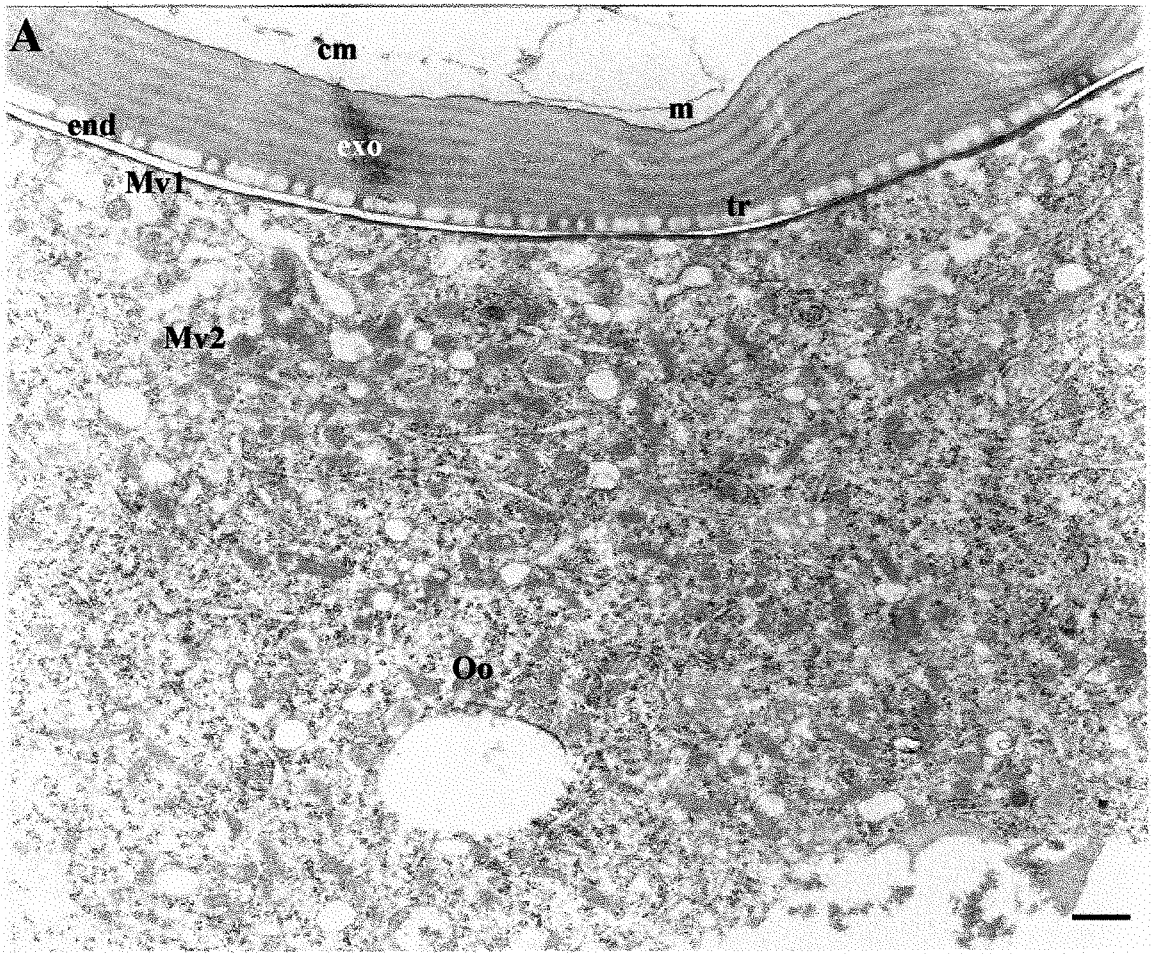


Figura 11. Ovo de *S. cerealella*. A. vista geral do ovo (225 x); B. micrópila e aerópilas juntas na região anterior (1.050 x); C. aerópilas na porção posterior do ovo (1.275 x); D. microestrutura (textura) do córion (15.000 x).

Figura 12. Estrutura fina do córion de *S. cerealella*. A. estrutura geral (15.000x); B. detalhe do córion (24.000x); C. Córion mostrando alteração na espessura da camada trabecular (15.000x) (cm = camada de muco; end = endocóron; exo = exocóron; m = membrana; Mv = membrana vitelínica, Oo = ooplasma; tr = camada trabecular) (Escala: A e C = 1,1 μm ; B = 0,4 μm).



descreveram ovos de *S. cerealella* com características semelhantes, relatando, porém, a presença de aerópilas restritas à porção anterior do ovo (Figura 12).

- *A. kuehniella*: hospedeiro alternativo. Ovo de coloração branca, passando ao amarelo-palha próximo à eclosão da lagarta. Apresenta formato elíptico, com ambas as extremidades arredondadas. Comprimento médio de 520,7 μm e largura média de 289,8 μm . Córion com esculturação abundante, formada por inúmeras saliências sinuosas que convergem, em número variável de 4 a 8, em diversos pontos, formando assim, uma região mais saliente. Córion de textura áspera. Aerópilas em número extremamente reduzido quando presentes, localizadas nos pontos de convergência das saliências do córion. Micrópila cercada por inúmeras células primárias (14-22) de tamanho variável, com as mais longas ultrapassando o final das células secundárias (Figura 13). Córion composto de 4 camadas distintas, com espessura entre 2,63 - 3,23 μm (Figura 14). A camada mais externa é representada por uma membrana extremamente fina, com espessura entre 37,5 e 75,0 nm, que recobre a camada subsequente, o exocórion, mais espessa (2,17 - 2,77 μm), apresentando estrutura lamelar, demonstrada pela disposição alternada de camadas claras e escuras. A camada trabecular, localizada logo abaixo do exocórion, é composta por canais sustentados por diversas colunas, que se ramificam apenas na base. Espessura variável de 0,45 a 0,67 μm . (Figura 14). Separando o córion da membrana vitelínica encontra-se uma camada extremamente fina, com espessura inferior à 7,5 nm. Essa camada foi descrita como sendo formada pela deposição de placas sobrepostas de cera (Cruickshank, 1972). A membrana vitelínica, com cerca de 11,8 μm de espessura, é dividida em duas camadas, no estágio inicial do desenvolvimento embrionário, sendo a primeira de espessura uniforme (0,16 μm), de alta elétron densidade (Figura 14 A - detalhe). A segunda, nesse mesmo estágio de desenvolvimento, é bi-partida, de espessura variável. A mais interna, de maior elétron densidade, emite prolongamentos que se estendem em direção à camada mais externa da membrana vitelínica, (Figura 14 A - detalhe MV2a). No entanto, a membrana vitelínica parece sofrer alterações em sua composição, mesmo após curto intervalo de desenvolvimento embrionário. A membrana vitelínica de ovos

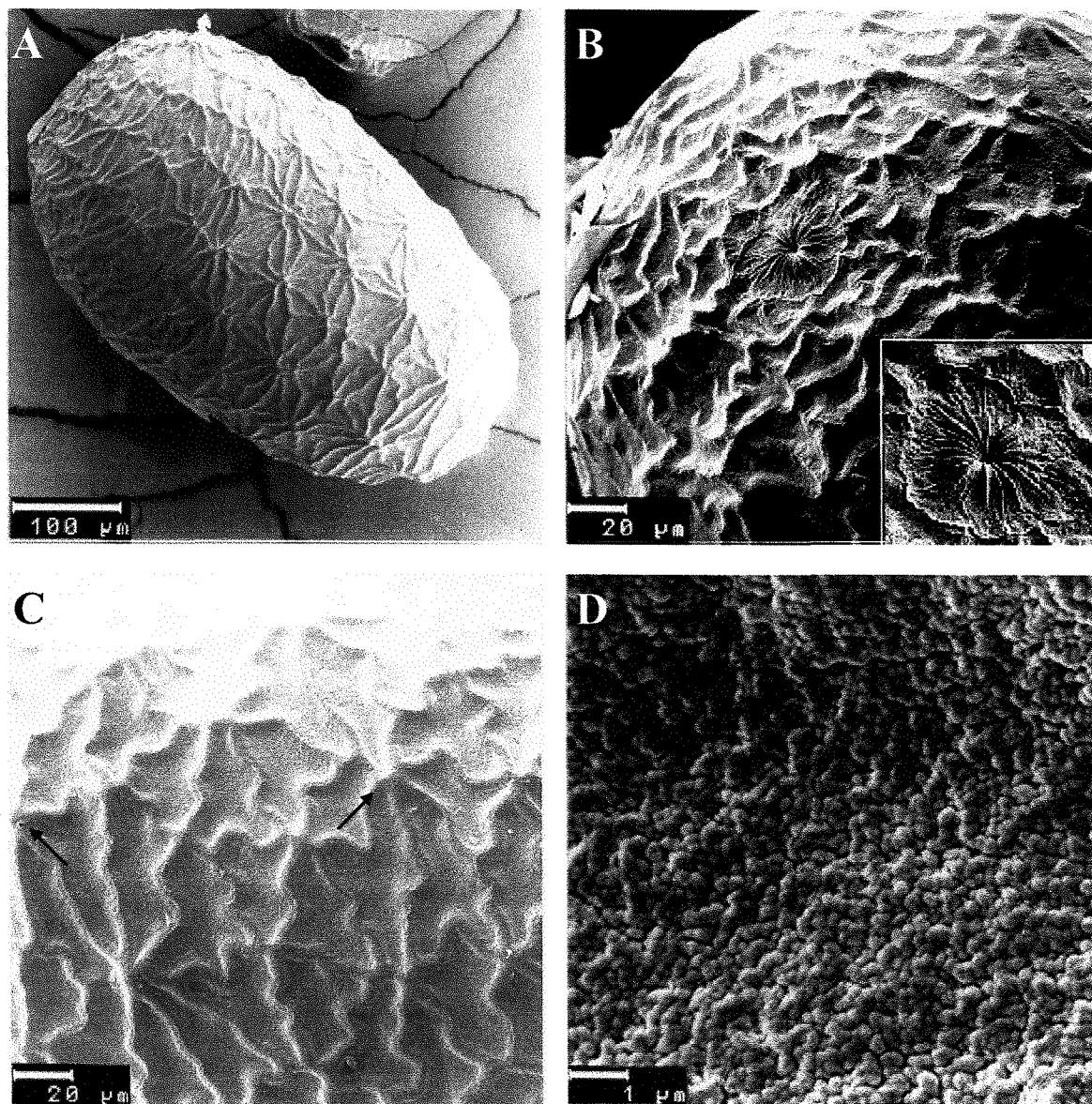


Figura 13. Ovo de *A. kuehniella*. A. vista geral do ovo (270 x); B. região micropilar (1.500 x). Detalhe da micrópila (2.500 x); C. aerópilas na porção posterior do ovo (750 x); D. microestrutura (textura) do córion (15.000 x).


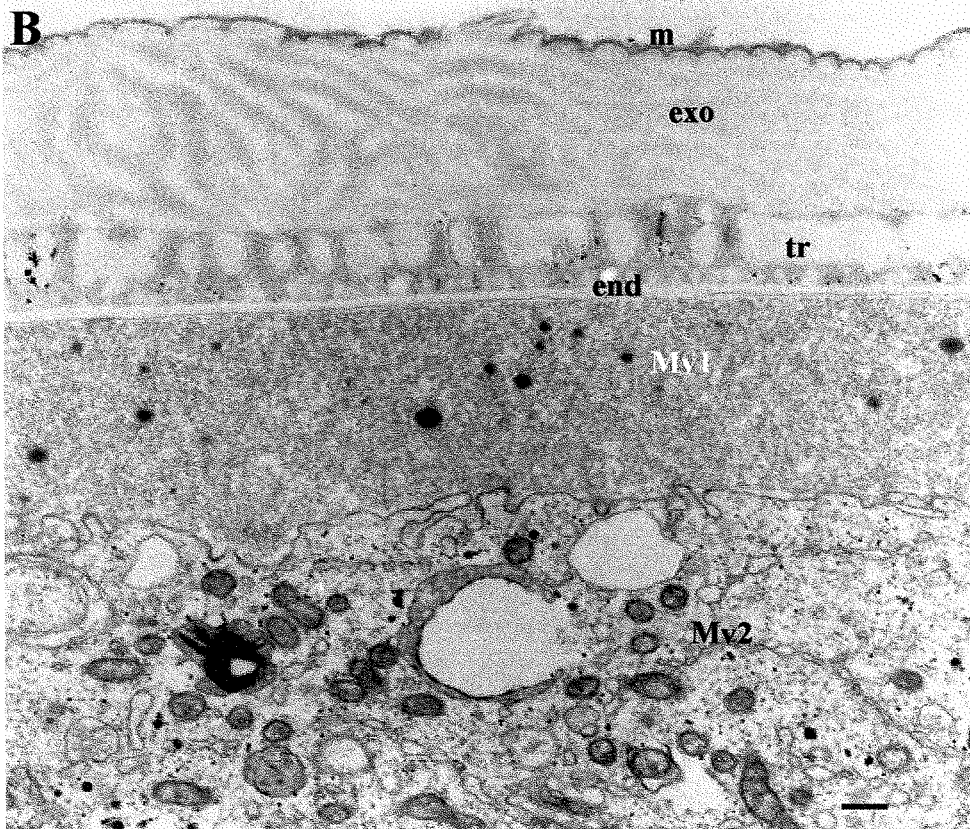
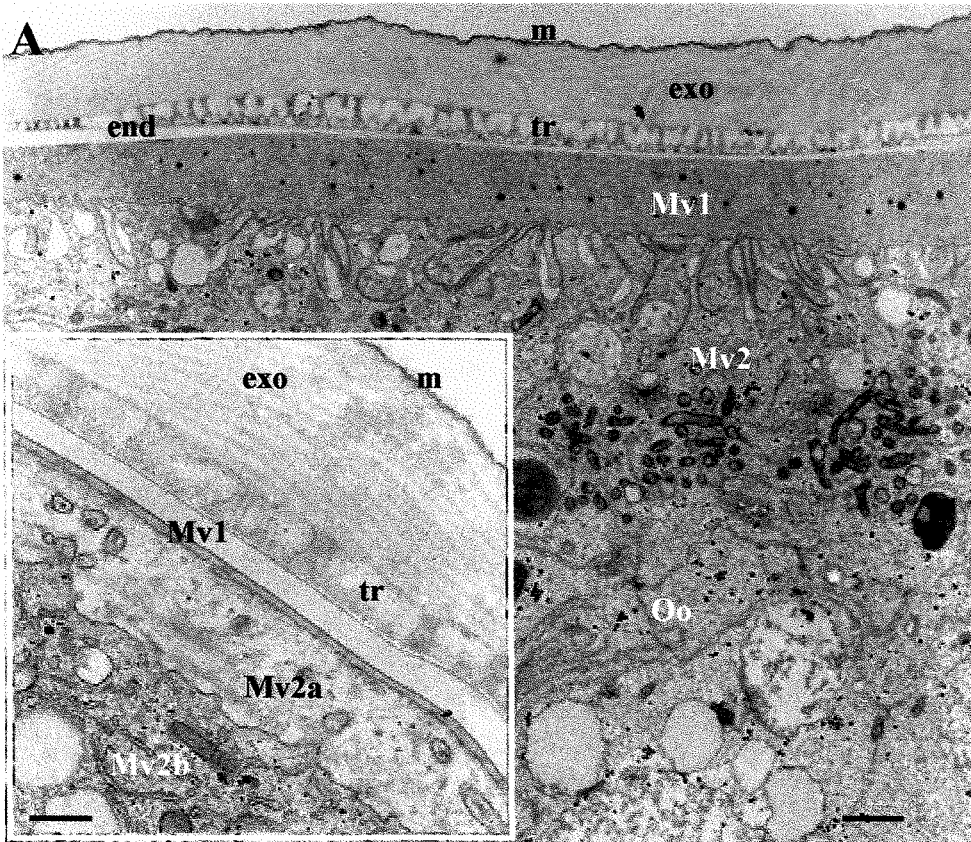


Figura 14. Estrutura fina do córion de *A. kuehniella*. A. estrutura geral (13.000x). No detalhe: córion em estágio de desenvolvimento atrasado, mostrando a ocorrência da camada Mv 2 da membrana vitelínica dividida em duas camadas distintas (22.000x). B. detalhe do córion (27.000x) (end = endocóron; exo = exocóron; m = membrana; Mv = membrana vitelínica; Oo = ooplasma; tr = camada trabecular) (Escala: A = 1,7 μm ; detalhe e B = 0,6 μm).



mais adiantados, dentro do intervalo de desenvolvimento amostrado (0-24 horas), não apresenta a sua camada mais interna bi-partida, enquanto aquela colocada mais externamente apresenta-se mais espessa (Figura 14 A). O que parece ocorrer é o espessamento da primeira camada da membrana vitelínica, sendo que a primeira camada da membrana vitelínica interna desaparece (Figura 14 A). Alterações na composição da membrana vitelínica durante o desenvolvimento embrionário já foram relatadas para outras espécies de Lepidoptera (Fehrenbach *et al.*, 1987). Volume aproximado do ovo de $0,023 \text{ mm}^3$. Arbogast *et al.* (1980) relataram a existência de aerópilas espalhadas por toda a superfície do ovo desse inseto, sendo que Cummings (1972) chegou a quantificar a presença de 100-150 aerópilas por ovo de *A. kuehniella*. A estrutura do córion de *A. kuehniella* se assemelha àquela descrita para óvulos em estágio de maturação avançado (Cruickshank, 1972).

- *C. cephalonica*: hospedeiro alternativo. Ovo amarelo-claro. Ocorre um escurecimento gradual do ovo com o desenvolvimento embrionário. Apresenta as regiões anterior e posterior arredondadas, sendo que a anterior mostra uma pequena projeção na região da micrópila. Micrópila formada por um número variável de células primárias (11-19) em formato de roseta, sendo algumas mais longas do que as outras. Dimensões de $573,5 \mu\text{m} \times 346,1 \mu\text{m}$. Córion com esculturação abundante, porém pouco pronunciada. Formado por saliências que se ligam indistintamente, formando áreas definidas de formato geométrico indistinto. Córion de textura lisa. Número extremamente reduzido de aerópilas. Abertura das aerópilas colocadas nos pontos de contato entre as saliências do córion, em posição não definida da superfície dos ovos (Figura 15). Córion subdividido em várias camadas, com espessura entre $4,18$ e $5,32 \mu\text{m}$ (Figura 16). A primeira camada, a mais externa, é formada por muco, e apresenta espessura de $0,06$ a $0,17 \mu\text{m}$. Logo abaixo encontra-se uma fina membrana com poucos nanômetros de espessura. O exocóron é a mais espessa das camadas, medindo entre $2,46$ a $2,91 \mu\text{m}$, apresentando estrutura lamelar com a deposição de faixas claras e escuras. A camada mais externa do endocóron, colocada logo abaixo do exocóron, apresenta espessura de $0,74$ a $1,14 \mu\text{m}$, e se distribui desuniformemente pelo córion, estando praticamente ausente em determinadas regiões. A camada trabecular, também de espessura

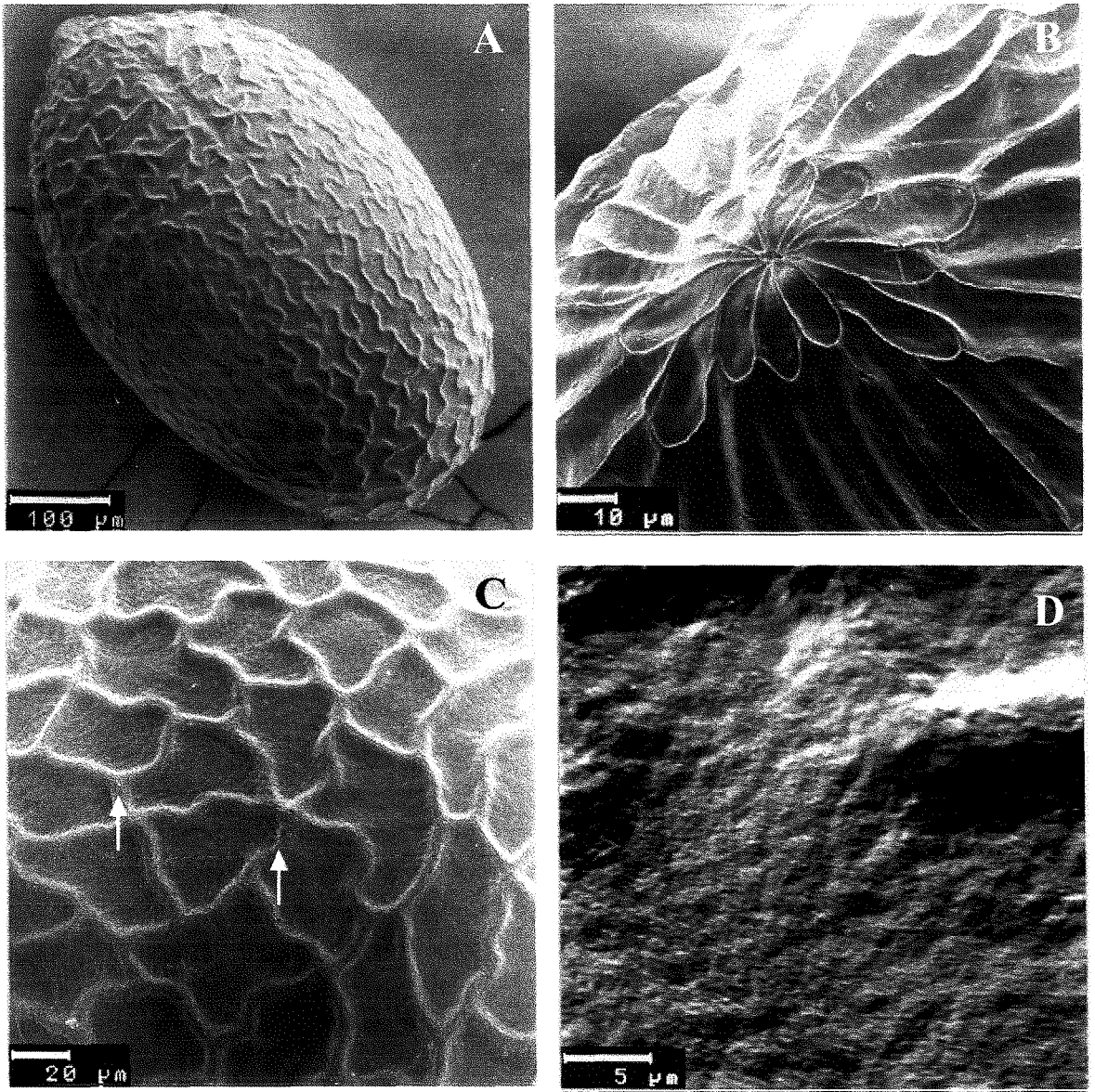
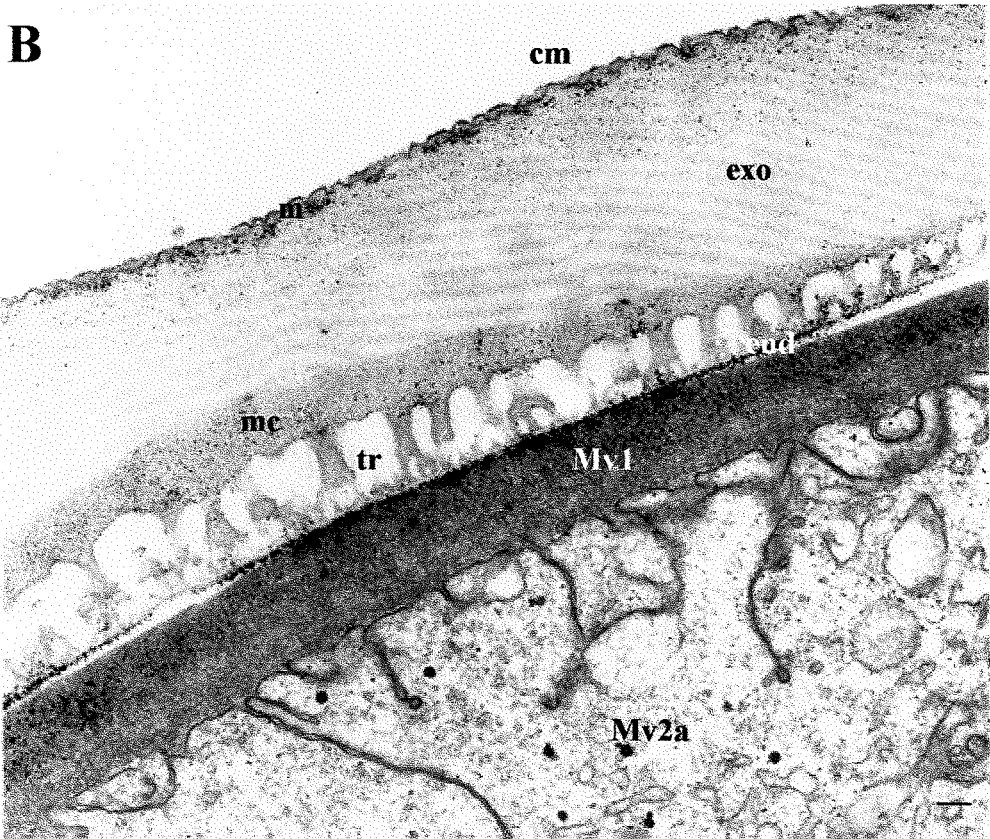
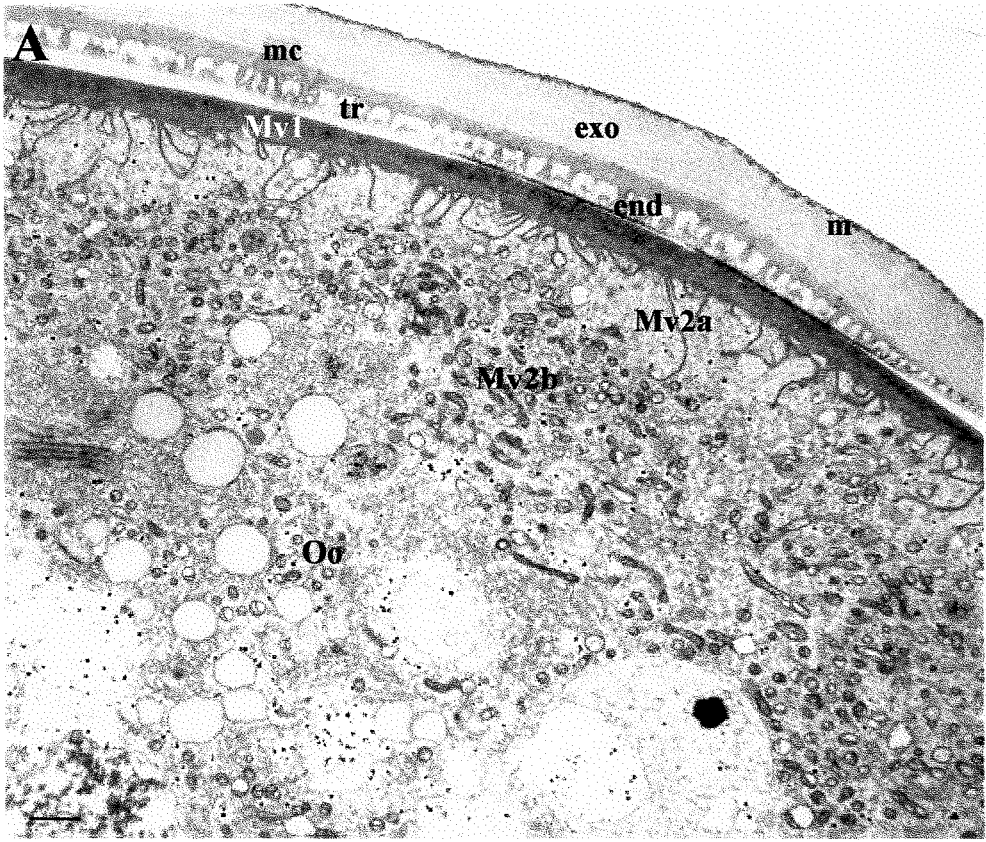


Figura 15. Ovo de *C. cephalonica*. A. vista geral (255 x); B. micrópila (1.500 x); C. aerópilas (750 x); D. microestrutura (textura) do córion (4.500 x).

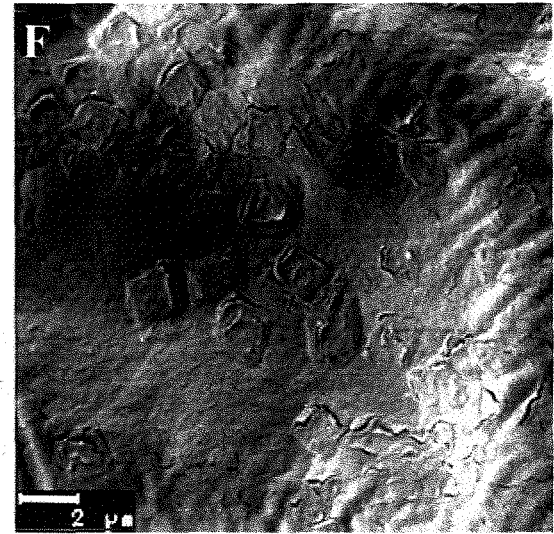
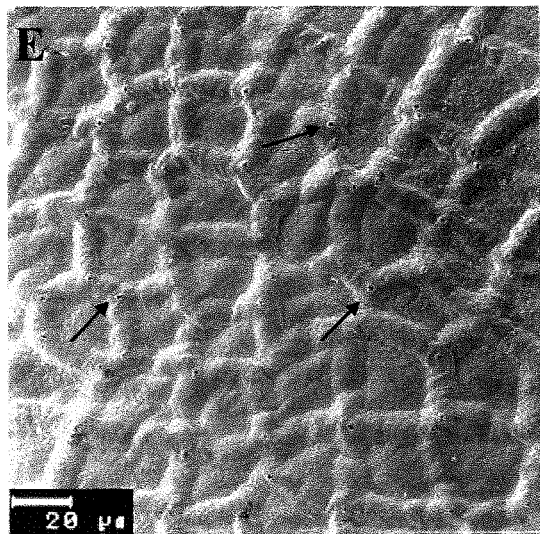
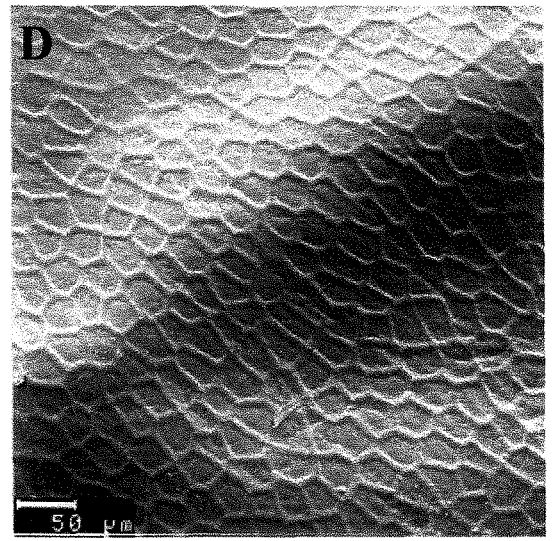
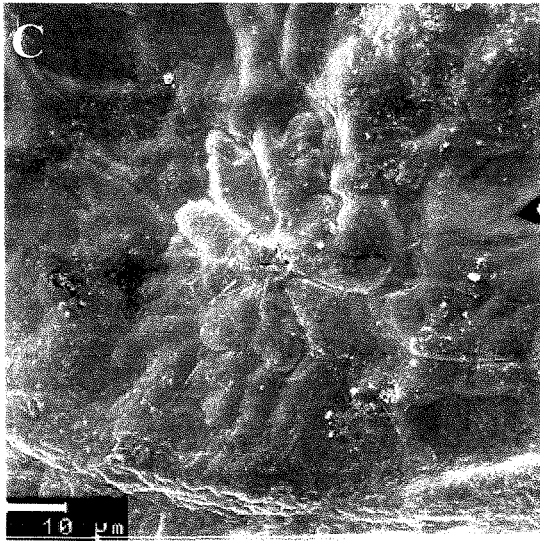
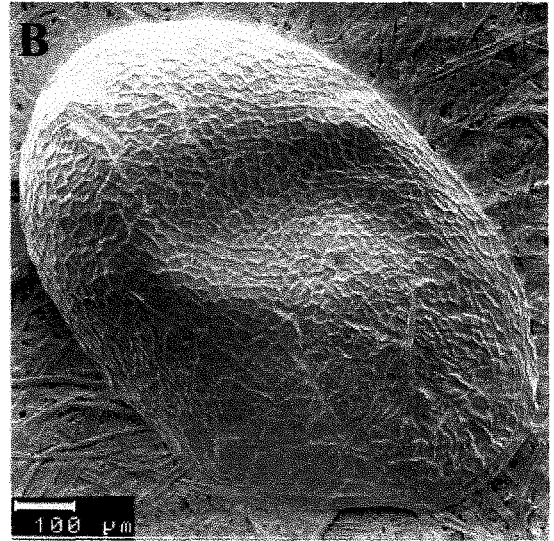
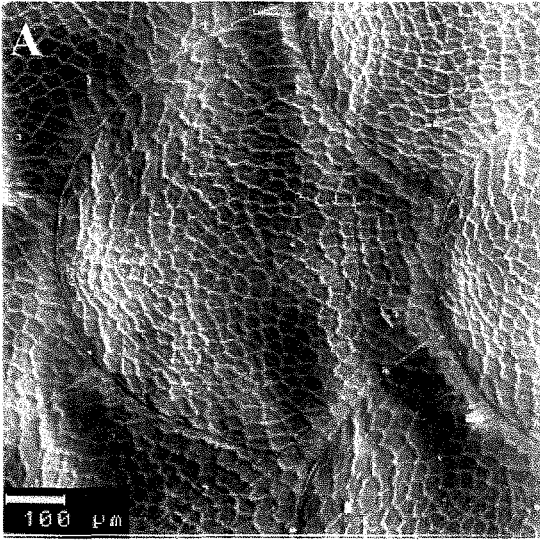
Figura 16. Estrutura fina do córion de *C. cephalonica*. A. estrutura geral . Notar o afilamento da camada trabecular (9.000x); B. detalhe do córion (27.000x) (cm = camada de muco; end = endocóron; exo = exocóron; m = membrana; mc = mesocóron; Mv = membrana vitelínica; Oo = ooplasma; tr = camada trabecular) (Escala: A = 2,5 μm ; B = 0,6 μm).



bastante variável (0,91 - 1,20 μm) apresenta determinadas regiões em que ocorre grande alargamento dos canais que a compõe. As colunas que sustentam os canais formados nessa camada bifurcam-se apenas na base. Separando o córion da membrana vitelínica encontra-se uma fina camada (85,70 - 114,28 nm), que pode ser composta por cera. A membrana vitelínica, com 10,6 μm , se divide em duas camadas: a mais externa apresenta alta densidade e espessura uniforme; a segunda, de aspecto esponjoso, divide-se em duas partes com elétrons de densidade diferente, sendo a de maior elétrons de densidade mais espessa e interna, e emite invaginações que penetram na parte de menor elétrons de densidade (Figura 16). Ovo de volume aproximado de 0,036 mm^3 . Essas características assemelham-se às descritas por outros autores (Arbogast *et al.*, 1980).

- *D. saccharalis*: hospedeiro natural de *T. galloi*. Ovos normalmente colocados agrupados, onde pelo menos metade do seu comprimento fica coberto por outro ovo, o que confere ao grupo de ovos o aspecto de escamas de peixe. Ovo amarelo-claro passando ao laranja, próximo à eclosão da lagarta. São ovos de formato elíptico (1136,0 μm x 826,9 μm), achatados. Esculturação do córion abundante e uniforme. Saliências que se interligam formando pequenas áreas deprimidas de formato poligonal. A superfície do córion é formada por pequenas estruturas de formato irregular, colocadas assimetricamente entre si, que conferem à superfície do córion o aspecto rugoso. Presença de pequenas fissuras. Região da micrópila pouco diferenciada, com orifícios quase indistintos. Número abundante de aerópilas, espalhadas por quase toda a superfície exposta do ovo, havendo maior concentração logo abaixo da região da micrópila, em direção a região posterior do ovo. Abertura das aerópilas sempre localizadas nos pontos de contato entre as saliências (Figura 17). Córion constituído de 5 camadas, sendo a mais externa representada por uma fina camada de muco (0,20 - 0,40 μm) que recobre irregularmente o ovo. Logo abaixo encontra-se uma fina membrana (10 - 20 nm) A camada seguinte, o exocóron, é lamelar, apresentando espessura entre 4,40 - 5,73 μm na parte superior do ovo, sendo que o córion na parte inferior do ovo é extremamente delgado, reduzindo essa camada a poucos nanômetros de espessura. A camada trabecular é caracterizada por um espessamento que ocorre a intervalos freqüentes ao longo de sua

Figura 17. Ovo de *D. saccharalis*. A. vista geral da postura (200 x); B. ovo isolado (150 x); C. região da micrópila (1.500 x); D. esculpturação do córion (300 x); E. aerópila (750 x); F. microestrutura (textura) do córion (7.500 x).



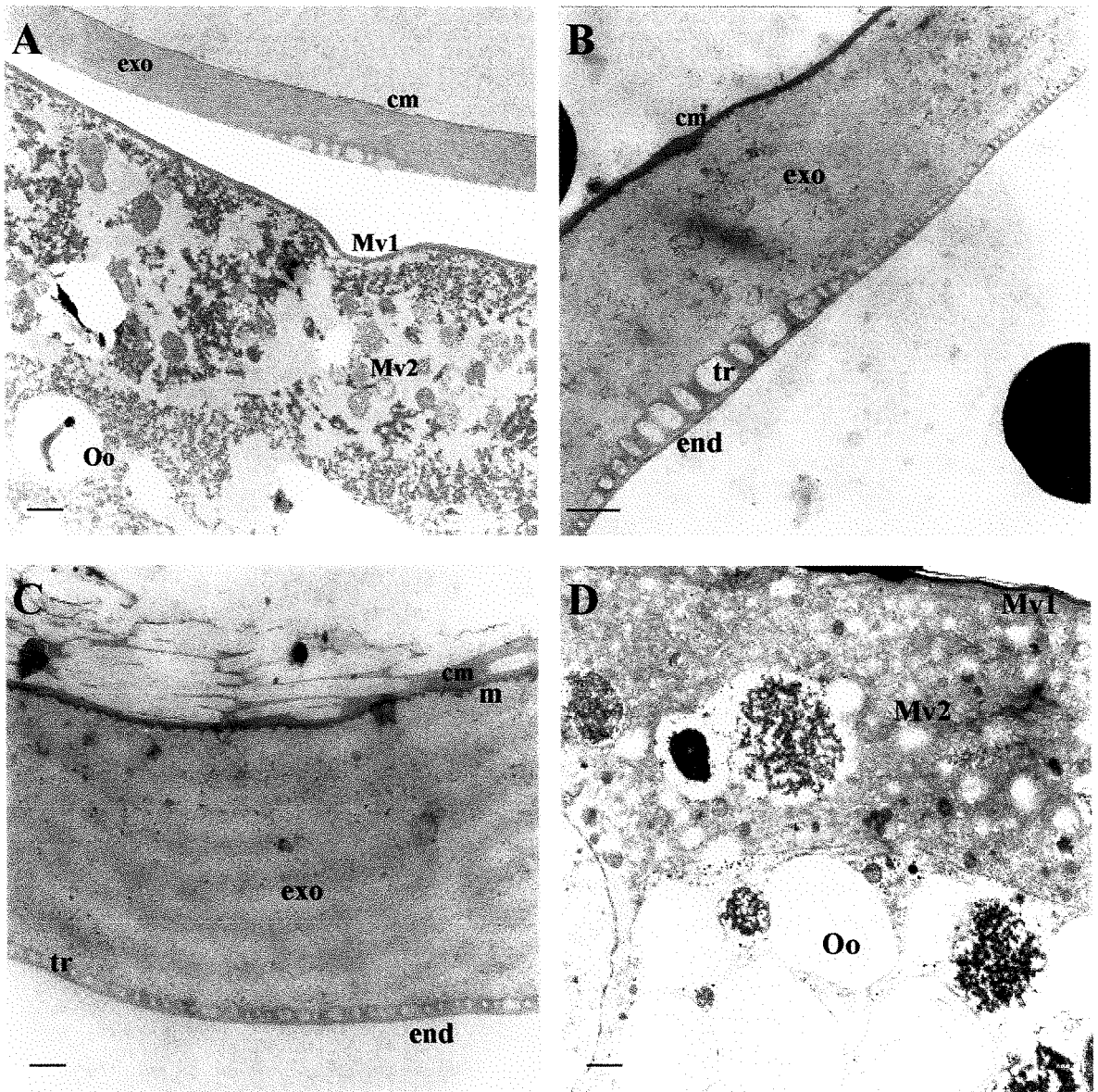


Figura 18. Estrutura fina do córion de *D. saccharalis*. A estrutura geral (6.600 x); B. detalhe do córion (22.000 x). Notar a camada trabecular (30.000 x); D. detalhe da membrana vitelínica (10.000 x) (cm = camada de muco; end = endocóron; exo = exocóron; m = membrana; Mv = membrana vitelínica; Oo = ooplasma; tr = camada trabecular) (Escala: A e D = 1,7 μ m; B = 1,1 μ m; C = 0,4 μ m).

extensão, sendo a sua espessura de 0,60 - 1,00 μm , reduzida a 0,20 - 0,40 μm nos pontos mais finos desta camada. Endocóron delgado, com cerca de 0,1 μm de espessura. Córion apresentando espessura variando de 4,80 a 6,53 μm , podendo chegar a 7,53 μm nos pontos onde a camada trabecular é mais espessa. (Figura 18). Membrana vitelínica (11,5 μm) apresenta uma camada externa delgada, densa, e uma segunda, mais interna, bem mais espessa, que apresenta granulação intensa (Figura 18). Devido ao seu formato achatado, o volume dos ovos de *D. saccharalis* não puderam ser determinados pelas fórmulas aqui utilizadas.

- *H. virescens*: hospedeiro natural de *T. pretiosum*. Ovo branco, passando ao amarelo palha ao final do desenvolvimento embrionário. Visto lateralmente apresenta formato cilíndrico e em vista superior, formato circular. Apresenta comprimento de 551,8 μm e largura de 499,5 μm . Córion de esculturação destacada. Nove a dez saliências bem pronunciadas, que partem logo acima da base do ovo, percorrem toda a extensão longitudinal até próximo à micrópila. Entre essas saliências, há outras que terminam logo abaixo da extremidade anterior, conferindo um aspecto ondulado à superfície do ovo. Ambas saliências são percorridas por elevações longitudinais, que se estendem da região anterior até próximo à base do ovo. Córion com inúmeros orifícios de diâmetro extremamente reduzido, conferindo à superfície do córion textura rugosa. A região da micrópila é circundada por 11-13 células primárias de extremidade distal arredondada. As aerópilas estão presentes nas extremidades das saliências que terminam próximo à micrópila e em uma pequena faixa que circunda todo o ovo, em seu terço superior. A região posterior do ovo de *H. virescens* não apresenta qualquer ornamentação do córion (Figura 19). O córion é dividido em 5 camadas, sendo encontrada externamente uma camada de muco de espessura bastante variável (0,90 - 9,15 μm), que recobre desuniformemente o ovo de *H. virescens*, chegando a estar ausente em determinadas regiões. Nessa camada ainda é possível verificar a presença de inclusões cristalinas de tamanho variável (Figura 20). Abaixo da camada de muco, quando presente, ocorre uma fina membrana (12 a 18 nm) recobrendo uma camada lamelar, o exocórion. Essa camada, por sua vez, apresenta espessura ao redor de 2,40 - 3,93 μm nas regiões planas do córion. A camada

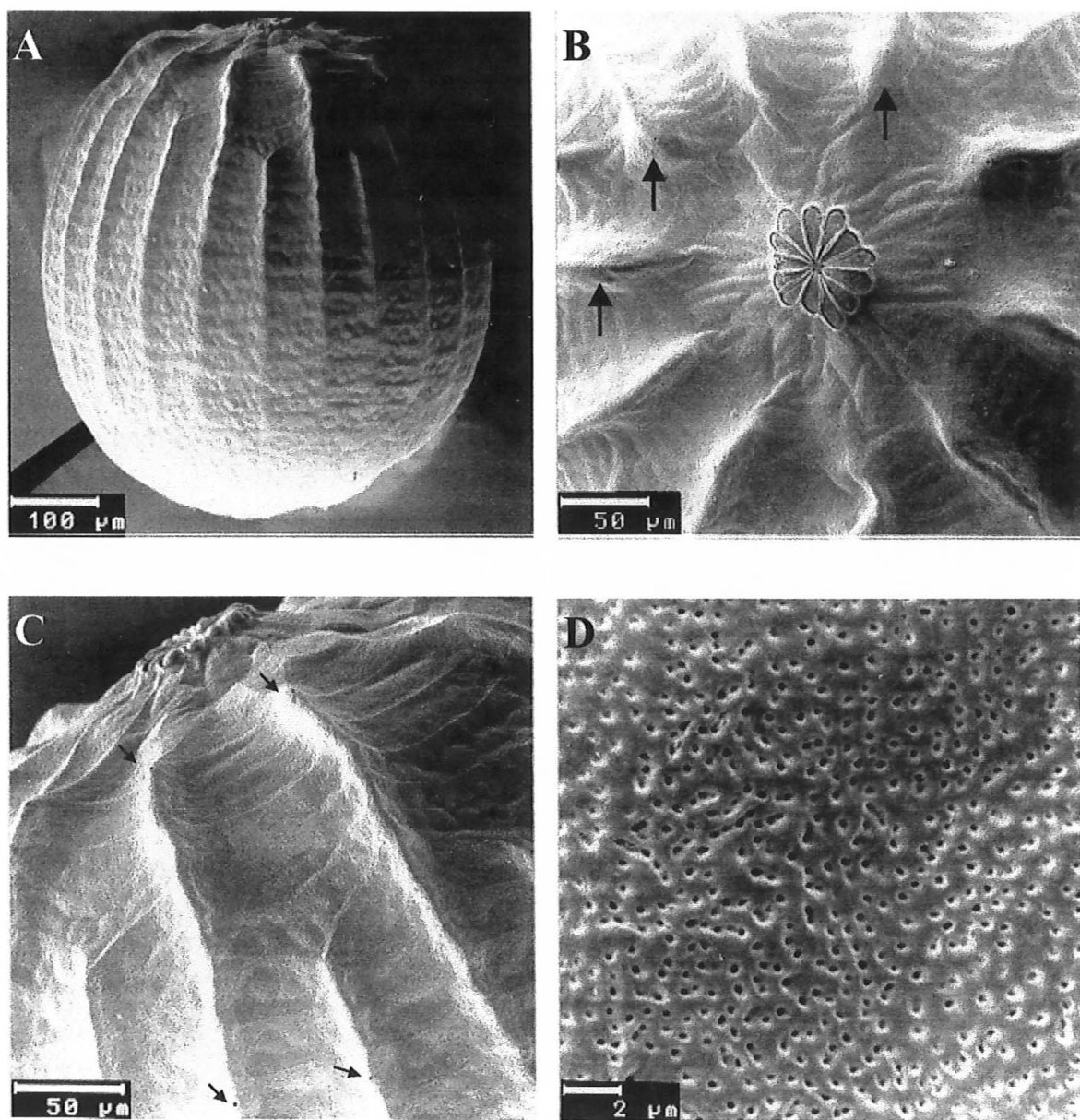


Figura 19. Ovo de *H. virescens*. A. vista lateral (225 x); B. vista superior, mostrando em detalhe a região da micrópila e aerópilas (setas) (450 x); C. aerópilas da região lateral do ovo; D. microestrutura (textura) do córion (7.500 x).

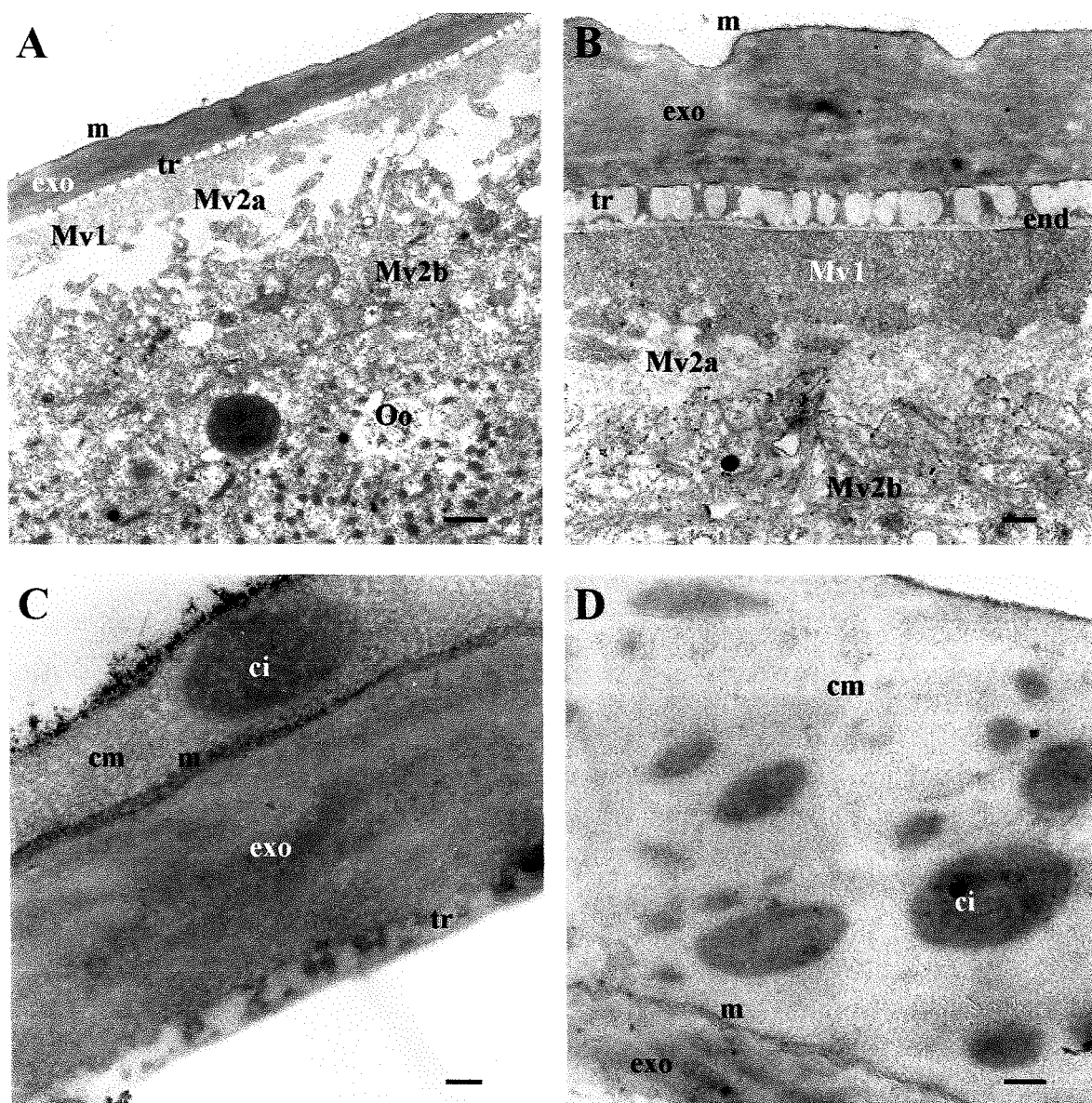
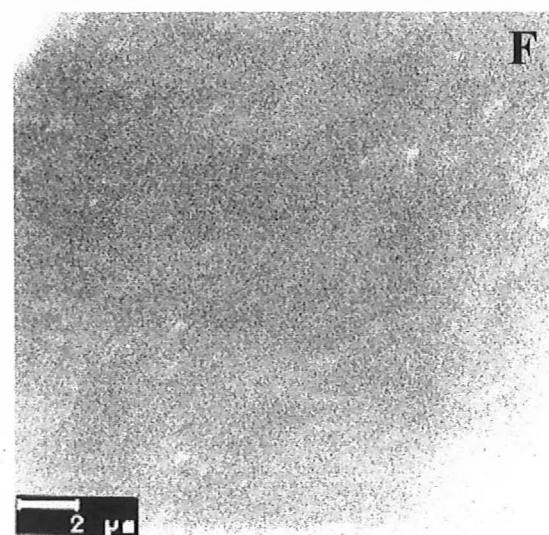
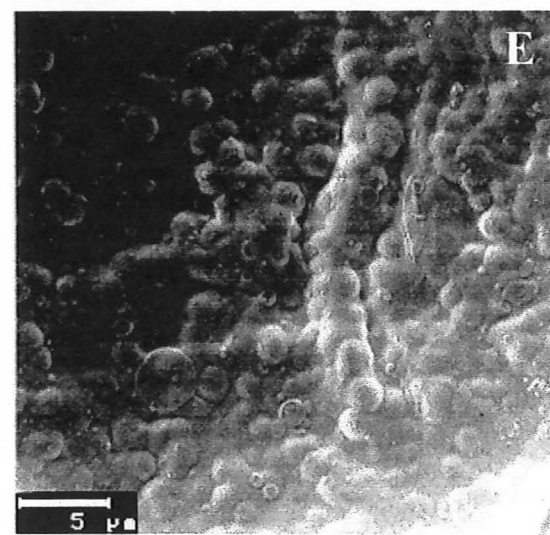
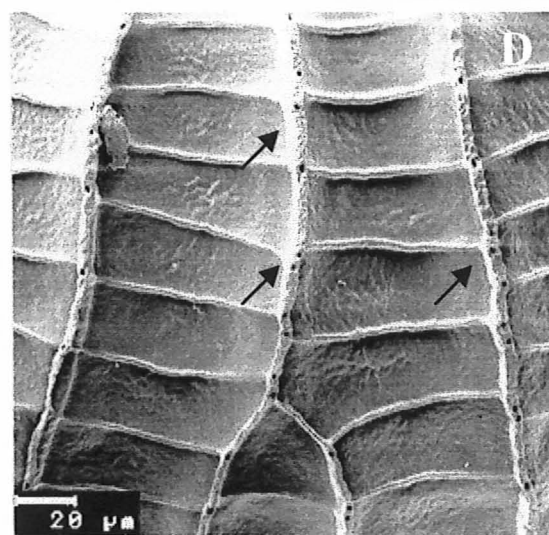
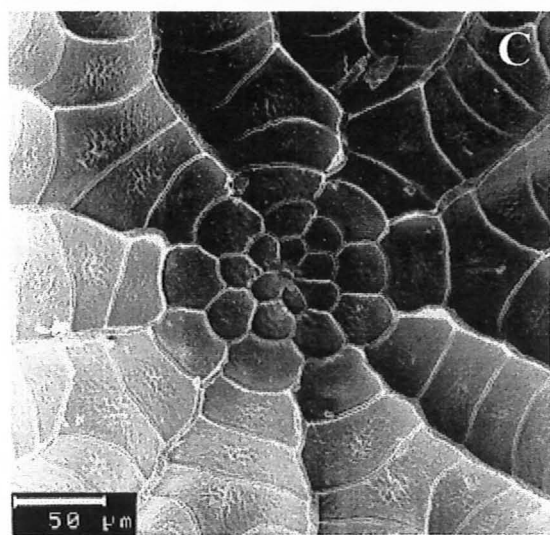
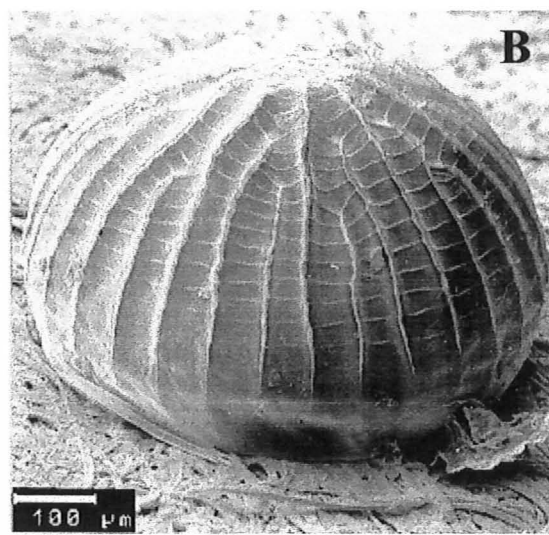
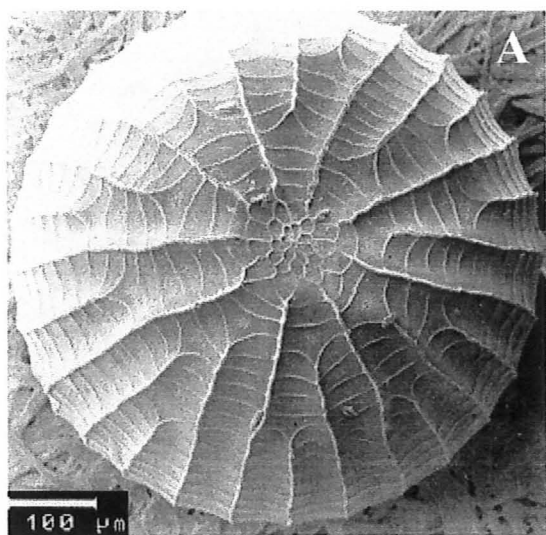


Figura 20. Estrutura fina do córion de *H. virescens*. A. estrutura geral (7.000 x); B. detalhe do córion (15.000 x); C e D. detalhe da camada de muco de diferentes espessuras, contendo corpos de inclusão (18.000 e 40.000 x) (Escala: A = 1,7 μm ; B e C = 0,6 μm ; D = 0,4 μm) (ci = corpo de inclusão; cm = camada de muco; end = endocóron; exo = exocóron; m = membrana; Mv = membrana vitelínica; Oo = ooplasma; tr = camada trabecular).

seguinte, a trabecular, é sustentada por colunas que se ramificam tanto na base como na porção superior, formando uma rede de canais conjuntos. A sua espessura varia de 0,68 a 0,77 μm . Logo abaixo encontra-se o endocóron, bastante delgado, com cerca de 94,28 nm de espessura. A espessura do córon em *H. virescens* pode ser bastante variável devido a camada de muco que o recobre, podendo variar de 4,00 a 13,15 μm (Figura 20). A membrana vitelínica, com 5 μm de espessura, é formada por duas camadas bastante distintas. A primeira, é homogênea, extremamente fina (cerca de 60 nm). Coloca-se acima de uma camada esponjosa que se subdivide em duas camadas: uma de maior elétron densidade, colocada logo abaixo da primeira camada, e a outra de menor elétron densidade (Figura 20). O volume do ovo é de 0,108 mm^3 . Fehrenbach *et al.* (1987), descrevendo o córon de ovos de *H. virescens* de diversos estados fisiológicos e idade, observaram estrutura semelhante àquela encontrada nesse trabalho para ovos fertilizados e fixados em um período de até 2 h após a sua deposição.

- *A. gemmatalis*: hospedeiro natural de *T. pretiosum*. Ovo de coloração variada. Normalmente apresenta coloração inicial azul-esverdeada, passando por um escurecimento gradual até a eclosão. Em vista superior, o ovo de *A. gemmatalis* apresenta formato circular e, lateralmente, sua região anterior apresenta-se arredondada e a posterior achatada, conferindo o formato de um disco. Apresenta comprimento de 628,2 μm e altura de 428,0 μm . O córon é percorrido da base ao topo por 9-10 elevações conspícuas, que atingem as células terciárias colocadas ao redor da micrópila, e por uma a duas elevações que se colocam entre as anteriores, terminando logo abaixo da região anterior do ovo. Saliências laterais ligam essas elevações, formando pequenas áreas de formato retangular. A micrópila é circundada por células primárias, secundárias e terciárias. Aerópilas em número abundante, presentes ao longo das elevações que percorrem o ovo da região posterior à anterior, sempre nos locais de contato entre as saliências. A região posterior do ovo é lisa, sem qualquer esculturação (Figura 21). O volume do ovo de *A. gemmatalis* é de 0,089 mm^3 . O córon é dividido em várias camadas, conferindo a ele uma espessura entre 3,75 e 5,81 μm , que poderá atingir 10,76 μm , nos pontos onde o exocóron alcançar a sua espessura máxima (Figura 22). O córon apresenta como primeira camada uma membrana muito fina, colocada externamente.

Figura 21. Ovo de *A. gemmatalis*. A. vista superior (217 x); B. vista lateral (202 x); C. micrópila (450 x); D. aerópilas (750 x); E. microestrutura (textura) do córion na região das células primárias que envolvem a micrópila (7.500 x); F. microestrutura (textura) geral do córion (7.500 x).



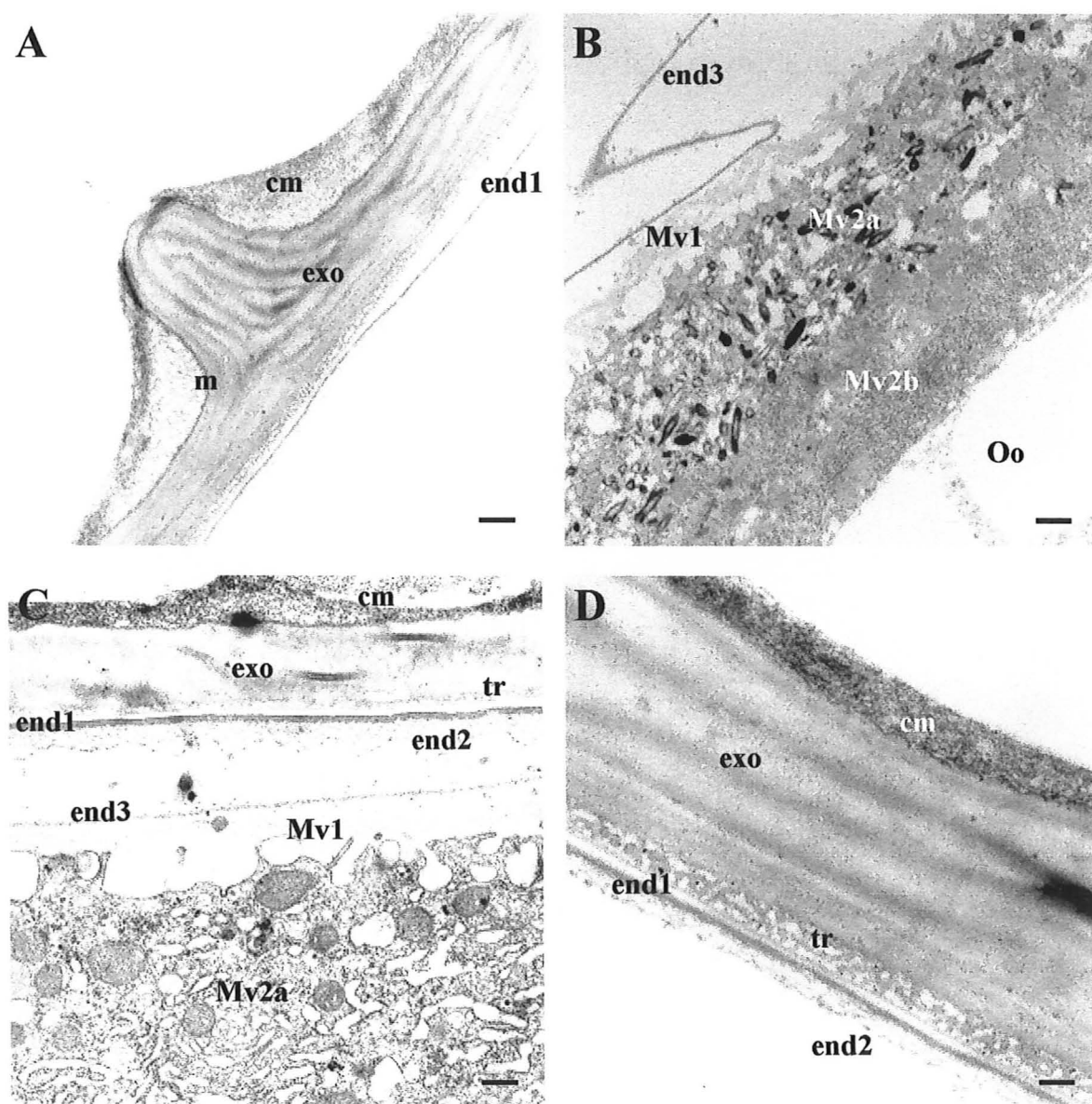


Figura 22. Estrutura fina do córion de *A. gemmatalis*. A. detalhe do córion (9.000 x); B. detalhe da membrana vitelínica (9.000 x); C. estrutura geral (16.000 x); D. detalhe do córion mostrando a disposição diferenciada da camada trabecular (25.000 x) (cm = camada de muco; end = endocóron; exo = exocóron; m = membrana; Mv = membrana vitelínica; Oo = ooplasma; tr = camada trabecular) (Escala: A e B = 1,1 μ m; C = 0,6 μ m; D = 0,4 μ m).

Recobrimo essa membrana existe uma camada de muco com espessura de 1,10 a 1,92 μm . O exocóron, que mede cerca de 2,20 a 2,47 μm de espessura, localiza-se logo abaixo da membrana que recobre o córon, e caracteriza-se por ser uma camada lamelar. Essa pode chegar a medir 7,42 μm nas regiões onde ocorre elevações do córon, visualizadas externamente, percorrendo a sua superfície longitudinalmente. A camada seguinte, a trabecular, é extremamente delgada (0,41 - 0,55 μm), sendo a sua estrutura, em determinadas regiões, distinta da normalmente descrita (presença de colunas que se anastomosam em uma ou ambas extremidades). A modificação é dada pela ausência de colunas bem definidas entre os canais formados, sendo que esses ocorrem aleatoriamente. A camada interna do endocóron é densa, de espessura uniforme (aproximadamente 85,7 nm). Logo abaixo encontra-se uma camada de deposição irregular de 0,31-0,86 μm . Em direção à membrana vitelínica ainda é possível visualizar uma fina camada de alta elétrion densidade, com cerca de 60 nm de espessura. A membrana vitelínica, com 12,5 μm de espessura, apresenta 2 camadas, sendo a externa de densidade homogênea, com 0,34 μm de espessura. A interna, de aspecto esponjoso, divide-se em 2 outras camadas. A primeira, a mais externa, apresenta menor elétrion densidade, e emite invaginações em direção à primeira camada da membrana vitelínica. A outra, a mais interna, apresenta maior homogeneidade e elétrion densidade (Figura 22).

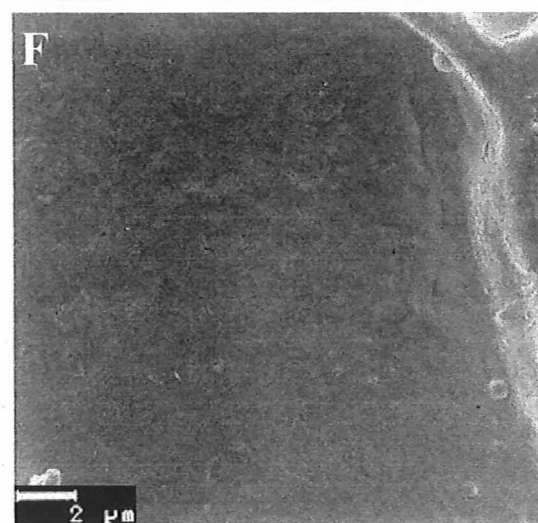
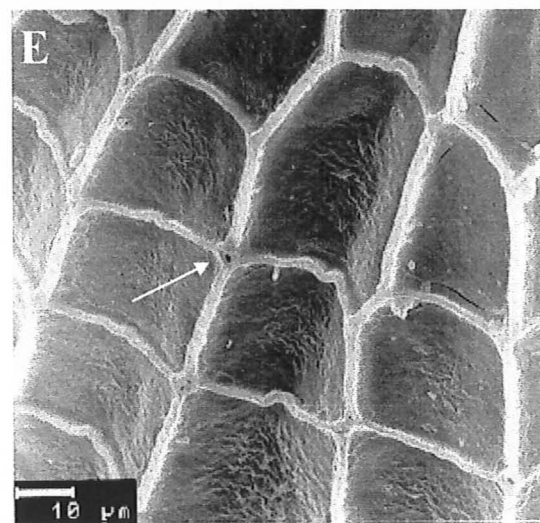
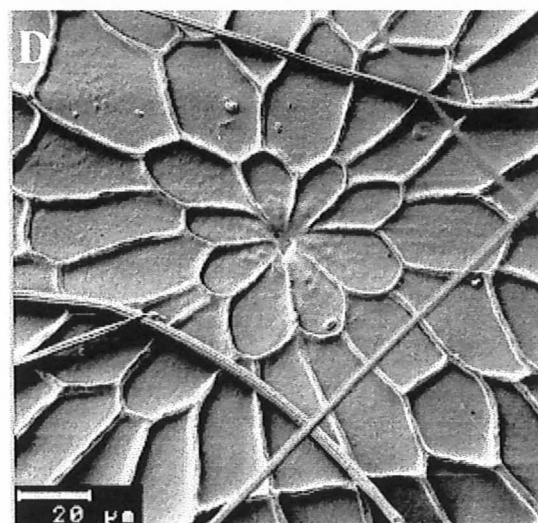
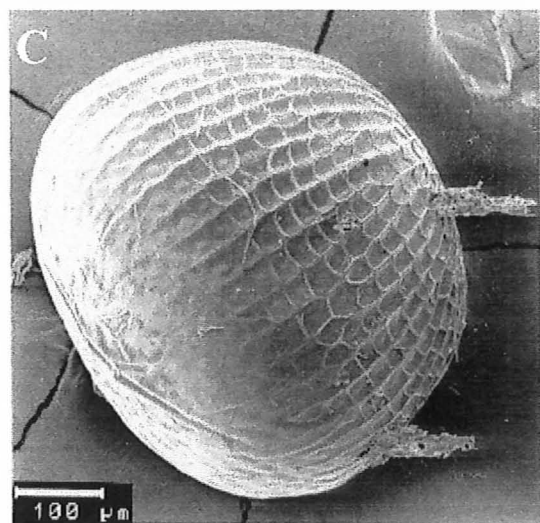
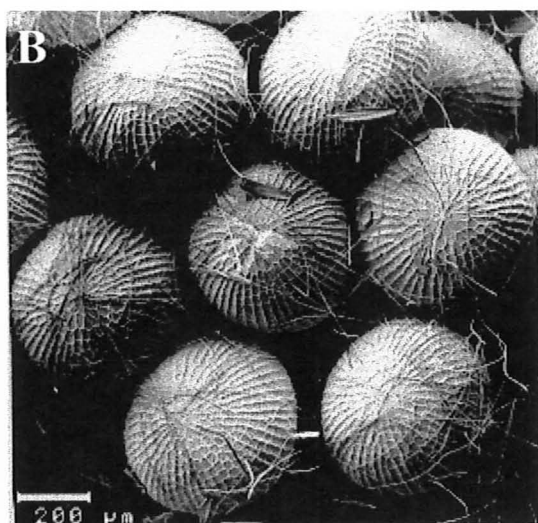
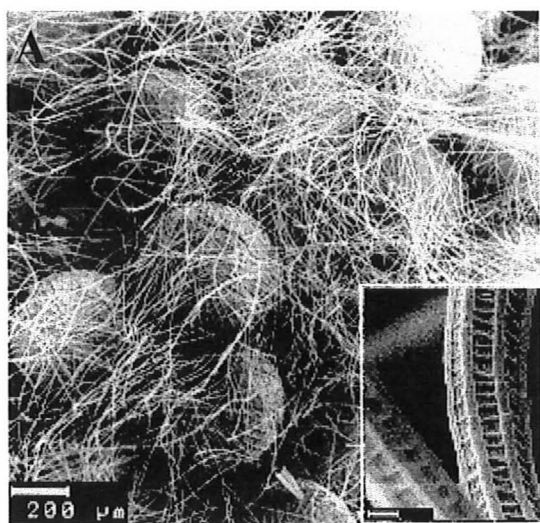
- *S. frugiperda*: hospedeiro natural de *T. pretiosum*. Postura agrupada, normalmente colocada em várias camadas sobrepostas (2 - 3). As posturas realizadas por fêmeas mais novas são recobertas por uma densa camada de pêlos, que são retirados do tufo anal das fêmeas. Já as posturas realizadas por fêmeas mais velhas, apresentam os ovos recobertos com uma quantidade muito reduzida desses pêlos. Ovo de coloração variada do cinza-azulado ao esverdeado no início do desenvolvimento embrionário, assumindo tonalidade marrom-avermelhada ao final desse estágio. A coloração dos ovos de *S. frugiperda* pode ser bastante variada e parece estar relacionada à fonte nutricional utilizada pelo inseto durante a sua fase imatura, visto ter sido relatada a ocorrência de posturas com número variável de 12 a 24 cores, dependendo da fonte de alimento utilizada pelo inseto, dieta natural ou dieta a base de feijão, respectivamente (Nalim, 1991). Formato quase circular, apresentando comprimento de

454,9 μm e largura de 390,2 μm . Córion com esculturação pronunciada, formada por elevações longitudinais e transversais que se inter cruzam, estabelecendo pequenas áreas de formato quase quadrangular. As células primárias que circundam os orifícios da micrópila apresentam formato de roseta, ocorrendo uma modificação no formato das fileiras sucessivas de células que circundam as primárias, à medida que se caminha para a região posterior, passando a apresentar aspecto quadrangular. O terço inferior dos ovos de *S. frugiperda* não apresenta esculturação do córion. Córion de textura lisa (Figura 23). Aerópilas em quantidade razoável, localizadas nos pontos de contato entre as elevações longitudinais e verticais. Córion de espessura variável de 2,50 a 4,44 μm , atingindo até 11,95 μm nos locais de maior espessura do exocórion. Exocórion recoberto por uma camada de muco de espessura bastante variável (1,33 - 2,55 μm), apresentando o seu ponto de maior espessura junto às elevações do córion, que o percorrem longitudinalmente. A espessura do exocórion oscila entre 0,57 e 1,33 μm , chegando a 10,20 μm nas regiões de elevações do córion. A camada trabecular mede cerca de 0,56 μm , não apresentando grandes variações na sua espessura, assim como encontrado para as demais espécies. Endocórion, localizado logo abaixo da camada trabecular, bastante delgado (40 - 133 nm). Membrana vitelínica (15,1 μm) com a sua primeira camada bastante fina, de densidade homogênea. A segunda camada subdivide-se em duas camadas com elétrons de densidade distintas. Aquela colocada externamente apresenta menor elétrons de densidade do que a posicionada internamente (Figura 24). Volume do ovo de 0,036 mm^3 .

Possíveis relações existentes entre a estrutura dos ovos do hospedeiro e o desenvolvimento do parasitóide:

O conhecimento da estrutura superficial e da estrutura fina do córion das diversas espécies de hospedeiros de *T. galloi* e *T. pretiosum* permite especular sobre determinados mecanismos, além de sugerir possíveis relações quanto às exigências apresentadas pelos parasitóides para o seu desenvolvimento em condições naturais. Como exemplo, pode-se comparar a estrutura do ovo do hospedeiro natural de *T. galloi*, *D. saccharalis*, com a dos seus hospedeiros alternativos. Ao se analisar a estrutura do córion do ovo de *D. saccharalis* é

Figura 23. Ovo de *S. frugiperda*. A. vista geral da postura realizada por fêmea recém-emergida (75 x). No detalhe: Pêlo que recobre a postura (10.000 x); B. vista geral da postura realizada por fêmea de idade mais avançada (90 x); C. vista geral de um ovo individualizado. Notar a ausência de esculturação do córion no terço inferior do mesmo (150 x); D. área micropilar (750 x); E. aerópila (1.500 x); F. microestrutura (textura) do córion (7.500 x).



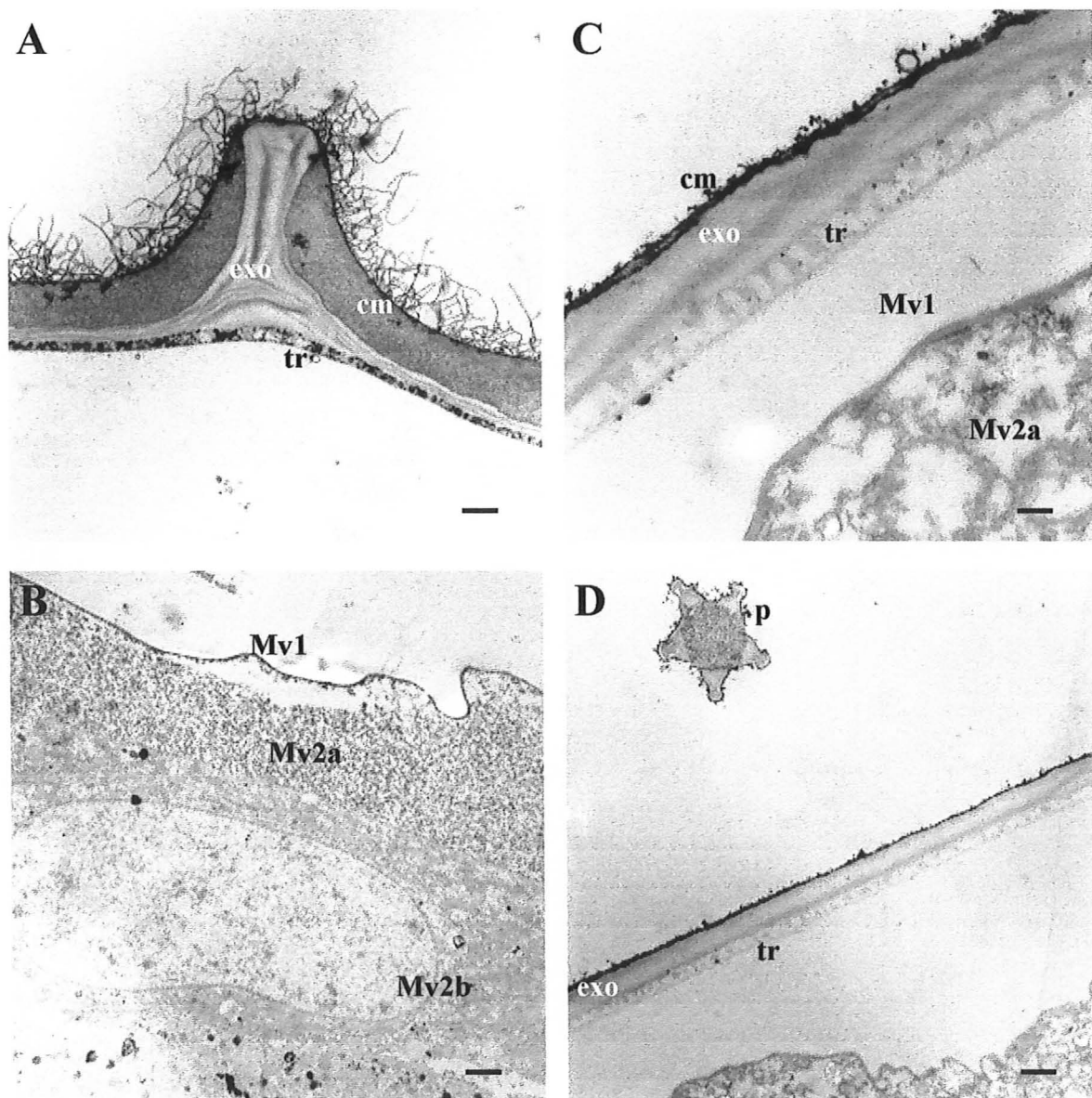


Figura 24. Estrutura fina do córion de *S. frugiperda*. A. detalhe do córion mostrando elevação da sua superfície (6.600 x); B. detalhe da membrana vitelínica (3.800 x); C. detalhe do córion (25.000 x); D. Pêlo recobrendo ovo de *S. frugiperda*. Notar a espessura do pêlo em relação ao córion (10.500 x) (cm = camada de muco; end = endocóron; exo = exocóron; Mv = membrana vitelínica; p = pêlo; tr = camada trabecular) (Escala: A = 1,7 μ m; B = 2,5 μ m; C = 0,4 μ m; D = 1,1 μ m).

possível verificar que se trata de um ovo bastante sensível ao ressecamento, pois apresenta características que facilitam a troca gasosa, principalmente no final do estágio larval e pupal quando a taxa metabólica de *Trichogramma* é bastante elevada (Dai *et al.*, 1982). Apesar de muitos ovos de insetos já conterem o suprimento de oxigênio necessário para o desenvolvimento embrionário armazenado na camada trabecular logo após a sua postura (Hinton, 1981), as características encontradas nos ovos de *D. saccharalis* levam à suposição de que esse poderia ser um dos fatores pelo qual esse parasitóide apresenta um desenvolvimento inicial muito reduzido em ovos de hospedeiros alternativos, os quais apresentam raras aerópilas, além de possuírem camadas protetoras contra a dessecação (muco ou ceras). Essa suposição fica reforçada quando se supõe um certo grau de adaptação entre o parasitóide e o hospedeiro que, particularmente para *T. galloi*, parece ser bastante alto, visto ser esse parasitóide relatado parasitando apenas ovos de *Diatraea* spp. (Zucchi & Monteiro, 1997). O aumento na exploração desses hospedeiros alternativos, em condições de laboratório, por *T. galloi* poderia ser dado pela seleção de indivíduos mais vigorosos, assim como sugerido por Gomes (1997), ou provavelmente, de indivíduos que apresentassem menor taxa metabólica durante o seu desenvolvimento.

Outra característica representada nos estudos de estrutura dos ovos dos hospedeiros de *T. galloi* e *T. pretiosum*, é a variação na abundância de pêlos de *S. frugiperda* recobrimdo as massas de ovos desses insetos. O parasitismo de ovos de *S. frugiperda* por *T. pretiosum*, seja na natureza ou em condições de laboratório, é normalmente bastante reduzido (J.R.P. Parra, informação pessoal). No entanto, os testes de comportamento realizados em laboratório (ver item 4.5, Figura 26), utilizando-se ovos de *S. frugiperda* contendo uma quantidade muito reduzida desses pêlos, indicaram a aceitação e o parasitismo de quase 100% dos ovos estudados por 93% das fêmeas observadas. Esse valor de fêmeas que localizaram e parasitaram os ovos foi superior inclusive aos valores apresentados por fêmeas de *T. pretiosum* em contato com ovos de hospedeiros conhecidamente mais parasitados, *A. kuehniella* e *A. gemmatalis*. Certamente esses pêlos desempenham algum papel na proteção dos ovos de *S. frugiperda*, seja através da ação mecânica, por dificultarem o acesso do ovipositor da fêmea ao ovo, visto que a espessura do pêlo chega a ser de 2 a 3 vezes superior

a do córion do ovo desse inseto (Figura 24D), ou pela presença de substâncias químicas adsorvidas a ele. Os valores oscilantes de parasitismo encontrado em condições naturais ou de laboratório poderiam estar relacionados à idade do adulto que realizou aquela postura, visto que a densidade de pêlos é visivelmente inferior em posturas realizadas por fêmeas mais velhas (Figura 23A e B).

4.5 Estudo do comportamento de parasitismo de *T. galloi* e *T. pretiosum*

T. galloi e *T. pretiosum* apresentaram padrão típico de comportamento de parasitismo das espécies desse gênero (Klomp *et al.*, 1980), envolvendo as principais etapas abordadas nesse estudo (Figura 25). Fêmeas do parasitóide, ao tocarem o ovo do hospedeiro com suas antenas (contato), iniciam o processo de avaliação do hospedeiro. As fêmeas percorrem toda a superfície do hospedeiro, de uma extremidade à outra, até tocarem o substrato no qual o hospedeiro foi depositado, quando retornam para a outra extremidade do ovo. Durante esse caminhar sobre a superfície do ovo, as fêmeas movimentam continuamente as antenas para cima e para baixo, fazendo com que as mesmas estejam em contato constante com o córion do hospedeiro. Em seguida, a fêmea interrompe essa movimentação, apoiando a extremidade distal do abdome sobre a superfície do hospedeiro, retirando o ovipositor do interior da bainha. Logo após, o ovipositor é apoiado sobre o córion e a fêmea inicia a perfuração do mesmo. Com a completa introdução do ovipositor no hospedeiro, a fêmea inicia a colocação do ovo (oviposição), que é precedida por movimentos intensos do abdome, que podem ser variáveis conforme o sexo da progênie depositada (Suzuki *et al.*, 1984). Após a oviposição, a fêmea retira o ovipositor do hospedeiro fazendo movimentos circulares e, em certos casos, alimenta-se do líquido que extravasa pelo orifício de postura, logo em seguida (Figura 25).

O comportamento de parasitismo de *T. galloi* e *T. pretiosum* apresentou diferenças quanto aos parâmetros observados entre os diversos hospedeiros estudados (Tabelas 3 e 4), sendo que a alimentação do adulto sobre o ovo hospedeiro e a marcação do ovo parasitado não foram padrões apresentados por todas as fêmeas, ou que se repetiram para todos os hospedeiros parasitados.

A porcentagem de fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum* que aceitaram os diferentes hospedeiros estudados foi variável (Figura 26), podendo a rejeição ocorrer em qualquer etapa do parasitismo. A porcentagem de fêmeas de *T. galloi* que aceitaram os hospedeiros foi decrescente com o tamanho dos mesmos, sendo os valores de rejeição de ovos de *A. kuehniella* e *S. cerealella* igual ou superior a 50% (Figura 26). Essas observações concordam com as dificuldades encontradas na produção de *T. galloi* sobre ovos dos hospedeiros alternativos, *A. kuehniella* e *S. cerealella*, com especial referência para a última espécie (Parra, 1997). Para *T. pretiosum*, *S. cerealella* foi o único hospedeiro cuja porcentagem de aceitação foi inferior a 85% (Figura 26). Esses resultados ainda indicam que a baixa aceitação de ovos de *A. kuehniella* e *S. cerealella* como hospedeiros de *T. galloi* se deu devido a estímulos físicos ou químicos de contato, pois a rejeição ocorreu após o contato com os mesmos, o que envolveu a sua localização. Por outro lado, a menor aceitação de ovos de *S. cerealella* por *T. pretiosum* parece estar relacionada tanto com os efeitos encontrados para *T. galloi*, como também à ausência ou insuficiência de componentes químicos que permitissem a localização do hospedeiro, visto que, nesse caso, ocorreu 31% de rejeição (envolvendo contato) e de fêmeas inativas, que sequer localizaram o hospedeiro (Figura 26). O tempo gasto para a localização dos ovos de *S. cerealella* foi superior ao dos demais hospedeiros, para ambos os parasitóides (Figura 27).

A aceitação do hospedeiro após o contato envolve diferentes estímulos físicos (tamanho, formato, cor e textura) e químicos externos (escamas do hospedeiro e componentes químicos de contato associados ao ovo do hospedeiro) e internos (aminoácidos e ions inorgânicos) (Wu & Qin, 1982; Nettles *et al.*, 1983; Pak, 1988; Qin & Wu, 1988; Noldus, 1989; Nordlund, 1994). Apesar da polifagia apresentada pelas espécies de *Trichogramma* e da resposta positiva a escamas de inúmeros hospedeiros, indicando a presença de um componente comum funcionando como atraente (Thomson & Stinner, 1990), em algumas associações hospedeiro-parasitóide os componentes químicos presentes nas escamas podem atuar como repelentes (Ohta *et al.*, 1994).

A rejeição de *A. kuehniella* e *S. cerealella*, onde os ovos apresentam formato, textura (ver item 4.3) e composição qualitativa de aminoácidos livres (Barret & Schmidt,

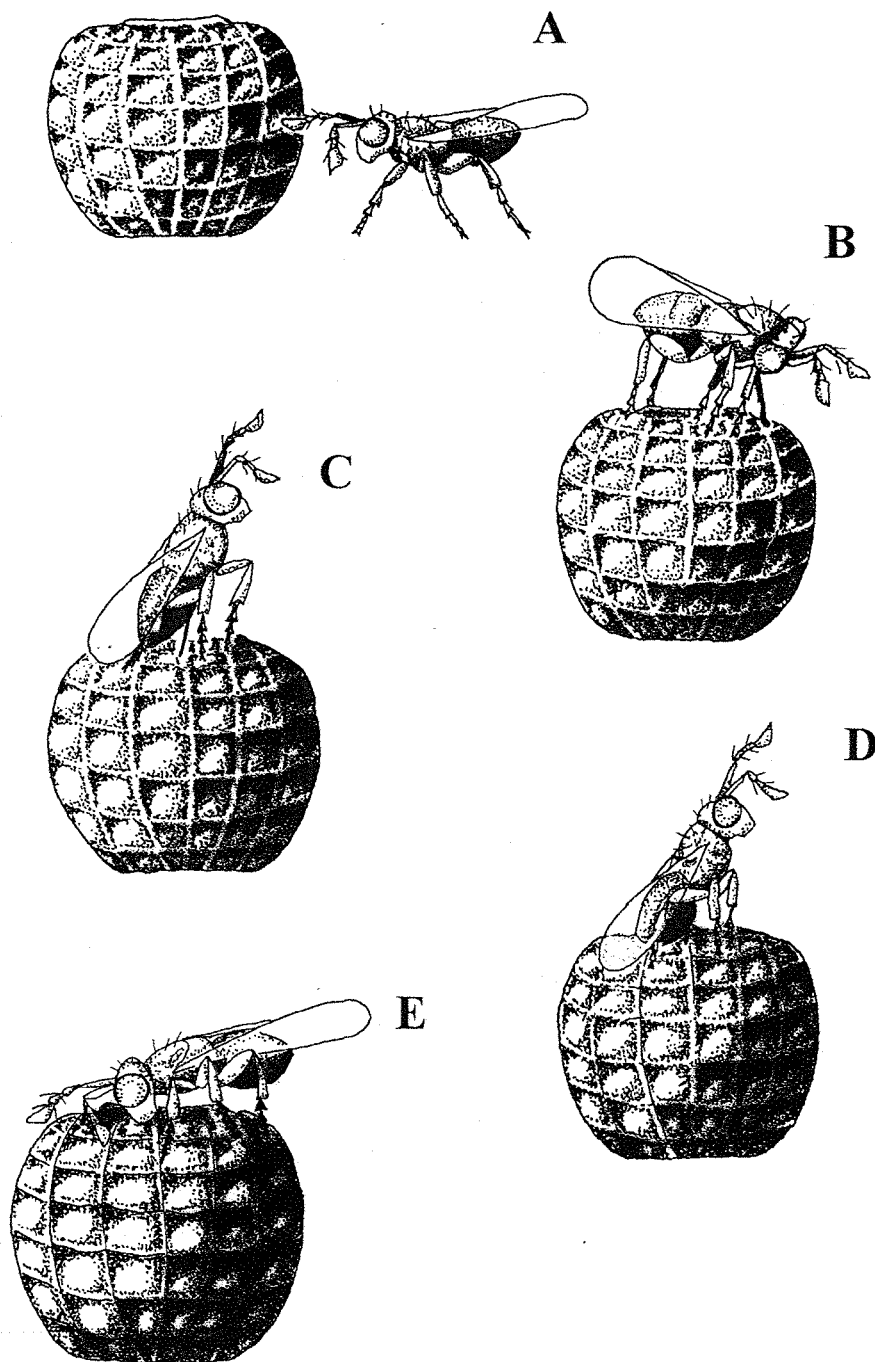


Figura 25. Principais etapas do comportamento de parasitismo de fêmeas de *Trichogramma*. A. contato, B. avaliação, C. perfuração, D. oviposição, E. alimentação (Desenho por P. Milano).

1991; Cónsoli & Parra, 1996a) semelhantes ao de outros hospedeiros, por *T. galloi* parece estar associada à presença de algum componente químico de contato ou ao tamanho dos ovos (os menores aqui estudados - ver item 4.3). Reznik & Umarova (1991) verificaram que o parasitismo de ovos de *S. cerealella* por sete espécies de *Trichogramma* foi dependente da relação entre o hospedeiro e o parasitóide. Os autores argumentaram que o número reduzido de fêmeas que aceitaram ovos de *S. cerealella* como hospedeiro, em condições onde eram oferecidos cinco ovos do hospedeiro às mesmas, foi decorrente da concentração dos caimônios que desencadeiam a retenção do parasitóide em áreas onde o hospedeiro encontra-se presente, devido ao fato da seqüência de parasitismo ter sido interrompida no estágio de descoberta do hospedeiro. Outro aspecto que também pode estar envolvido é o tamanho do ovo. Schmidt & Smith (1987b) relataram que a aceitação do hospedeiro por *T. minutum* estava condicionada ao tamanho do ovo do hospedeiro, compreendido entre 0,3 mm (0,014 mm³) e 3 mm de diâmetro (14 mm³), sendo que Flanders (1935) já havia sugerido que o limite do tamanho do hospedeiro para a sua aceitação poderia ser variável com o tamanho apresentado pelo parasitóide.

O período utilizado por fêmeas de *T. galloi* para a perfuração do córion do hospedeiro e para a oviposição foi variável para os hospedeiros estudados, *D. saccharalis*, *C. cephalonica*, *A. kuehniella* e *S. cerealella*. No entanto, a duração da etapa de avaliação foi semelhante para todas as espécies estudadas (Tabela 3). Apesar do período empregado para a avaliação não diferir entre os hospedeiros, fêmeas de *T. galloi* reduziram o tempo gasto nessa etapa do parasitismo quando em contato com o 2º e 3º ovo, para *D. saccharalis*, *C. cephalonica* e *S. cerealella* (Figura 28).

Apesar da espessura do córion dos ovos de *S. cerealella* (4,54 - 4,81 µm) ser próxima a dos ovos de *C. cephalonica* (4,18 - 5,32 µm) e *D. saccharalis* (4,80 - 6,53 µm), fêmeas de *T. galloi* necessitaram de um período maior para perfurar o primeiro hospedeiro. Ao mesmo tempo, ovos de *A. kuehniella*, com um córion menos espesso (2,63 - 3,23 µm), exigiram um período semelhante ao gasto em ovos mais espessos, como os de *D. saccharalis* e *C. cephalonica* (Tabela 3).

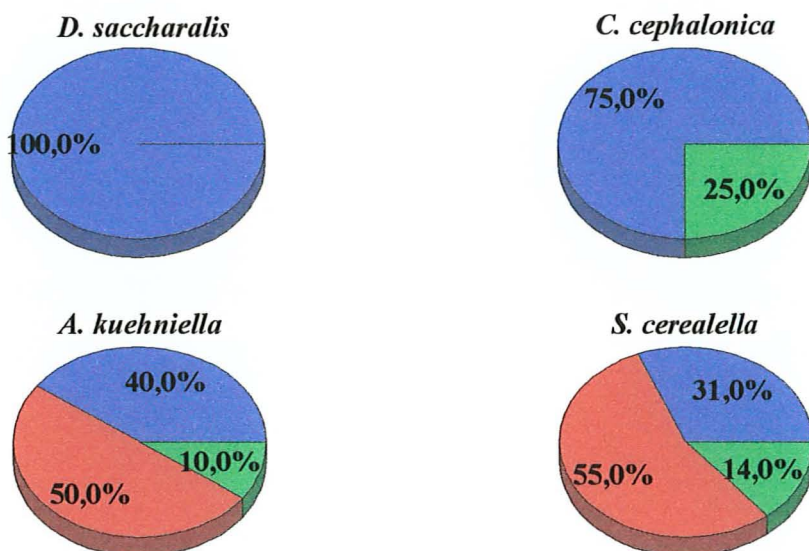
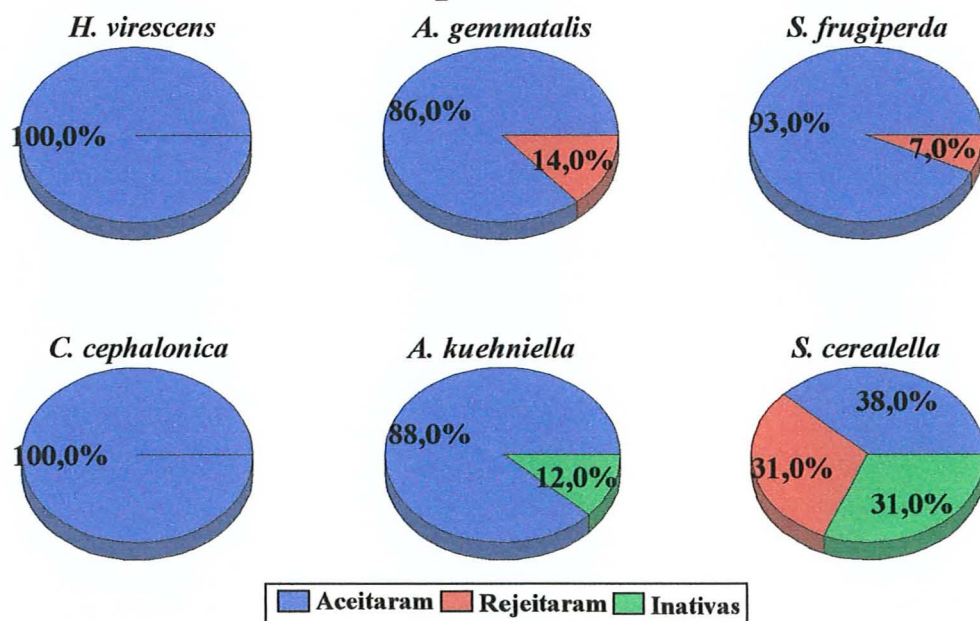
T. galloi*T. pretiosum*

Figura 26. Porcentagem (%) de fêmeas de *T. galloi* (A) e *T. pretiosum* (B) que aceitaram, rejeitaram ou permaneceram inativas, quando às mesmas foram oferecidos ovos de diversos hospedeiros naturais e alternativos. Temperatura: $24 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade relativa: $60 \pm 10\%$.

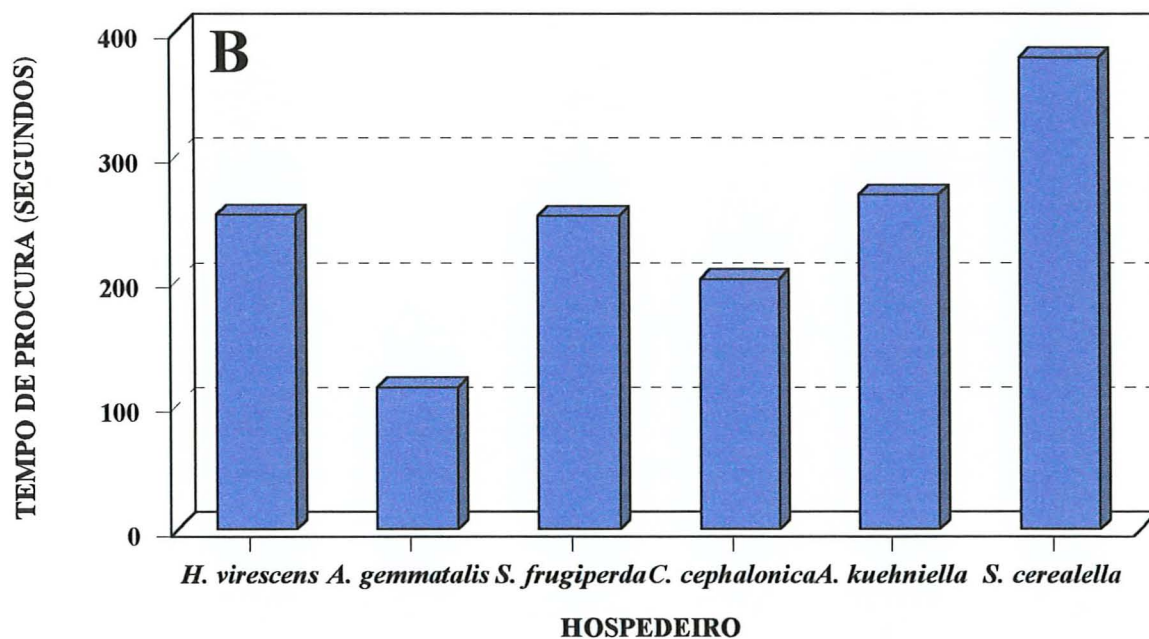
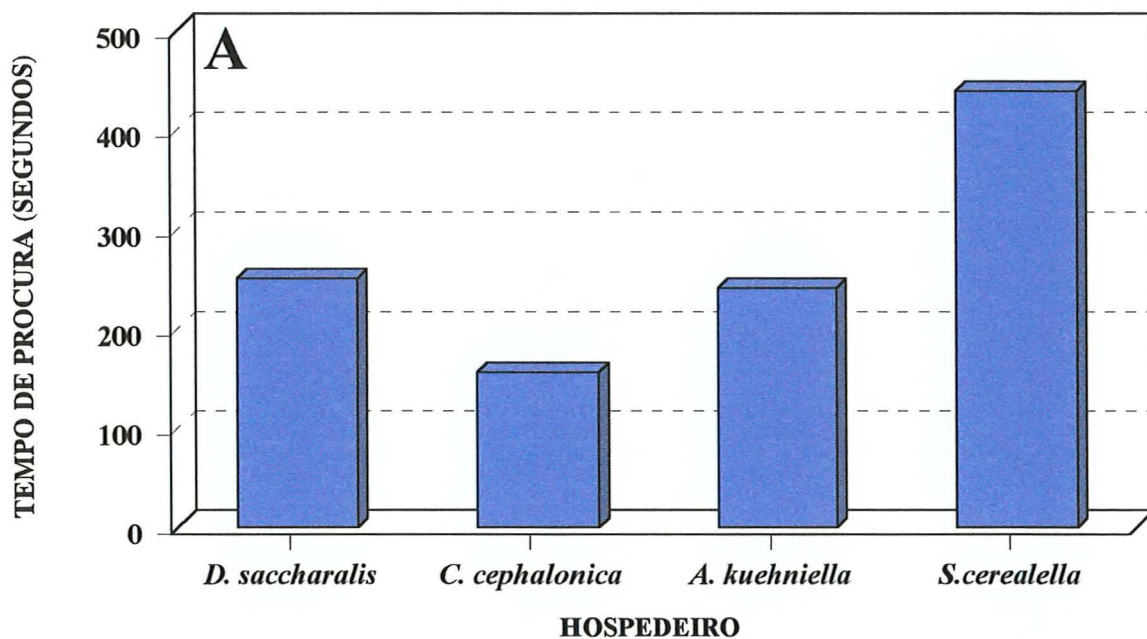


Figura 27. Tempo de procura (segundos) utilizado por fêmeas de *T. galloi* (A) e *T. pretiosum* (B) para a localização de diversos hospedeiros naturais e alternativos. Temperatura: $24 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade relativa: $60 \pm 10\%$.

Tabela 3. Duração (segundos) dos parâmetros de comportamento de avaliação, perfuração e oviposição, observados para *T. galloi* parasitando diversos hospedeiros. Temperatura: $24 \pm 1^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$.

Hospedeiro	Duração (s) das etapas do comportamento de parasitismo ($\bar{x} \pm \text{se}$) ¹		
	Avaliação	Perfuração	Oviposição
<i>D. saccharalis</i>	33,23 \pm 3,35a	40,31 \pm 1,57 b	68,38 \pm 3,89a
<i>C. cephalonica</i>	25,98 \pm 2,44a	41,15 \pm 3,33 b	62,44 \pm 6,96ab
<i>A. kuehniella</i>	32,56 \pm 4,80a	36,94 \pm 1,57 b	46,97 \pm 5,50 bc
<i>S. cerealella</i>	28,46 \pm 3,48a	54,58 \pm 3,28a	34,83 \pm 3,13 c

1. Médias seguidas da mesma letra dentro de uma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). (Avaliação: $F = 0,81$; g.l. = 3, 140; $P < 0,05$; Perfuração: $F = 6,64$; g.l. = 3, 139; $P < 0,05$; Oviposição: $F = 6,62$; g.l. = 3, 140; $P < 0,05$).

A duração da oviposição em ovos de *D. saccharalis* foi maior do que aquela em ovos de *A. kuehniella* e *S. cerealella*. O parasitismo de ovos de *C. cephalonica* apresentou duração intermediária aos de *D. saccharalis* e *A. kuehniella* (Tabela 3).

T. pretiosum, ao contrário de *T. galloi*, apresentou diferenças para todos os parâmetros de comportamento avaliados para os hospedeiros *H. virescens*, *A. gemmatalis*, *S. frugiperda*, *C. cephalonica*, *A. kuehniella* e *S. cerealella* (Tabela 4). O tempo de avaliação de ovos de *H. virescens* foi superior ao de *S. frugiperda* e *C. cephalonica*, sendo que para os demais hospedeiros, ovos de *A. gemmatalis*, *A. kuehniella* e *S. cerealella*, os valores foram intermediários (Tabela 4). *T. pretiosum* também reduziu o tempo gasto na avaliação dos hospedeiros subsequentes, após o parasitismo do primeiro hospedeiro, com exceção de *C. cephalonica* (Figura 28).

O período para a perfuração do córion foi superior em *H. virescens* (4,00 - 13,15 μm) e *A. gemmatalis* (3,75 - 5,81 μm) em relação aos demais hospedeiros. O período

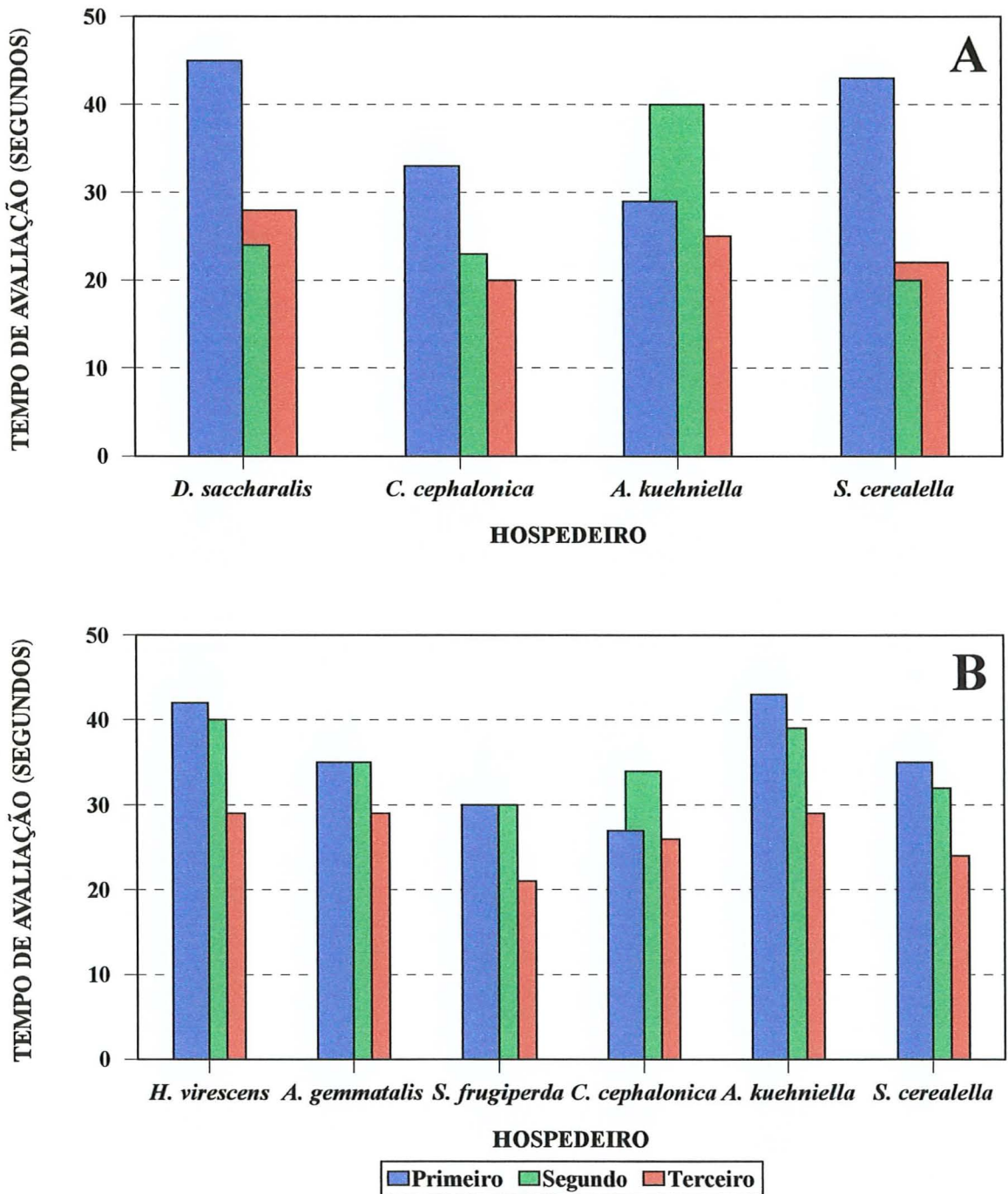


Figura 28. Tempo de avaliação (segundos) dos três primeiros ovos de diversos hospedeiros parasitados por *T. galloi* (A) e *T. pretiosum* (B). Temperatura: $24 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade relativa: $60 \pm 10\%$.

empregado na perfuração de ovos de *S. cerealella* foi intermediário ao de *A. gemmatalis* e aos dos demais, *C. cephalonica*, *A. kuehniella* e *S. frugiperda* (2,50 - 4,44 μm) (Tabela 4). novamente, *T. pretiosum* levou o mesmo período para perfurar ovos de espessuras distintas, como *A. kuehniella* (2,63 - 3,23 μm) e *C. cephalonica* (4,18 - 5,32 μm) (Tabela 4).

Tabela 4. Duração (segundos) dos parâmetros de comportamento de avaliação, perfuração e oviposição, observados para *T. pretiosum* parasitando diversos hospedeiros. Temperatura: $24 \pm 1^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$.

Hospedeiro	Duração (s) das etapas do comportamento de parasitismo ($\bar{x} \pm \text{se}$) ¹		
	Avaliação	Perfuração	Oviposição
<i>H. virescens</i>	39,43 \pm 2,51a	86,52 \pm 5,50a	120,64 \pm 10,72a
<i>A. gemmatalis</i>	34,72 \pm 2,32ab	62,11 \pm 3,98 b	98,28 \pm 5,94ab
<i>S. frugiperda</i>	27,78 \pm 2,01 b	47,28 \pm 2,40 c	76,57 \pm 6,16 bc
<i>C. cephalonica</i>	29,31 \pm 1,98 b	46,60 \pm 2,38 c	68,78 \pm 5,10 c
<i>A. kuehniella</i>	37,05 \pm 3,37ab	43,24 \pm 1,44 c	70,31 \pm 7,06 c
<i>S. cerealella</i>	30,82 \pm 2,54ab	52,11 \pm 2,51 bc	60,07 \pm 5,27 c

1. Médias seguidas pela mesma letra dentro de uma coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). (Avaliação: $F = 3,70$; g.l. = 5, 234; $P < 0,05$; Perfuração: $F = 25,46$; g.l. = 5, 234; $P < 0,05$; Oviposição: $F = 10,27$; g.l. = 5, 240; $P < 0,05$).

A oviposição em ovos de *H. virescens* foi a mais longa, sendo seguida por *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*. Os períodos gastos em ovos dos hospedeiros alternativos, *C. cephalonica*, *A. kuehniella* e *S. cerealella*, foram os mais reduzidos (Tabela 4).

As diferenças encontradas no período de avaliação dos hospedeiros por *T. pretiosum* estão relacionadas com a curvatura do ovo do hospedeiro, que é o parâmetro utilizado por

espécies de *Trichogramma* para avaliar o tamanho (volume) do hospedeiro. Esse comportamento é de fundamental importância para a espécie, pois permitirá à fêmea do parasitóide definir corretamente o tamanho da sua progênie a ser destinada àquele hospedeiro (Klomp & Teerink, 1962; Schmidt & Smith, 1985a, 1987a,b). O tempo gasto na avaliação do hospedeiro é variável com a espécie e a temperatura (Schmidt & Smith, 1987a,b; Schmidt & Pak, 1991).

As variações encontradas quanto a duração do período para a perfuração do córion dos ovos são dependentes de características como a espessura e resistência do mesmo (Schmidt, 1994). A capacidade de perfuração do córion também é dependente do tamanho do ovipositor das fêmeas de *Trichogramma* (Li, 1989). Pelos resultados apresentados, foi possível verificar que ovos de *A. kuehniella* (2,63 - 3,23 μm) apresentam o córion mais resistente à perfuração do que aqueles mais espessos, como *D. saccharalis* (4,80 - 6,53 μm) e *C. cephalonica* (4,18 - 5,32 μm), pois o período gasto para a perfuração foi semelhante (Tabelas 3 e 4). Essa diferença pode ser conferida a aspectos distintos conforme a comparação estabelecida, mas ela é primariamente determinada pela espessura e composição do exocóron, camada que apresenta a maior quantidade de quitina. Outro aspecto que pode influenciar é a presença da camada de muco recobrando os ovos desses insetos. Assim, a semelhança no período de perfuração de ovos de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* pode ter sido devido ao fato de ambas espécies apresentarem exocóron de espessura próxima, 2,17 - 2,77 μm e 2,46 - 2,91 μm , respectivamente. Já quanto a comparação com *D. saccharalis*, onde o exocóron (4,40 - 5,73 μm) é muito mais espesso do que o de *A. kuehniella*, a semelhança no período de perfuração dos ovos se deu provavelmente pela maior resistência do segundo, que apresenta um exocóron muito mais elétron denso, composto por camadas nitidamente sobrepostas, que poderiam conferir ao mesmo maior compactação. O mesmo argumento pode ser utilizado para explicar o maior período utilizado por fêmeas de *T. galloi* para perfurar os ovos de *S. cerealella*, em relação aos de *C. cephalonica* e *D. saccharalis*, apesar desses ovos apresentarem córion de espessura semelhante. No entanto, o exocóron de *S. cerealella* (4,00 - 4,27 μm) é cerca de 1,5 vezes mais espesso do que o de *C. cephalonica* (2,46 - 2,91). Essa mesma comparação feita com *D. saccharalis* leva novamente à sugestão de que o córion

desse inseto apresenta baixa resistência, dada talvez pela sua composição protéica ou pelo padrão de deposição de proteínas que o compõem. A membrana vitelínica, que é a última barreira a ser rompida pela fêmea do parasitóide para realizar a postura, também pode exercer certa resistência à perfuração visto que em alguns ovos a sua espessura é considerável. Essa resistência poderia ser dada pela elasticidade da membrana ou pela própria ação de resistência mecânica conferida pelo espessamento e condensação que ocorre com o desenvolvimento embrionário, assim como foi demonstrado para *A. kuehniella* (Figura 14) e outras espécies de Lepidoptera (Fehrenbach *et al.*, 1987).

O volume do hospedeiro influencia diretamente o período empregado pelo parasitóide para definir o tamanho da progênie a ser destinada ao ovo parasitado, que pode ocorrer em uma única inserção do seu ovipositor. Normalmente, ovos de maior volume tendem a receber um maior número de ovos do parasitóide, o que leva as fêmeas a permanecerem por um período prolongado nesses hospedeiros (Salt, 1935, 1940; Schmidt & Smith, 1985a,b; Suzuki *et al.*, 1984). Esse comportamento foi observado para *T. galloi* e *T. pretiosum*, que apresentaram um período de oviposição crescente com o volume do hospedeiro. Ovos com maior volume, de *D. saccharalis* e de *H. virescens* (0,107 mm³), necessitaram de um período de oviposição mais prolongado do que um ovo menor, *S. cerealella* (0,021 mm³), para *T. galloi* e *T. pretiosum*, respectivamente (Tabelas 3 e 4).

4.6 Confecção do ovo artificial

4.6.1 Seleção do polímero plástico

T. galloi parasitou com sucesso ovos de polietileno e polipropileno, sendo extremamente reduzido o parasitismo de ovos confeccionados com poliestireno (Tabela 5). Ovos de polipropileno de espessura superior a 12-13 µm foram parasitados esporadicamente, resultando em um percentual de parasitismo inferior a 30%, com um número muito reduzido de ovos depositados. Apesar dos ovos de polipropileno de 12-13 µm de espessura apresentarem um percentual de parasitismo de 87%, o número de ovos de *T. galloi* por "ovo artificial foi inferior ao obtido em ovos de polietileno de espessura de 7-8 µm e 9-10 µm (Tabela 5).

Ovos artificiais confeccionados com polietileno de 7-8 μm e 9-10 μm de espessura foram plenamente aceitos pelas fêmeas de *T. galloi*, resultando em 100% de parasitismo, com os maiores números de ovos depositados por "ovo artificial". Apesar do parasitismo dos ovos de 8-9 μm de espessura ter sido elevado (87%), o número de ovos de *T. galloi* colocado por "ovo artificial" foi muito reduzido. As películas mais espessas, de 50 e 60 μm , raramente apresentaram "ovos artificiais" parasitados (Tabela 5).

T. pretiosum apresentou bons resultados apenas em ovos de polietileno. O parasitismo de ovos de polipropileno e poliestireno variou de 6 a 44%, com um número muito reduzido de ovos colocados por "ovo artificial". Novamente, os ovos de polietileno de 7-8 e 9-10 μm de espessura permitiram às fêmeas de *T. pretiosum* a deposição do maior número de ovos/"ovo artificial". A película de espessura intermediária, 8-9 μm , proporcionou um bom parasitismo, mas com apenas 21,25 ovos/"ovo artificial".

O maior parasitismo de ovos confeccionados com polietileno por *T. galloi* e *T. pretiosum* assemelha-se aos resultados obtidos para várias espécies de parasitóides, onde a oviposição foi obtida preferencialmente em substratos artificiais produzidos com esse plástico (Li, 1989; Battisti *et al.*, 1990; Masutti *et al.*, 1991; Grenier *et al.*, 1993). Li (1989) ainda demonstrou que a preferência pela espessura do plástico pode ser variável com o tamanho do ovipositor de *Trichogramma*.

O parasitismo de ovos artificiais, obtido para *T. galloi* e *T. pretiosum*, demonstrou que os estímulos físicos presentes (tamanho, formato e textura) foram suficientes para desencadear no parasitóide o processo de avaliação e aceitação do hospedeiro, visto que não foi utilizado qualquer tipo de estimulante químico de superfície para a indução da oviposição desses parasitóides. Análises da superfície dos ovos artificiais indicaram que o tratamento térmico utilizado na confecção dos ovos foi suficiente para provocar alterações na textura dos mesmos, proporcionando estímulos suficientes para as fêmeas dos parasitóides (Figura 29). A textura foi variável para as películas estudadas, podendo explicar a menor aceitação de ovos de polietileno de 8-9 μm de espessura por *T. galloi*. Esses ovos apresentaram textura distinta, contendo fissuras muito grandes, quando comparada àquela apresentada por ovos de polietileno de 7-8 e 9-10 μm de espessura (Figura 29) e pelo córion do hospedeiro natural, *D.*

Tabela 5. Porcentagem (%) de parasitismo e número de ovos de *T. galloi* e *T. pretiosum* colocados por "ovo artificial", confeccionado com diversas películas plásticas. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas.

Plástico	<i>T. galloi</i>		<i>T. pretiosum</i>	
	Parasitismo (%)	Nº de ovos/ovo ($x \pm se$) ¹	Parasitismo (%)	Nº de ovos/ovo ($x \pm se$) ¹
Polietileno				
7-8 μm	100	84,50 \pm 3,97a	100	79,81 \pm 7,03a
8-9 μm	87	8,87 \pm 1,64 c	100	21,25 \pm 3,19 b
9-10 μm	100	94,19 \pm 2,90a	100	76,00 \pm 3,24a
50 μm	19	0,19 \pm 0,10 d	19	0,19 \pm 0,10 cd
60 μm	6	0,06 \pm 0,06 d	6	0,06 \pm 0,04 d
Poliestireno				
12-15 μm	12	0,31 \pm 0,25 d	19	0,25 \pm 0,14 cd
Polipropileno				
12-13 μm	87	29,87 \pm 7,51b	44	4,31 \pm 1,84 c
20 μm	18	0,37 \pm 0,18 d	25	0,36 \pm 0,18 cd
30 μm	25	0,37 \pm 0,15 d	31	0,37 \pm 0,13 cd
40 μm	6	0,12 \pm 0,12 d	6	0,12 \pm 0,12 cd

1. Médias seguidas da mesma letra dentro de uma coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). (*T. galloi*: $F = 164,37$; g.l. = 9, 159; $P < 0,05$); (*T. pretiosum*: $F = 247,28$; g.l. = 9, 159; $P < 0,05$).

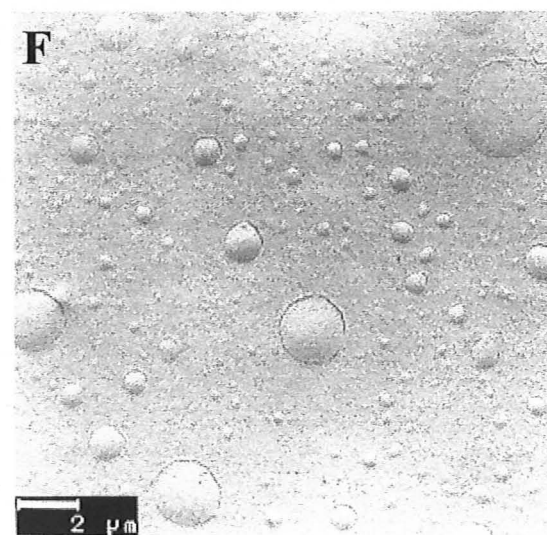
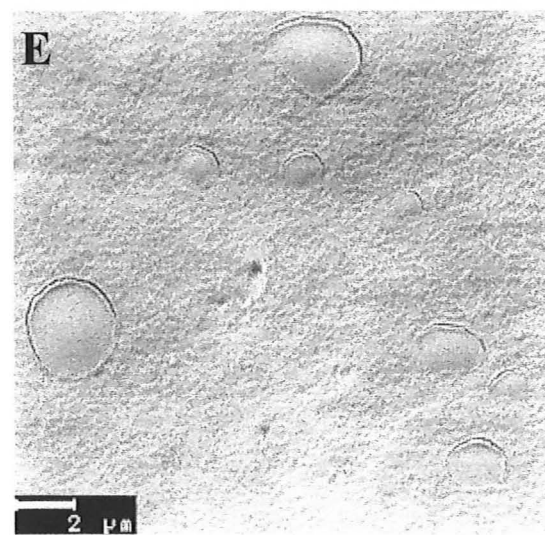
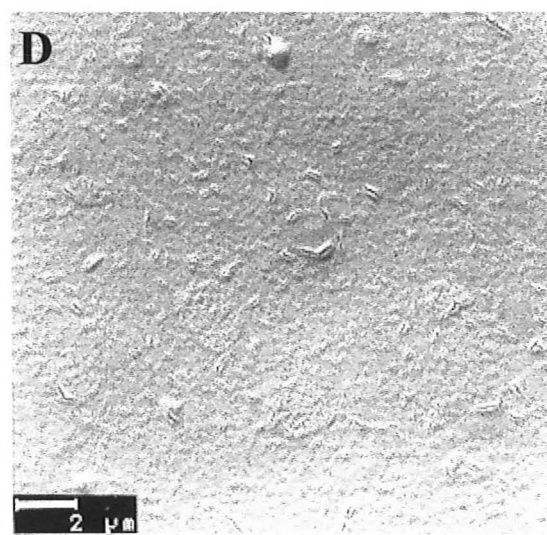
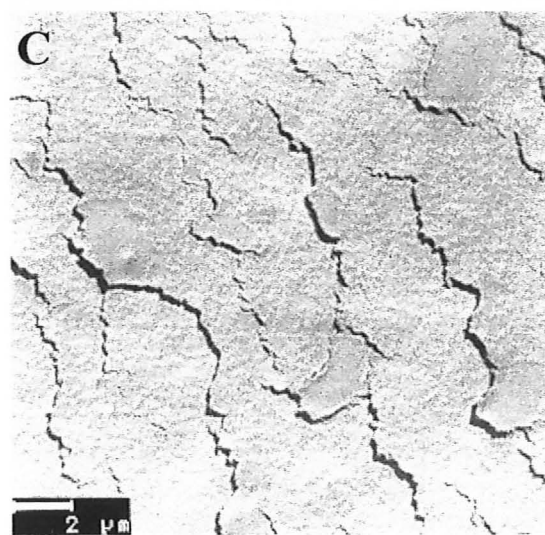
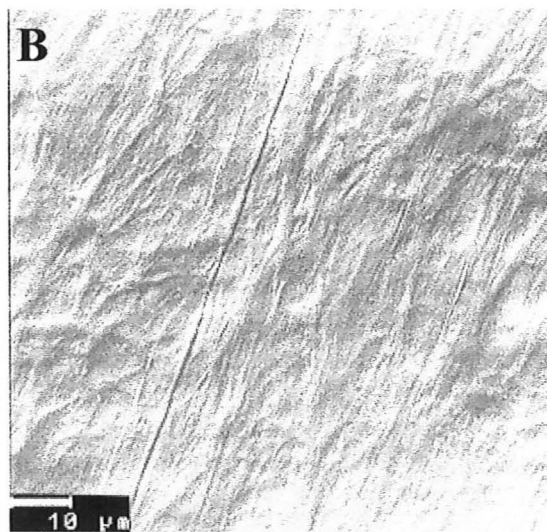
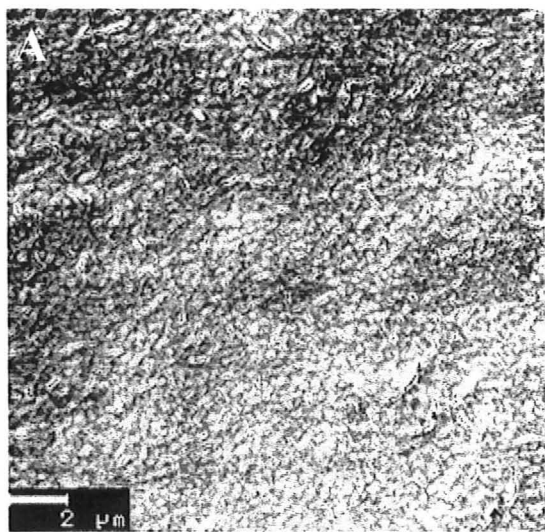
saccharalis (ver item 4.4). A maior sensibilidade desse plástico às alterações encontradas na superfície desse filme plástico, podem ser explicadas por ser essa membrana um filme de baixa densidade, mais sensível à ação térmica do que as demais membranas de alta densidade. De um modo geral, a textura das membranas dos ovos artificiais mais aceitas por *T. galloi* e *T. pretiosum* assemelham-se a de alguns ovos de hospedeiros naturais e alternativos (Figuras 11D, 15D, 17F, 21F e 23F).

Apesar do comportamento de localização e aceitação do hospedeiro por *Trichogramma* ser influenciado por uma série de fatores químicos (Noldus, 1989; Nordlund, 1994), alguns autores já haviam relatado o comportamento de parasitismo de *Trichogramma* em objetos sem qualquer composto orgânico de superfície que induzisse a oviposição, como em esferas de vidro, glóbulos de parafina ou gotas de mercúrio (Salt, 1935; Rajendram, 1978ab; Pak, 1988). O efeito da textura no comportamento de aceitação do hospedeiro foi anteriormente relatado por Pak (1988), sendo que Grenier *et al.* (1993) também verificaram que as alterações provocadas na textura dos ovos artificiais pela utilização de solventes orgânicos induziam a oviposição de *T. brassicae* em ovos artificiais. Xie *et al.* (1997) indicaram que a maior oviposição de fêmeas de *Trichogramma* spp. em ovos plásticos artificiais, tratados superficialmente com determinado tipo de cola (Elmer's school glue^R e Elmer's glue all^R), pode ter sido ocasionada devido à textura rugosa conferida à superfície dos ovos após o tratamento dos mesmos com a cola. Esse fato foi sugerido pela observação do comportamento das fêmeas de *Trichogramma*, que se detinham para a avaliação dos ovos apenas quando em contato direto com essa superfície.

4.6.2 Determinação da proporção ideal entre o número de fêmeas do parasitóide por "ovo artificial"

T. galloi parasitou 100% dos "ovos artificiais" quando utilizado em proporções superiores a uma fêmea para cada "ovo artificial". O número de ovos colocados por "ovo artificial" foi crescente, à partir de um determinado número de fêmeas do parasitóide, sendo os

Figura 29. Estrutura superficial das membranas plásticas após a utilização do processo térmico para a confecção dos ovos artificiais. A. polietileno 7-8 μm , B. polietileno 9-10 μm , C. polietileno 8-9 μm , D. polipropileno 12-13 μm , E. polietileno 20 μm ; F. poliestireno 12-15 μm .



valores encontrados quando da utilização de 4 a 6 fêmeas por "ovo artificial" semelhantes (Tabela 6).

Os resultados apresentados para *T. pretiosum* não foram proporcionais ao aumento da pressão de parasitismo (número de fêmeas/"ovo artificial"). O parasitismo dos ovos artificiais foi total, mas o número de ovos depositados por "ovo artificial" foi bastante reduzido (Tabela 6).

Tabela 6. Parasitismo (%) e número de ovos de *T. galloi* e *T. pretiosum* colocados por "ovo artificial", utilizando-se diferentes números de fêmeas do parasitóide: "ovo artificial". Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas.

Número de fêmeas/ovo	<i>T. galloi</i>		<i>T. pretiosum</i>	
	Parasitismo (%)	Número de ovos/ovo ($x \pm se$) ¹	Parasitismo (%)	Número de ovos/ovo ($x \pm se$) ¹
1:1	81	11,06 \pm 2,99b	81	14,37 \pm 4,71 b
2:1	100	16,50 \pm 1,76b	100	9,94 \pm 2,54 b
3:1	100	20,00 \pm 2,08b	100	14,62 \pm 1,99 b
4:1	100	37,00 \pm 3,62a	100	21,87 \pm 5,19 b
5:1	100	50,87 \pm 5,97a	94	13,69 \pm 2,96 b
6:1	100	48,37 \pm 2,34a	100	37,75 \pm 3,81a

1. Médias seguidas da mesma letra dentro de uma coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). (*T. galloi*: $F = 33,81$; g.l. = 5, 95; $P < 0,05$; *T. pretiosum*: $F = 7,71$; g.l. = 5, 95; $P < 0,05$).

A pressão de parasitismo demonstrou ser um fator importante na aceitação dos ovos artificiais, visto que o parasitismo foi inferior quando da utilização de 1 fêmea do parasitóide por ovo artificial, para ambas as espécies estudadas (Tabela 6). Em condições de maior

pressão, ocorreu, na grande maioria, o parasitismo de 100% dos ovos. O número de ovos do parasitóide depositado por ovo hospedeiro não foi proporcional ao aumento da densidade das fêmeas. Para *T. galloi*, ocorreu a divisão em dois grupos, havendo deposição de 11 - 20 ovos/ovo artificial, nas proporções de 1:1 a 3:1 (fêmeas:ovo), e de 37 - 50 ovos/ovo artificial, nas proporções de 4:1 a 6:1. O número de ovos depositados por *T. pretiosum* só apresentou diferença quando na maior densidade (6 fêmeas:ovo artificial). Esse fato pode ser decorrente de dois aspectos: 1) o número de fêmeas que aceitam ovos artificiais é dependente da densidade utilizada ou 2) acima de um certo valor de ovos do parasitóide por ovo artificial, as fêmeas do parasitóide reconheceriam aquele ovo como já contendo um número excessivo de ovos co-específicos, devido ao reconhecimento das substâncias químicas que são injetadas juntamente com os ovos, no momento da oviposição. Essas substâncias químicas promovem alterações no ambiente de desenvolvimento do parasitóide (ovo do hospedeiro) (Hawlitzky & Boulay, 1982), podendo também servir como indicadores químicos da presença de ovos do parasitóide para uma segunda fêmea. Essas substâncias seriam percebidas pelos receptores presentes no ovipositor de *Trichogramma*. No entanto, há a necessidade de estudos mais detalhados para se verificar o efeito da densidade das fêmeas no parasitismo de ovos artificiais.

4.6.3 Determinação do tamanho ideal do "ovo artificial"

O tamanho do ovo artificial influenciou o parasitismo de *T. galloi* e *T. pretiosum*. Fêmeas de *T. galloi* colocaram um menor número de ovos em ovos artificiais com diâmetro inferior a 3 mm. Por outro lado, *T. pretiosum* parasitou igualmente ovos com diâmetro variável de 1 a 4 mm. Ovos com 5 mm de diâmetro foram os que apresentaram o maior número de ovos do parasitóide (Tabela 7).

O intervalo de tamanho de ovos artificiais utilizados parece estar dentro dos limites aceitos por *T. galloi* e *T. pretiosum*, visto o parasitismo de 100% dos ovos. Mesmo os ovos artificiais de menor tamanho apresentam volume superior ao de muitos hospedeiros estudados. Novamente, as fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum* estabeleceram limites diferentes para a colocação de seus ovos. *T. galloi* depositou o mesmo número de ovos em ovos artificiais de 1 a 2 mm e de 3 a 5 mm. Já *T. pretiosum* colocou um maior número de ovos

Tabela 7. Parasitismo (%) de "ovos artificiais" de diversos tamanhos e número de ovos de *T. galloi* e *T. pretiosum* colocados por "ovo artificial". Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas.

Diâmetro do ovo (mm)	<i>T. galloi</i>		<i>T. pretiosum</i>	
	Parasitismo (%)	Número de ovos/ovo ($\bar{x} \pm se$) ¹	Parasitismo (%)	Número de ovos/ovo ($\bar{x} \pm se$) ¹
1	100	28,56 \pm 4,18 b	100	44,81 \pm 1,65 b
2	100	24,00 \pm 2,69 b	100	58,87 \pm 6,16 b
3	100	54,12 \pm 3,24a	100	55,69 \pm 2,58 b
4	100	42,00 \pm 3,28a	100	58,69 \pm 4,03 b
5	100	42,37 \pm 3,10a	100	90,81 \pm 3,59a

1. Médias seguidas pela mesma letra dentro de uma coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). (*T. galloi*: $F = 13,98$; g.l. = 4, 79; $P < 0,05$; *T. pretiosum*: $F = 19,34$; g.l. = 4, 79; $P < 0,05$).

apenas em ovos artificiais de 5 mm de diâmetro. De forma semelhante ao exposto no item 4.6.2, a presença de um certo número de ovos de *T. galloi* por ovo artificial aparentemente inibe a oviposição de mais ovos, mesmos em hospedeiros maiores. *T. pretiosum* mostrou sensibilidade distinta a esse estímulo, já que o número de ovos foi maior em ovos artificiais de 5 mm. Em condições onde o hospedeiro encontra-se em menor número, fêmeas de *Trichogramma*, na presença de ovos parasitados por ela mesma ou por outras fêmeas, buscam evitar o parasitismo desses ovos previamente parasitados. Porém, após certo período de ausência de hospedeiros para a colocação de ovos, as fêmeas desse parasitóide passam a depositá-los em hospedeiros já parasitados, o que na natureza caracterizaria o superparasitismo (Schmidt, 1994). Nessas condições, onde as fêmeas estariam novamente parasitando ovos reconhecidos como previamente parasitados, os ovos artificiais de menor

tamanho estariam apresentando um número de ovos do parasitóide superior ao que eles realmente apresentariam se o parasitismo fosse interrompido antes dessa fase. Certamente, há a necessidade de se ajustar o período de exposição dos ovos artificiais ao parasitismo, para que se obtenha uma relação ideal entre o número de ovos do parasitóide e o volume do ovo artificial.

4.7 Avaliação das dietas artificiais para a criação *in vitro* de *T. galloi* e *T. pretiosum*

Com exceção das dietas 3 (40% de suspensão de holotécidos pupais de *B. mori*, 20% de gema de ovo, 10% de soro fetal bovino, 20% de meio de Grace e 10% de hidrolisado de proteínas do milho) e 4 (20 de suspensão de holotécidos pupais de *B. mori*, 20% de gema de ovo, 20% de soro fetal bovino, 20% de meio de Grace e 20% de hidrolisado de proteínas do milho), as demais dietas forneceram estímulos suficientes às fêmeas de *T. galloi*, enquanto que, para *T. pretiosum*, todas elas permitiram a obtenção de grande quantidade de ovos dos parasitóides (Figura 30). Em alguns casos, o número de ovos do parasitóide excedeu o limite máximo de 87 ovos, valor teórico, calculado como sendo o número máximo ideal de indivíduos dos parasitóides que poderiam se desenvolver em 1 μ l de dieta, contido em cada ovo artificial.

No entanto, a resposta dos parasitóides ao estímulo de oviposição fornecido pelas dietas foi bastante diferente entre *T. galloi* e *T. pretiosum*. Em 15 das 36 dietas testadas para *T. galloi* (42%), o número de ovos depositados pelas fêmeas do parasitóide esteve próximo ou acima do valor máximo calculado como sendo o ideal, enquanto que para *T. pretiosum* apenas 11% das dietas avaliadas estimularam fortemente a oviposição por essa espécie (Figura 30). Em alguns casos, essa diferença pode ser explicada pelo componente derivado de inseto utilizado como constituinte principal do meio artificial. Isso fica claro quando se compara o parasitismo obtido nas dietas 8, 9, 33, 34, 35, 36 e 37 entre as duas espécies de parasitóide. Essas dietas apresentam suspensão de holotécidos pupais de *D. saccharalis* como a principal fonte de nutrientes do meio, inseto esse que, normalmente, não é parasitado por *T. pretiosum*. Entretanto, *T. pretiosum* e *T. galloi* apresentaram valores de parasitismo próximos quando

comparadas as dietas 12, 13 e 14, que também são formuladas com holotécidos de *D. saccharalis* como principal componente da dieta, obtidos, porém, de outra forma (Figura 30). Esse fato indica que o procedimento de preparo e de obtenção da suspensão de holotécidos pupais de *D. saccharalis* poderia estar eliminando ou reduzindo os níveis de algum componente químico, aumentando, assim, a aceitação dessas dietas pelas fêmeas de *T. pretiosum*.

A pressuposição de que o método de obtenção da suspensão de holotécidos pupais poderia estar eliminando fatores responsáveis pela indução da oviposição fica fortalecida pelos resultados obtidos para a dieta 2 (suspensão de holotécidos pupais de *B. mori*), quando comparados aos da dieta 15 (centrifugado de holotécidos pupais de *B. mori*). Os resultados obtidos com derivados de holotécidos pupais de *B. mori* ainda permitem verificar que a adição do meio de Grace à dieta com suspensão de holotécidos (dieta 1) forneceu maior estímulo à oviposição por *T. galloi* e *T. pretiosum* (Figura 30).

A utilização de holotécidos pupais de *B. mori*, extraídos de pupas com idade variando de 2 a 7 dias após a formação do casulo (dietas 27, 29, 30 e 31), reduziu o parasitismo por *T. pretiosum*, quando se compara o número de ovos do parasitóide/ovo artificial obtido em dietas compostas por holotécidos pupais de insetos com 10 dias de idade (dietas 23, 24, 25 e 26). Esse mesmo efeito foi observado para *T. galloi* entre as dietas 23 a 26 e 30 a 32 (Figura 30). As diferenças encontradas entre essas dietas, devido à utilização de insetos em diferentes estágios de desenvolvimento, podem estar relacionadas à composição química da pupa, que, com metamorfose, passa por inúmeras alterações químicas e fisiológicas durante a histólise e histogênese (Plantevin *et al.* 1984, 1987).

O meio de Grace e o aumento na concentração de soro fetal bovino estimularam *T. galloi* a depositar maior número de ovos em dietas contendo 50% de suspensão de holotécidos pupais de *B. mori* (dieta 7), o mesmo não ocorrendo com o meio composto por centrifugado de holotécidos (dieta 16). *T. pretiosum* apresentou comportamento diferente em relação a essas dietas. Mesmo com a utilização desses compostos em dietas com concentrações de suspensão ou centrifugado de holotécidos de *B. mori* inferiores a 60%, houve redução no parasitismo se comparado àquele da dieta 1. O estímulo fornecido por esses

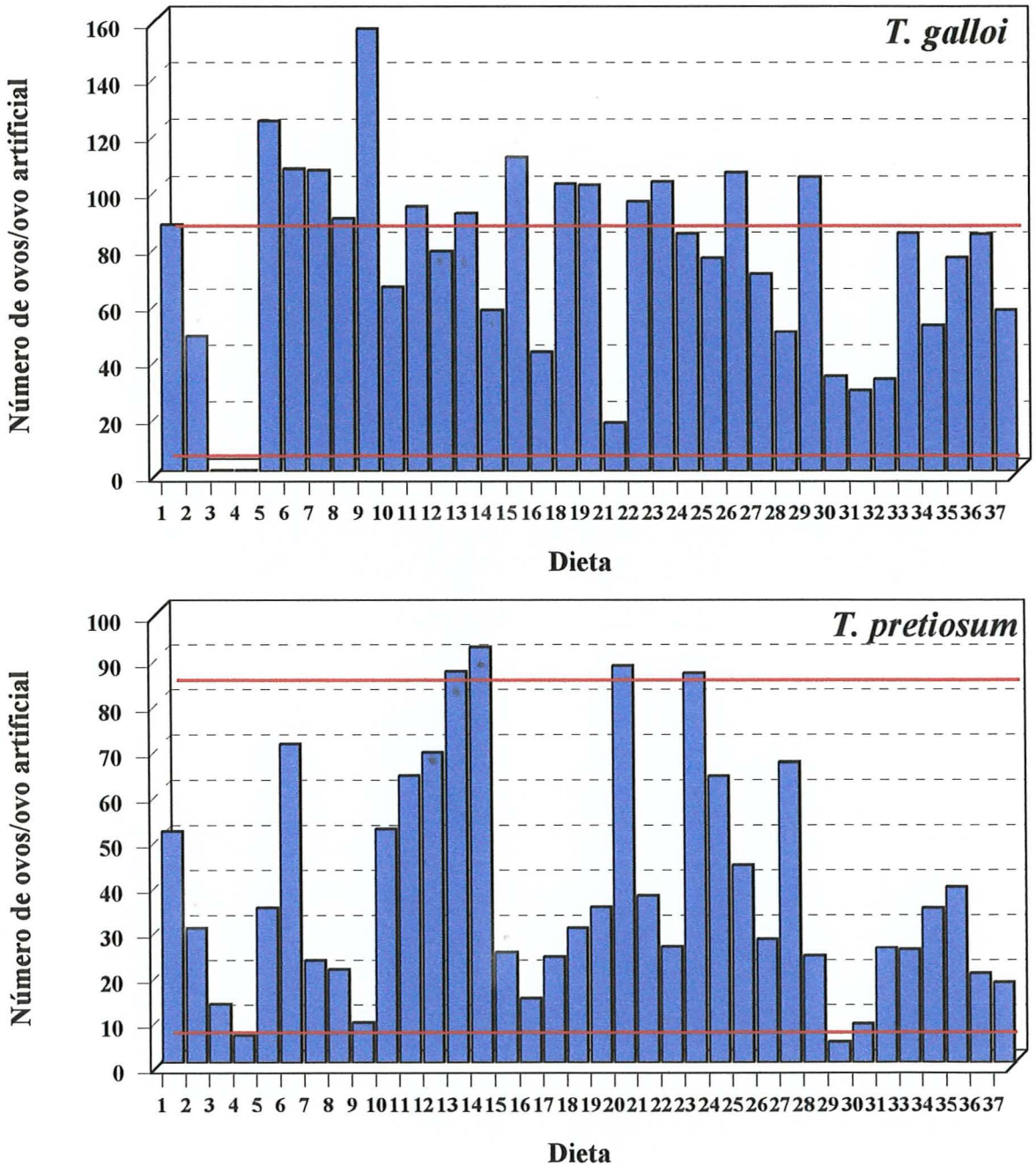


Figura 30. Número médio de ovos de *T. galloi* e *T. pretiosum* depositados por ovo artificial, contendo diversas dietas artificiais como substrato de criação. As linhas vermelhas indicam o intervalo ideal do número de larvas do parasitóide/ovo artificial (9 - 87) (Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas).

dois componentes pode ser devido ao aumento na concentração de nutrientes, especialmente os aminoácidos, que atuam como estimulantes de oviposição para parasitóides desse gênero (Qin & Wu, 1988). No entanto, o mesmo efeito não foi alcançado quando foram utilizadas outras fontes proteicas, tais como o hidrolisado de lactoalbumina (dietas 29,30, 34, 35 e 37) ou a solução de extrato de levedura (dietas 29, 30, 31, 33, 35 e 36) (Figura 30).

Dietas (5, 6, 18 e 19) contendo hemolinfa de lagartas de *H. zea* como um dos seus componentes possibilitaram altos valores de ovos do parasitóide depositados por ovo artificial. Esse componente, acrescido à dieta 6, contendo 40% de suspensão de holotecidos pupais de *B. mori*, permitiu a obtenção de um grande número de ovos de ambas as espécies de parasitóides estudadas (Figura 30). Esses resultados demonstram que a hemolinfa de *H. zea* apresenta componentes essenciais que induzem o parasitismo por *T. galloi* e *T. pretiosum*.

Para que o número inicial de ovos dos parasitóides, obtidos nas diferentes dietas, permaneça entre o intervalo mínimo e máximo estipulado como sendo o ideal, haverá a necessidade de se ajustar o período permitido ao parasitismo para aquelas dietas que excederam os limites calculados e que apresentarem resultados positivos, pois a composição das mesmas afetou a intensidade do parasitismo.

Entretanto, mesmo com a grande quantidade de ovos dos parasitóides obtidos em várias dietas, o desenvolvimento até a fase adulta ficou restrito a alguns meios artificiais (Figuras 31 e 32), sugerindo a inexistência de relação entre a adequação do substrato alimentar para a postura e o desenvolvimento do parasitóide. O desenvolvimento incompleto ou a baixa viabilidade alcançada em algumas dietas pode ter sido proporcionado pelo elevado número de ovos do parasitóide/ovo artificial que, em alguns casos, caracterizariam o superparasitismo (mais de 87 ovos/ovo artificial) (Figuras 30 e 32). Mesmo em casos onde o número de parasitóides por ovo artificial encontrava-se abaixo do limite superior do intervalo calculado, pode ter ocorrido redução na viabilidade do desenvolvimento imaturo ocasionada pelo contato entre as larvas, devido ao espaço disponível, desde que foi verificada, em observações do comportamento alimentar do parasitóide em dieta artificial, a ruptura de ovos pelas mandíbulas de larvas em desenvolvimento. Isso ocorre porque as larvas de *Trichogramma* movimentam-se ativamente no estágio inicial do seu desenvolvimento, durante

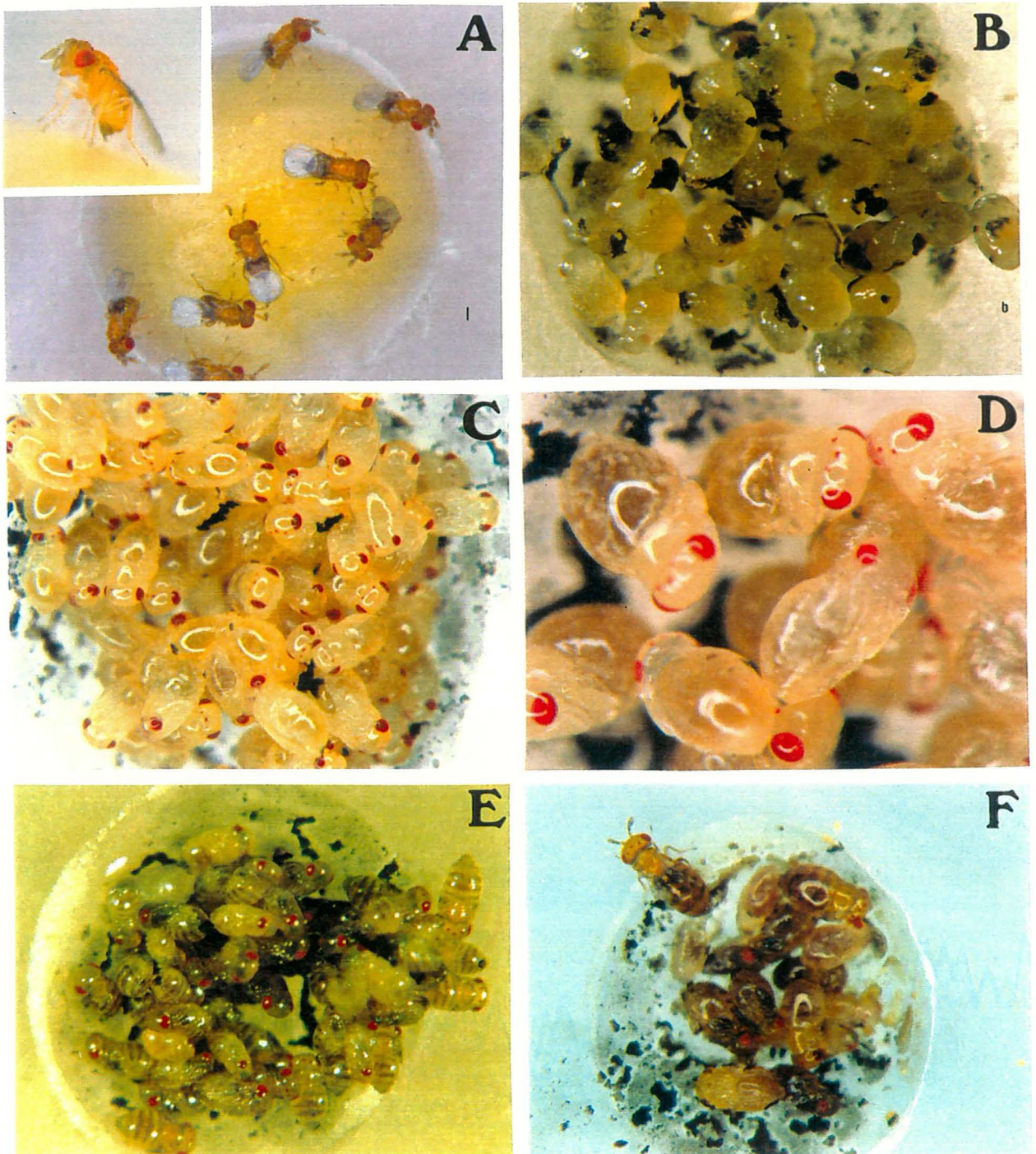


Figura 31. Desenvolvimento *n vitro* de ovo a adulto de *Trichogramma*. A. fêmeas de *Trichogramma* parasitando ovo artificial. Detalhe: fêmea em close-up; B. larvas no final do desenvolvimento (notar secreção de grânulos escuros); C. pupas no início do desenvolvimento (estágio de olhos vermelhos); D. detalhe das pupas; E. escurecimento do tegumento das pupas (próximo à emergência); F. adulto emergindo do ovo artificial.

a ingestão do alimento, facilitando o contato físico entre os indivíduos.

A dieta 6 (hemolinfa, suspensão de holotecidos pupais de *B. mori*, gema de ovo, soro fetal bovino e meio de Grace) forneceu condições para o desenvolvimento de *T. galloi* (56,29±2,81 larvas maduras/ovo artificial) e *T. pretiosum* (37,81±8,71 larvas maduras/ovo artificial) até o estágio de prepupa, não havendo continuidade no desenvolvimento desses parasitóides após esse estágio. No entanto, foi observada alteração no final do desenvolvimento desses parasitóides que, normalmente, ao atingirem o início da fase de prepupa, secretam, através das glândulas labiais, uma substância de coloração escura, que recobre a superfície interna da membrana vitelínica do ovo hospedeiro, conferindo a coloração preta característica de um ovo parasitado por esses inimigos naturais (Bowen & Stern, 1966; Saakyan-Baranova, 1990). Nos parasitóides que se desenvolveram nessa dieta, não foi observada a secreção dessa substância ao final do seu desenvolvimento larval. Os resultados obtidos com essa dieta permitem constatar que a hemolinfa de *H. zea* contém algum componente essencial ao desenvolvimento dos parasitóides, o qual está ausente, ou presente em quantidade muito reduzida, na suspensão de holotecidos pupais de *B. mori*, pois não foi obtido o desenvolvimento larval em dietas formuladas exclusivamente com esse componente derivado de inseto. A adição de pequena quantidade de hemolinfa (20%) estimulou o desenvolvimento larval, não permitindo, porém, a pupação. É citada na literatura a presença de componentes na hemolinfa e/ou nos extratos de ovos de hospedeiros, que são responsáveis pela pupação de *Trichogramma* em dieta artificial (Xie *et al.* 1986b; Irie *et al.* 1987). Irie *et al.* (1987) caracterizaram como sendo um carboidrato a fração da hemolinfa de *Manduca sexta*, utilizada em dietas artificiais para a criação de *T. pretiosum*, responsável pela indução da pupação desse parasitóide. O meio de Grace, apesar de ser composto por vários aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos e carboidratos, auxiliou no enriquecimento nutricional da dieta, mas não forneceu condições ideais à mesma. Sua composição, em carboidratos, conta com a presença de frutose, glicose e, principalmente, sacarose, que são os açúcares mais utilizados em dietas artificiais para parasitóides; porém, a trealose é o principal carboidrato presente na hemolinfa de insetos. A adição de carboidratos aos meios artificiais é bastante complicada, pois esses nutrientes exercem fortes alterações na pressão osmótica dos

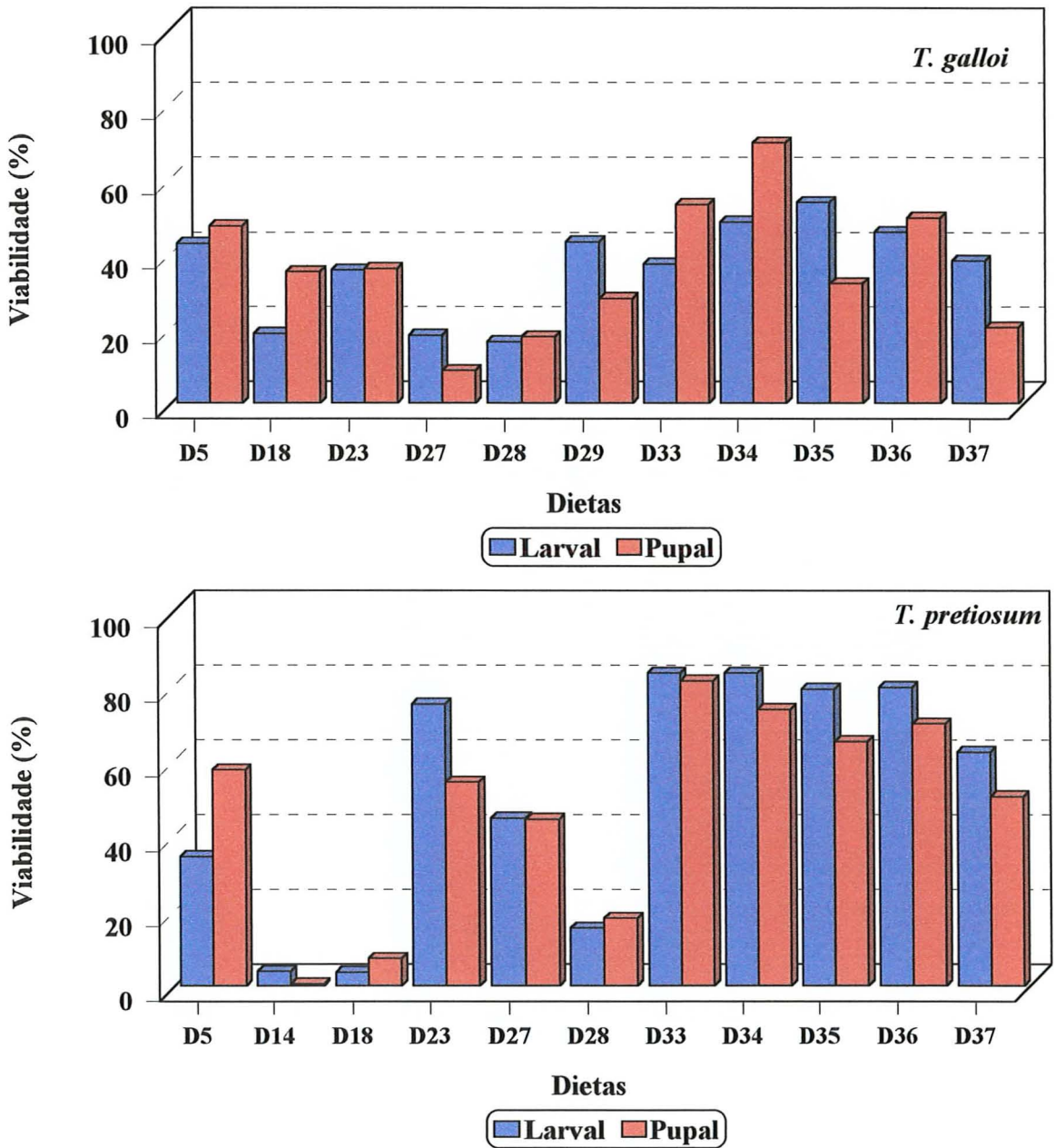


Figura 32. Viabilidade (%) das fases larval e pupal de *T. galloi* e *T. pretiosum*, em dietas artificiais em que houve o desenvolvimento de ovo a adulto. (Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas).

mesmos (Grenier, 1994, 1997).

Foi obtido o desenvolvimento completo de *T. galloi* e/ou *T. pretiosum* em 11 das 36 dietas artificiais testadas (Figura 32). Os melhores resultados, para ambos os parasitóides, foram alcançados nas dietas confeccionadas com holotecidos centrifugados de *D. saccharalis* (dietas 33 a 37), sendo o desenvolvimento de *T. pretiosum* nitidamente superior ao encontrado para *T. galloi*, apesar do parasitismo (número de ovos do parasitóide/ovo artificial) por *T. pretiosum* ter sido bem inferior ao de *T. galloi* (Figuras 30 e 32). *T. pretiosum* também apresentou maior viabilidade nas dietas 23 e 27 (dietas contendo centrifugado de holotecidos de *B. mori*) em relação a *T. galloi*, ocorrendo o inverso apenas na dieta 18 (hemolinfa de *H. zea*) (Figura 32). O melhor desempenho de *T. pretiosum* em relação a *T. galloi* quanto ao desenvolvimento em meios artificiais, pode ser explicado pela maior polifagia apresentada por *T. pretiosum*, que se trata de uma espécie cosmopolita, possuindo um grande número de hospedeiros naturais; por outro lado, *T. galloi* se destaca por ser uma espécie associada basicamente a espécies de brocas da cana, como *D. saccharalis* e *D. rufescens* (Cônsoi & Parra 1996b; Zucchi & Monteiro 1997).

O enriquecimento do meio artificial com fontes protéicas, principalmente hidrolisado de lactoalbumina e extrato de levedura, permitiram um melhor desenvolvimento dos parasitóides, nitidamente visualizado pela comparação dos valores obtidos nas dietas 28 e 33 a 37 (Figura 32).

Além do desenvolvimento de ovo a adulto de *T. galloi* e *T. pretiosum* nas dietas mencionadas anteriormente (Figura 32), esses parasitóides se desenvolveram até o final da fase larval sem, contudo, atingirem o estágio pupal, em alguns outros meios artificiais. As dietas 12 (centrifugado de holotecidos de *D. saccharalis*, gema de ovo e soro fetal bovino), 28 (centrifugado de holotecidos de *D. saccharalis*, gema de ovo, soro fetal bovino e meio de Grace) e 19 (hemolinfa, gema de ovo, soro fetal bovino e meio de Grace) proporcionaram o desenvolvimento até o último ínstar larval de *T. galloi*, havendo o desenvolvimento de $21,06 \pm 1,48$, $24,96 \pm 2,66$ e $18,58 \pm 3,39$ larvas maduras/ovo artificial, respectivamente. *T. pretiosum* apresentou desenvolvimento incompleto, atingindo o final da fase larval, na dieta 12, com o desenvolvimento de $41,17 \pm 10,72$ larvas maduras/ovo artificial.

É possível notar que ocorre alta mortalidade (aproximadamente 60%) de ovos e/ou larvas durante o início do desenvolvimento imaturo de *T. galloi* e *T. pretiosum*, pelo reduzido número de larvas que alcançam o último instar se comparado ao número inicial de ovos amostrados para cada dieta. A reduzida viabilidade durante essas fases poderia ser explicada pelas características físico-químicas da dieta, que não estariam apresentando pH e/ou pressão osmótica dentro dos limites tolerados por esses parasitóides, pela competição no início do desenvolvimento larval, onde o número de ovos obtidos por ovo artificial excedeu, em alguns casos, o limite superior estimado, ou pelo intenso contato entre as larvas, no início do desenvolvimento, como discutido anteriormente (Figuras 30 e 32). A contaminação por fungos, mesmo com a utilização de filtros, também atuou como causa de mortalidade. A contaminação do meio artificial pode ser realizada pelo próprio parasitóide, ao introduzir o ovipositor no interior do ovo para efetuar a oviposição. A eliminação dos ovos artificiais atacados por fungos não limitava a contaminação de novos ovos, pois a contaminação dos ovos vizinhos já havia ocorrido devido à emissão de hifas por esses microorganismos, que permitia sua rápida disseminação. As contaminações por fungos foram reduzidas, porém não eliminadas, mesmo após a inclusão de anfotericina B, agente de ação fungistática, possível de ser utilizado na criação *in vitro* de *Trichogramma* devido a sua baixa toxicidade ao parasitóide, quando utilizado nas dosagens efetivas (Grenier & Liu 1990), em associação ao antibiótico estreptomicina. Outro fator que também afetou a viabilidade do desenvolvimento dos parasitóides foi o ressecamento do meio artificial, que, em certos casos, não permitia a continuidade do crescimento do inseto.

As melhores viabilidades de larva a adulto obtidas para *T. galloi* e *T. pretiosum*, criados em dietas artificiais, foram superiores àquelas relatadas por Cònsoli & Parra (1996a, 1997ab), que criaram esse parasitóide sob condições mais controladas, e comparáveis aos resultados obtidos para diversas espécies de *Trichogramma* (Li *et al.* 1988; Qin & Wu, 1988; Li 1989). No entanto, a porcentagem de adultos deformados foi extremamente reduzida quando da utilização de ovos artificiais para a criação dos parasitóides, não ultrapassando 10-15% (item 4.8.3).

4.8 Qualidade dos insetos produzidos *in vitro* versus *in vivo*

4.8.1 Parâmetros comportamentais

T. galloi e *T. pretiosum*, criados em dietas artificiais, apresentaram a mesma seqüência de etapas do processo de parasitismo comparada àquela apresentada pelos insetos criados *in vivo*, descrita em detalhe no item 4.5 (Klomp *et al.*, 1980). No entanto, a porcentagem de fêmeas de *T. galloi* que rejeitaram ou permaneceram inativas foi maior para aquelas fêmeas provenientes de dieta artificial, especialmente aquelas criadas nas dietas 5, 18, 29 e 37 (Figura 33). Fêmeas de *T. galloi*, criadas na dieta 23 (centrifugado de holotecidos pupais de *B. mori*, gema de ovo e soro fetal bovino), não apresentaram atividade de parasitismo, pois foram incapazes de localizar o hospedeiro durante o período de observação. Os resultados obtidos para fêmeas de *T. pretiosum* foram próximos aos alcançados para os insetos criados *in vivo*, para a maioria das dietas onde se obteve a emergência de adultos, com exceção das dietas 23, 27 e 28 (Figura 33). Nesse experimento, também deve ser considerada como fêmeas inativas, ou seja, definidas inicialmente como sendo incapazes de localizar o hospedeiro dentro dos 15 minutos iniciais do período de observação, aquelas fêmeas que localizaram o hospedeiro, mas não deram continuidade ao processo de parasitismo sem, no entanto, recusá-lo. Normalmente, essas fêmeas, após a localização do hospedeiro, permaneciam paradas junto ao ovo hospedeiro por longos períodos que, por muitas vezes, excediam o tempo experimental proposto.

No entanto, a duração das várias etapas do processo de parasitismo (avaliação, perfuração e oviposição) dos seus respectivos hospedeiros naturais por *T. galloi* e *T. pretiosum*, *D. saccharalis* e *H. virescens*, foi variável conforme o substrato de criação utilizado pelo parasitóide (Figura 34; Tabelas 8 e 9). No geral, o período de localização dos ovos do hospedeiro foi maior para as fêmeas de *T. galloi* criadas em dietas artificiais em relação àquelas produzidas *in vivo*, havendo diferença mesmo entre as dietas artificiais. O maior período gasto pelas fêmeas para localizar seu hospedeiro pode ser um indicador de que esses adultos não acumularam reservas energéticas suficientes durante o seu desenvolvimento imaturo, resultado da inadequação nutricional do meio (Figura 34). O período de localização do hospedeiro por *T. pretiosum* criado *in vitro* foi semelhante, ou até inferior, ao período

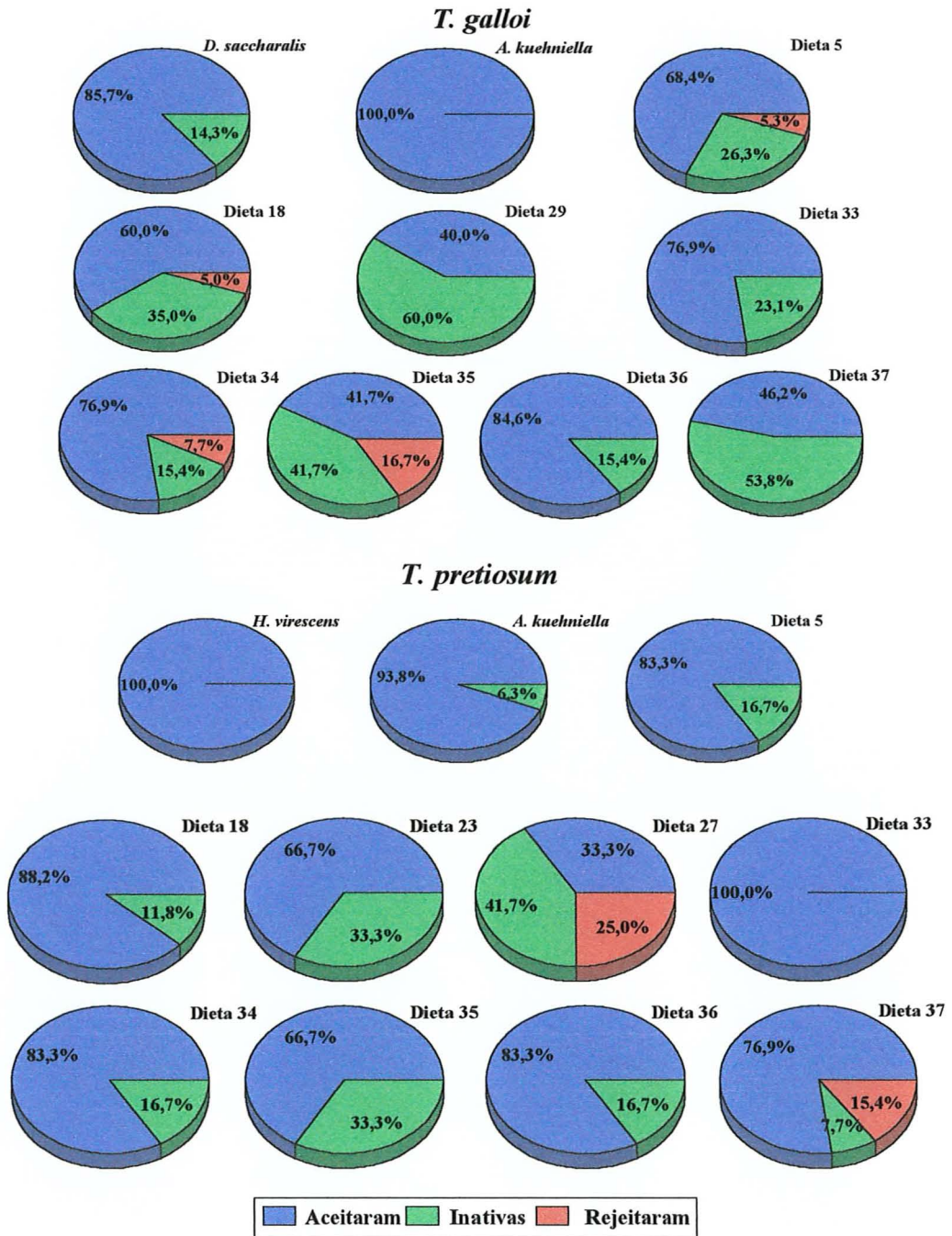


Figura 33. Porcentagem (%) de fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum*, criadas *in vivo* e *in vitro*, que aceitaram, rejeitaram ou permaneceram inativas, quando às mesmas foram oferecidos ovos dos respectivos hospedeiros naturais, *D. saccharalis* e *H. virescens*. Temperatura: $24 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade relativa: $60 \pm 10\%$.

utilizado pelas fêmeas criadas *in vivo*. Apenas os adultos criados na dieta 23 apresentaram período de localização superior aos demais insetos, sejam eles criados em outras dietas artificiais ou nos hospedeiros natural e alternativo (Figura 34).

As variações no comportamento de parasitismo podem ocorrer devido à influência de fatores bióticos e abióticos, bem como a fatores intrínsecos ao inimigo natural. A maioria desses relatos foi realizada verificando-se o efeito de estímulos ambientais (Pak., 1988; Alphen & Visser, 1990), do hospedeiro de criação (Marston & Ertle, 1973; Boldt, 1974; Stinner et al., 1974; Bigler et al., 1987; Hohmann et al., 1988) e da variabilidade genética entre diferentes populações de uma mesma espécie (Futuyma & Peterson, 1985; Wajnberg, 1994; Pizzol & Wajnberg, 1995). Porém, o papel dos processos fisiológicos intrínsecos do parasitóide são raramente analisados (Minkenberg et al., 1992).

Um dos fatores internos do parasitóide mais estudados, que poderia afetar o comportamento de parasitismo é o número de oócitos maduros que a fêmea apresenta ao emergir. Foram estabelecidas várias relações entre o número de oócitos e determinadas etapas do comportamento de parasitismo. Normalmente, quanto maior o número de oócitos maduros, maior será a atividade de procura das fêmeas, a aceitação do hospedeiro e o parasitismo, ocorrendo ainda, redução no tempo de procura e no período de exploração do hospedeiro (Pak et al., 1985; Collins & Dixon, 1986; Völkl & Mackauer, 1990; Rosenheim & Rosen, 1991). Assim, o comportamento de parasitismo está condicionado ao número de oócitos maduros apresentado pelas fêmeas do parasitóide que, de forma geral, resulta em dois comportamentos básicos: 1) quando o número de oócitos é elevado e, portanto, o risco da fêmea “perceber” que ela apresenta um número restrito de oócitos for muito baixo, a fêmea maximizará a taxa de encontro e a exploração do hospedeiro; 2) quando o número de oócitos é muito baixo, e portanto, ocorrer maior chance da fêmea não aproveitar uma oportunidade de parasitismo, o comportamento resultante será o de maximizar a aceitação de hospedeiros de qualidade para o parasitismo (Minkenberg et al., 1992).

Assim, as variações encontradas quanto à exploração do hospedeiro por *T. galloi* e *T. pretiosum*, criados em diversas dietas artificiais e nos hospedeiros natural e alternativo, podem estar relacionadas com o número de oócitos maduros que as fêmeas desses

parasitóides apresentavam ao emergir, visto que essa característica é basicamente determinada pela qualidade nutricional do meio em que o inseto se desenvolveu (Godfray, 1994).

Apesar desse parâmetro não ter sido avaliado para as fêmeas utilizadas nos estudos de comportamento, poderia se fazer uma estimativa do número de oócitos que as fêmeas apresentavam utilizando-se os dados de parasitismo diário e da capacidade total de parasitismo observados para as fêmeas utilizadas para os estudos biológicos. No entanto, como *Trichogramma* apresenta tipo de produção de ovos intermediário entre o sinovigênico (fêmeas emergem com uma certa quantidade de oócitos maduros, produzindo número suplementar através da aquisição de fonte nutricional adequada, obtida pela alimentação no próprio hospedeiro) e o pró-ovigênico (fêmeas que emergem com todos os oócitos maduros que serão utilizados durante o seu período reprodutivo) (Volkoff & Daumal, 1994), não foi possível estimar o número de oócitos utilizando-se os dados anteriormente descritos por 2 motivos: 1) as observações de comportamento foram realizadas durante 30 minutos e as observações do parasitismo diário eram realizadas a intervalos de 24 horas. Como não se conhece a velocidade com que a fêmea pode converter o alimento ingerido em novos oócitos, o número de oócitos estimados utilizando os valores de parasitismo observados após 24 h poderia estar sendo superestimado, já que nesse período a fêmea poderia ter produzido e utilizado novos oócitos; 2) como a produção de ovos é intermediária, ou seja, a fêmea ainda produzirá novos oócitos ao longo de sua vida, a fecundidade final da fêmea será muito superior àquela no momento da emergência.

Os períodos de avaliação, perfuração e oviposição de fêmeas de *T. galloi* criadas em dietas artificiais foram bastante variáveis, mas sempre apresentaram semelhança com os resultados apresentados pelos insetos emergidos do hospedeiro natural e/ou do alternativo. Apenas o período gasto para a perfuração do hospedeiro por fêmeas provenientes da dieta 37 não apresentou semelhança com os dados obtidos pelos insetos criados *in vivo* (Tabela 8).

T. pretiosum apresentou resultados similares aos encontrados para *T. galloi*, sendo o período de perfuração do hospedeiro o parâmetro mais variável. Neste caso, houve nítido prolongamento deste período para adultos criados em dieta artificial, sendo que apenas as dietas 33 e 34 originaram adultos que perfuraram o córion do hospedeiro em período seme-

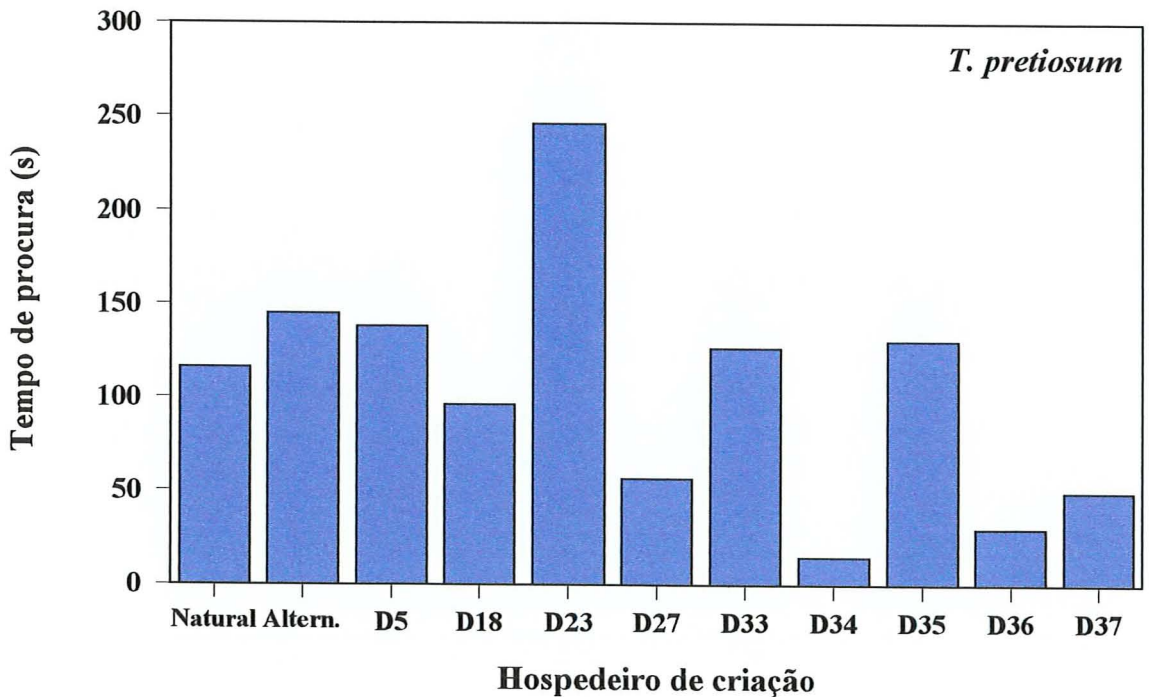
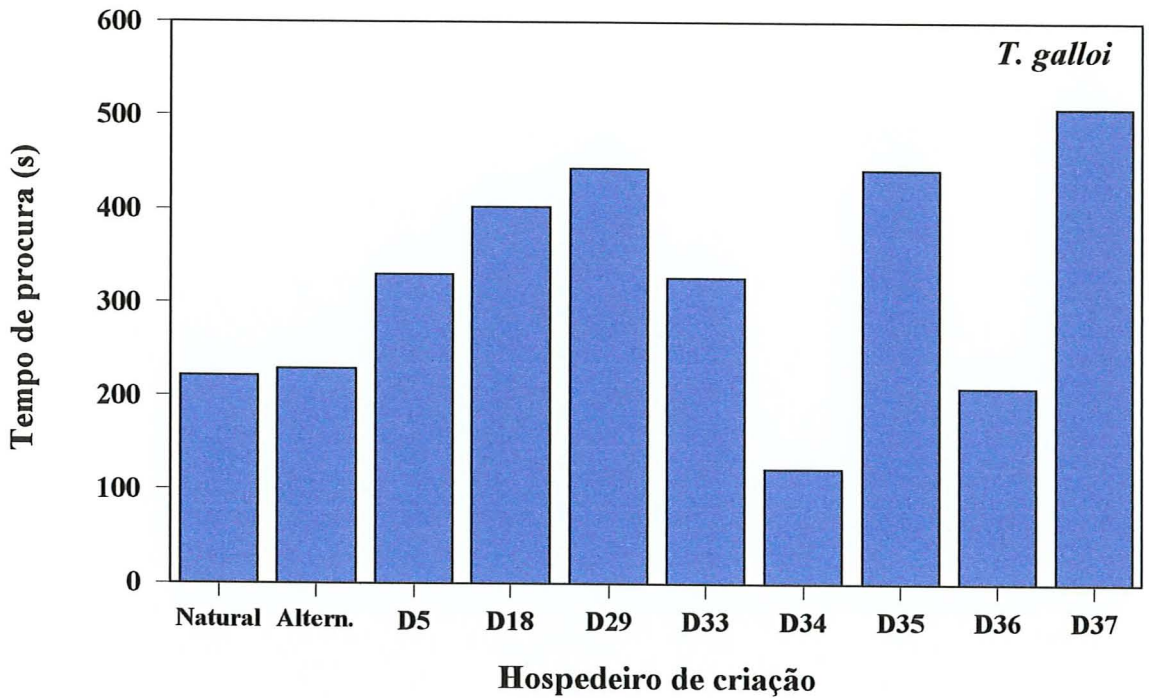


Figura 34. Tempo de procura (segundos) exigido por fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum*, criadas *in vivo* e *in vitro*, para a localização dos respectivos hospedeiros naturais, *D. saccharalis* e *H. virescens*. Temperatura: $24 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade relativa: $60 \pm 10\%$.

lhante ao dos insetos criados *in vivo* (Tabela 9).

No geral, o tempo de exploração do hospedeiro, do contato até o parasitismo, dos insetos criados em dieta artificial foi superior aos dos criados nos hospedeiros natural e alternativo (Tabelas 8 e 9). Entretanto, apesar das diferenças encontradas para cada etapa do processo de exploração do hospedeiro entre os adultos provenientes de diferentes substratos alimentares, o tempo empregado em cada uma dessas etapas (avaliação, perfuração e oviposição), em relação ao período total de exploração, se manteve praticamente constante em todos os tratamentos (Figura 35). Novamente, fica evidente o prolongamento do período de perfuração do hospedeiro por *T. pretiosum* criado em dieta artificial, quando comparado ao criado em substrato natural, pois o período de perfuração, em relação ao processo completo de parasitismo, foi proporcionalmente maior para os insetos criados em dieta artificial (Figura 35). Cabe ressaltar que o período de perfuração assumido nesse trabalho também envolve a fase de avaliação interna do hospedeiro, que é feita com o auxílio dos sensilos presentes no ovipositor das fêmeas de *Trichogramma* (Le Ralec & Wajnberg, 1990). Assim, as alterações encontradas na perfuração do hospedeiro, que envolve o rompimento do córion propriamente dito e a avaliação (pelo menos inicial) do interior do ovo hospedeiro, nos permite fazer três hipóteses: 1^a) incapacidade do adulto perfurar o córion do hospedeiro, que poderia ocorrer devido ao desenvolvimento anormal do seu ovipositor, sugerida pela observação direta da dificuldade que algumas fêmeas apresentaram para retirar o ovipositor da bainha e, mesmo após tê-lo apoiado sobre o córion, em prosseguir com a perfuração; 2^a) desenvolvimento de adultos de tamanho reduzido, que apresentariam, por consequência, maiores dificuldades em perfurarem o córion hospedeiro; 3^a) presença de alterações fisiológicas, que levariam o inseto a necessitar de um período maior para aceitar definitivamente aquele hospedeiro e, assim, iniciar a oviposição. Das três hipóteses levantadas, apenas a primeira e a segunda foram verificadas, sendo que observações da estrutura externa do ovipositor das fêmeas de *Trichogramma*, em microscopia eletrônica de varredura, não indicaram qualquer anormalidade aparente. No entanto, não fica descartada a possibilidade de alterações morfológicas internas, ao nível da musculatura responsável pela protração e retração do ovipositor. O tamanho dos adultos não mostrou ser a causa provável para tais alterações,

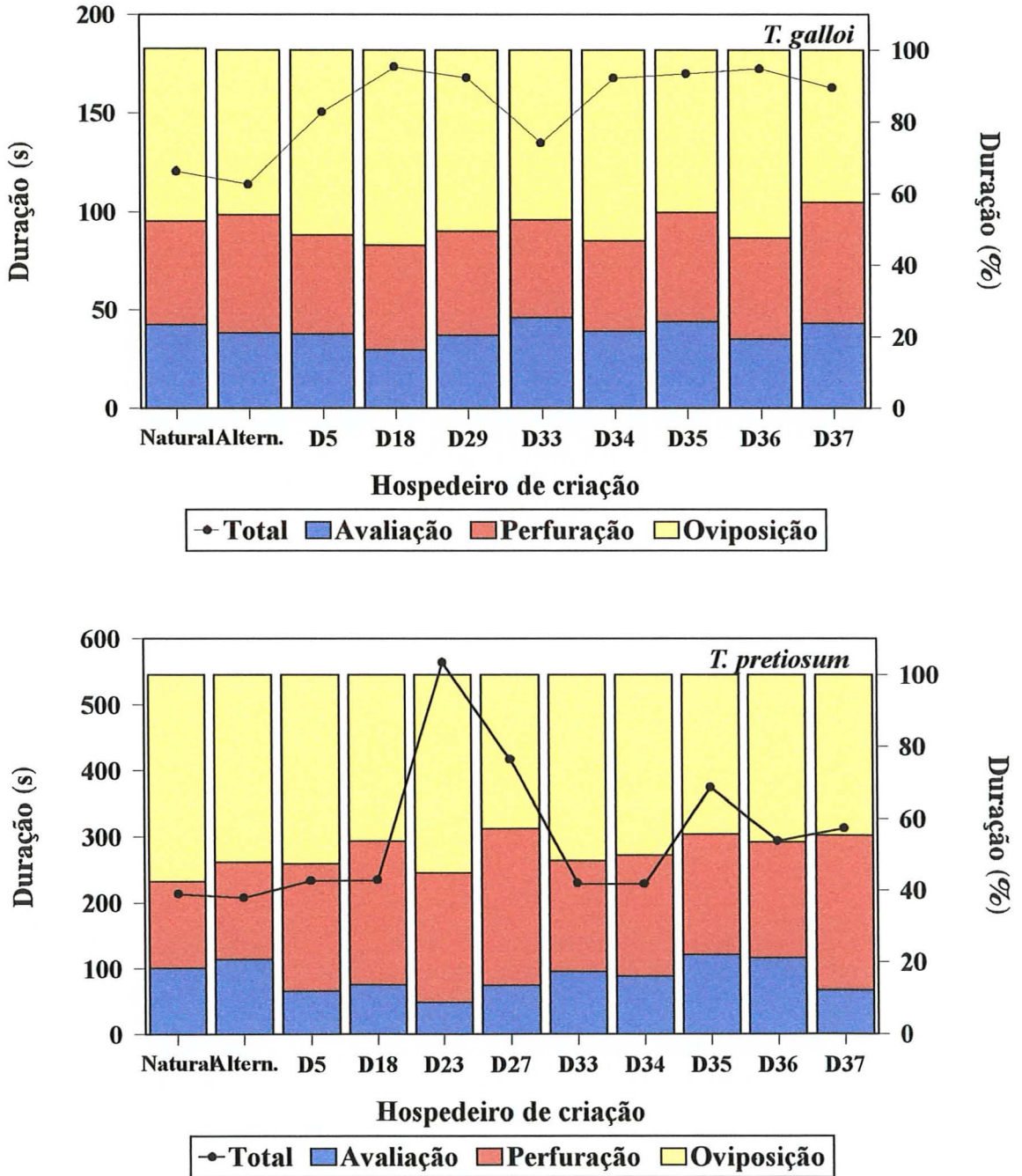


Figura 35. Tempo total (s) para o parasitismo de um hospedeiro (pontos) e a proporção do período empregado para as fases de avaliação, perfuração e oviposição (barras) por *T. galloi* e *T. pretiosum*, criados *in vivo* e *in vitro*, parasitando os seus respectivos hospedeiros naturais, *D. saccharalis* e *H. virescens*. Temperatura: $24 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade relativa: $60 \pm 10\%$.

visto que adultos criados *in vivo* e *in vitro* apresentaram tamanho semelhante (Figura 39).

Tabela 8 Duração (segundos) dos parâmetros de comportamento de avaliação, perfuração e oviposição, observados para *T. galloi* criado *in vivo* e *in vitro*, parasitando ovos de *D. saccharalis*. Temperatura: $24 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$.

Hosp. de criação	Duração (s) das etapas do comportamento de parasitismo		
	$(\bar{x} \pm \text{se})^1$		
	Avaliação	Perfuração	Oviposição
<i>D. saccharalis</i>	28,34 \pm 1,14 abc	34,08 \pm 1,22 c	58,08 \pm 3,10 ab
<i>A. kuehniella</i>	23,91 \pm 1,20 c	37,64 \pm 1,59 bc	52,32 \pm 3,10 b
Dieta 5	31,33 \pm 2,48 abc	41,54 \pm 2,33 abc	77,56 \pm 6,93 ab
Dieta 18	28,52 \pm 2,00 bc	50,69 \pm 3,21 ab	94,21 \pm 12,90 a
Dieta 29	34,29 \pm 4,14 ab	48,94 \pm 4,14 ab	84,59 \pm 10,56 a
Dieta 33	34,10 \pm 3,78 ab	36,87 \pm 2,94 bc	63,63 \pm 5,90 ab
Dieta 34	36,00 \pm 2,92 ab	42,67 \pm 6,54 abc	88,97 \pm 10,82 a
Dieta 35	41,13 \pm 4,37 a	52,00 \pm 7,20 ab	76,73 \pm 9,00 ab
Dieta 36	33,42 \pm 3,24 abc	48,77 \pm 5,06 ab	90,13 \pm 25,92 a
Dieta 37	38,55 \pm 3,74 ab	55,39 \pm 6,68 a	68,83 \pm 5,56 ab

1. Médias seguidas da mesma letra dentro de uma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). (Avaliação: $F = 4,39$; g.l. = 9, 287; $P < 0,05$; Perfuração: $F = 4,37$; g.l. = 9, 258; $P < 0,05$; Oviposição: $F = 3,14$; g.l. = 9, 287; $P < 0,05$).

Com exceção do maior período de perfuração em dietas artificiais encontrado para *T. pretiosum*, o prolongamento do período total de exploração do hospedeiro parece estar relacionado à qualidade do substrato alimentar (natural ou artificial) utilizado pelo parasitóide durante o seu desenvolvimento imaturo, já que esse alimento lhe fornecerá as reservas energéticas a serem gastas durante o processo de parasitismo. Essa pressuposição surge devido aos resultados encontrados para *T. galloi* e *T. pretiosum*, onde o tempo empregado por uma fêmea para completar o processo de parasitismo de um ovo hospedeiro foi superior

para os insetos obtidos de dieta com qualidade nutricional inferior, já que esta dieta resultou em menor desenvolvimento do parasitóide (Figura 35).

Tabela 9 Duração (segundos) dos parâmetros de comportamento de avaliação, perfuração e oviposição, observados para *T. pretiosum* criado *in vivo* e *in vitro*, parasitando ovos de *H. virescens*. Temperatura: $24 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$.

Hosp. de criação	Duração (s) das etapas do comportamento de parasitismo		
	(x± se) ¹		
	Avaliação	Perfuração	Oviposição
<i>H. virescens</i>	39,42±2,53 b	51,45±2,57 f	122,55±7,74 b
<i>A. kuehniella</i>	43,41±3,53 b	56,21±2,29 ef	107,88±5,36 b
Dieta 5	28,02±1,19 b	82,95±7,59 cde	122,33±7,10 b
Dieta 18	32,05±2,14 b	93,69±6,16 bcd	108,53±7,12 b
Dieta 23	50,33±9,49 ab	203,55±38,86 a	310,11±113,26 a
Dieta 27	56,75±23,86 ab	182,25±51,62 a	177,75±23,03 ab
Dieta 33	39,88±2,96 b	70,57±6,04 def	118,74±7,94 b
Dieta 34	36,87±3,34 b	77,00±7,17 cdef	114,40±7,76 b
Dieta 35	82,77±17,82 a	125,85±16,41 abc	165,61±20,62 ab
Dieta 36	61,84±4,68 a	94,68±14,46 bcd	136,76±11,95 b
Dieta 37	38,09±2,35 b	134,91±21,59 ab	139,61±15,41 b

1. Médias seguidas da mesma letra dentro de uma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). (Avaliação: $F = 8,56$; g.l. = 10, 301; $P < 0,05$; Perfuração: $F = 13,31$; g.l. = 10, 301; $P < 0,05$; Oviposição: $F = 3,69$; g.l. = 10, 301; $P < 0,05$).

O maior período gasto para a exploração do hospedeiro por parasitóides criados em dietas artificiais resulta em insetos com baixa agressividade, se comparados aos insetos criados *in vivo*. Esse fato fica claro quando comparamos a porcentagem de ovos parasitados por *T. galloi* ao longo do período de observação. Adultos provenientes do hospedeiro alternativo apresentaram maior porcentagem de parasitismo ao longo dos três intervalos de observação,

resultando ainda em um maior valor final de parasitismo. Novamente, ficam evidentes as diferenças entre as dietas 5 e 18 para a criação de *T. galloi*. Para *T. pretiosum*, as diferenças são menos evidentes, mas o parasitismo acumulado nos intervalos de 11-20 e 21-30 minutos é maior para os parasitóides criados *in vivo* (Figura 36).

4.8.2 Parâmetros biológicos

A capacidade de parasitismo de *T. galloi* criado em dieta artificial foi reduzida quando comparada aos insetos emergidos do hospedeiro natural ou alternativo, com exceção daqueles criados nas dietas 33 e 36, que apresentaram capacidade de parasitismo semelhante aos insetos criados no hospedeiro alternativo e natural, respectivamente (Tabela 10). Além do parasitismo reduzido encontrado para fêmeas criadas em alguns meios artificiais, ocorreu um acentuado porcentual de fêmeas que não efetuaram o parasitismo, em comparação aos adultos criados no hospedeiro alternativo (Tabela 10). Poderia ser questionado se esse porcentual elevado não estaria ocorrendo pela utilização de ovos de *A. kuehniella* na avaliação da capacidade de parasitismo dessa espécie, já que o parasitóide apresenta certas dificuldades de utilização desse hospedeiro no seu processo normal de criação e multiplicação em laboratório (Parra, 1997). Porém, foram observados valores próximos de fêmeas que se mantiveram inativas durante os estudos comportamentais para parasitóides criados nessas mesmas dietas, estando, contudo, em contato com ovos do hospedeiro natural, *D. saccharalis*.

Argumentação contrária pode ser utilizada para explicar o reduzido porcentual (56%) de fêmeas de *T. galloi* que parasitaram ovos de *A. kuehniella*, quando criadas em seu hospedeiro natural, *D. saccharalis*, visto que, nos estudos de comportamento, o número de fêmeas inativas desse parasitóide, quando em contato com ovos do hospedeiro natural, foi muito reduzido (Tabela 10 e Figura 33).

Por outro lado, nenhuma dieta artificial permitiu o desenvolvimento de adultos de *T. pretiosum* com capacidade de parasitismo semelhante à dos adultos criados no hospedeiro natural, *H. virescens*. O mesmo ocorreu quando os insetos foram criados em ovos do hospedeiro alternativo (Tabela 11). Apesar da menor capacidade de parasitismo dos insetos criados em meio artificial em relação aos criados no hospedeiro natural, vários meios artificiais

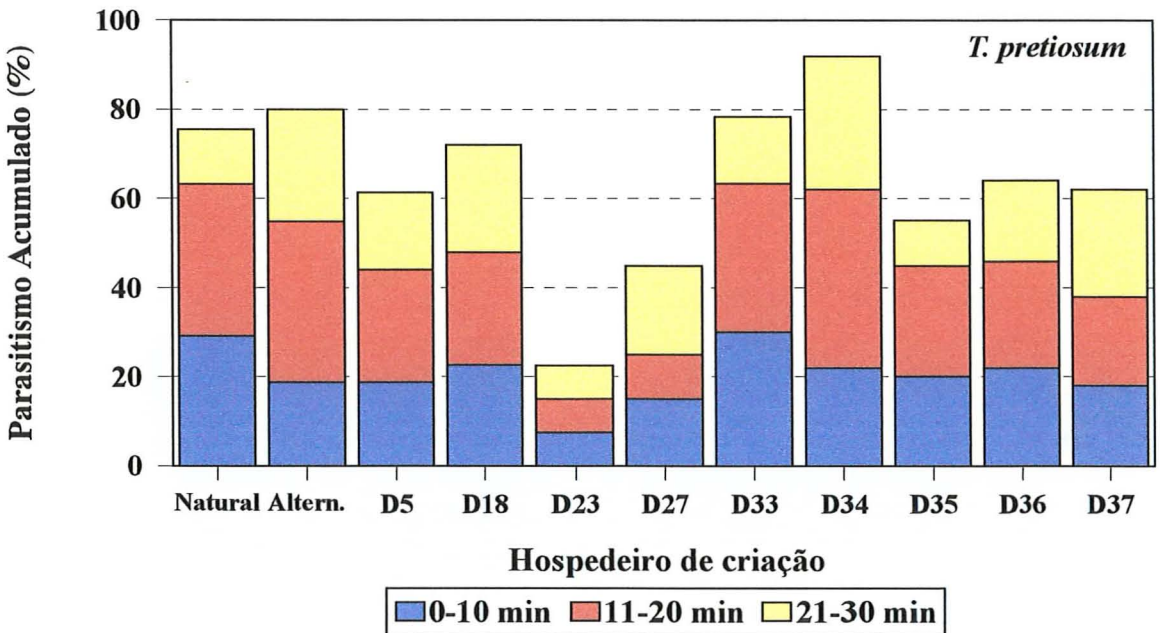
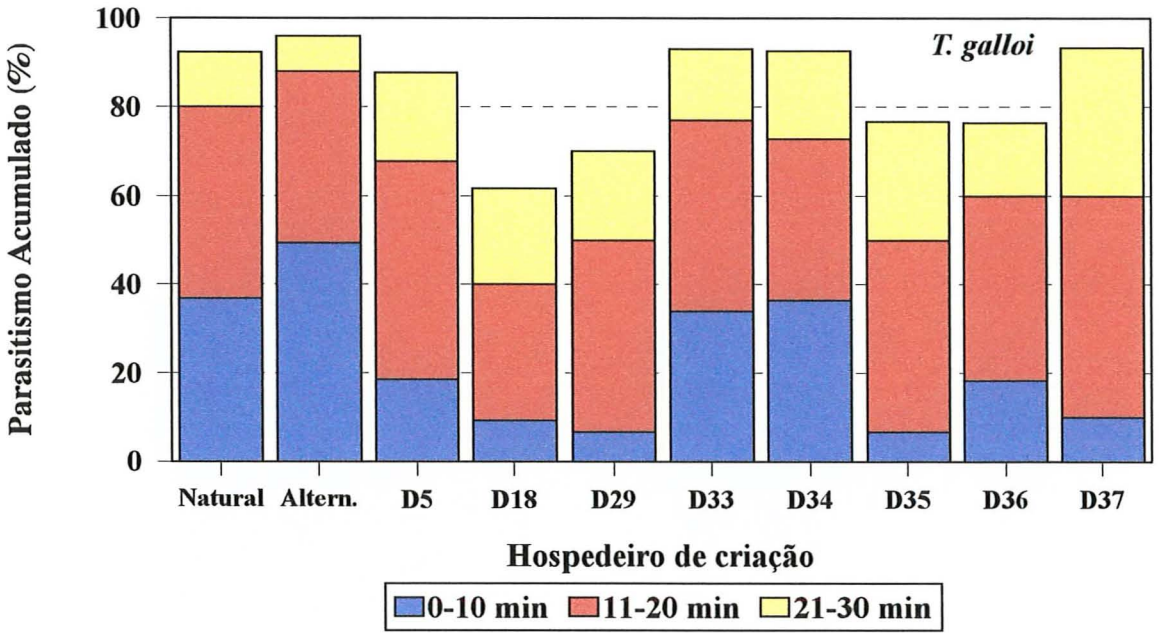


Figura 36. Parasitismo acumulado (%) de *T. galloi* e *T. pretiosum*, criados *in vivo* e *in vitro*, em três intervalos de tempo (agressividade). Temperatura: $24 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$.

(dietas 5, 18, 33, 34, 36 e 37) deram origem a adultos com capacidade de parasitismo similar àquela apresentada pelos insetos produzidos em ovos de *A. kuehniella* (Tabela 11). A porcentagem de fêmeas que parasitaram se manteve elevada, exceto para as dietas 14, 23 e 28 (Tabela 11).

Tabela 10. Parasitismo de ovos de *A. kuehniella* (número médio de ovos parasitados/ fêmea), porcentagem de fêmeas que parasitaram e longevidade de *T. galloi* criado *in vivo* e *in vitro*. (Temperatura: 25±1°C; UR: 60±10%; fotofase: 14 horas).

Hospedeiro de criação	Parasitismo ($\bar{x} \pm se$) ¹	Fêmeas que parasitaram (%)	Longevidade ($\bar{x} \pm se$) ¹
<i>D. saccharalis</i>	59,14±3,65 a	56,00	3,64±0,37 ab
<i>A. kuehniella</i>	46,96±3,30 ab	100,00	4,60±0,34 a
D5	34,67±4,22 cd	60,00	2,87±0,21 c
D18	22,58±2,48 d	76,00	2,53±0,21 c
D23	15,33±7,20 d	24,00	2,67±0,61 c
D28	21,44±2,47 d	64,00	1,81±0,24 c
D29	18,07±2,79 d	64,00	2,12±0,26 c
D33	41,37±3,28 bc	88,00	3,64±0,30 ab
D34	31,96±2,68 c	100,00	3,60±0,28 ab
D35	26,20±2,30 d	84,00	2,57±0,19 c
D36	43,96±3,49 ab	92,00	4,30±0,28 ab
D37	31,37±4,22 cd	76,00	2,89±0,17 bc

1. Médias seguidas da mesma letra dentro de uma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) (Parasitismo: $F = 13,28$; $gl = 11, 206$; $P < 0,05$; Longevidade: $F = 9,69$; $gl = 11, 220$; $P < 0,05$).

Os insetos criados em dieta artificial e nos seus respectivos hospedeiros naturais e alternativo apresentaram uma dinâmica de maturação de oócitos e parasitismo bastante distintos. Esse fato pode ser visualizado através do número de ovos parasitados diariamente

Tabela 11. Parasitismo de ovos de *A. kuehniella* (número médio de ovos parasitados/ fêmea), porcentagem de fêmeas que parasitaram e longevidade de *T. pretiosum* criado *in vivo* e *in vitro*. (Temperatura: 25±1°C; UR: 60±10%; fotofase: 14 horas).

Hospedeiro de criação	Parasitismo (x± se) ¹	Fêmeas que parasitaram (%)	Longevidade (x± se) ²
<i>H. virescens</i>	163,80±9,27 a	100,00	14,64±0,64 a
<i>A. kuehniella</i>	83,04±10,32 b	96,00	13,37±1,02 ab
D5	91,76±11,38 b	100,00	9,72±0,99 bcde
D14	46,00±12,85 cd	32,00	8,75±1,48 bcdef
D18	75,37±11,11 bc	88,00	9,75±1,09 bcde
D23	22,78±9,46 d	36,00	6,55±1,25 cdef
D27	34,36±3,78 d	100,00	3,52±0,32 f
D28	27,50±8,63 d	40,00	4,70±0,82 ef
D33	66,57±14,64 bc	56,00	11,00±1,16 abcd
D34	81,24±12,36 b	96,00	12,92±1,04 ab
D35	40,31±11,00 d	80,00	6,26±1,19 def
D36	95,37±12,62 b	92,00	11,75±0,74 abc
D37	103,09±10,73 b	88,00	10,59±0,54 abcd

Médias seguidas da mesma letra dentro de uma coluna não diferem significativamente entre si pelo 1) teste de Dunn ($P < 0,05$) (Parasitismo: $F = 11,76$; gl = 12, 236; $P < 0,05$) e 2) pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) (Longevidade: $F = 13,48$; gl = 12, 253; $P < 0,05$).

(Figura 37). Fêmeas emergidas da criação em dieta artificial nasceram com um menor número de oócitos maduros, pois a seu parasitismo no primeiro dia foi bastante distinto daquele encontrado para os insetos criados nos hospedeiros naturais e alternativo, especialmente para *T. pretiosum* (Figura 37). No entanto, adultos de várias dietas, em contato com alimento fornecido na forma de mel puro, e através da sua nutrição com líquidos extravasados do interior do hospedeiro pelo orifício de oviposição, desenvolveram um número tal de oócitos

durante o seu período reprodutivo, que conferiram às fêmeas de algumas dessas dietas parasitismo comparável ao encontrado em insetos criados no hospedeiro natural ou alternativo (Figura 37).

Apesar da capacidade de parasitismo e do número total de ovos parasitados, principalmente no primeiro dia, ter sido bastante diferente para a maioria dos insetos criados *in vitro* em comparação àqueles produzidos *in vivo*, o parasitismo acumulado, ou seja, a porcentagem de ovos parasitados diariamente em relação à capacidade total de parasitismo daquela fêmea, foi bastante similar para a maioria dos insetos criados em dietas artificiais e aqueles criados *in vivo* (Figura 38). Fêmeas de *T. galloi* tendem a parasitar 80% do total de ovos parasitados já no segundo dia do seu período reprodutivo, sendo que *T. pretiosum*, seja ele produzido *in vitro* ou *in vivo*, necessitou de um período um pouco mais prolongado, atingindo esse valor entre o 8º e 10º dias (Figura 38).

O parasitismo encontrado para *T. galloi* e *T. pretiosum*, criados em dietas artificiais, é comparável aos relatados para outras linhagens dessas espécies, quando criados em ovos de hospedeiros naturais e alternativos, parasitando ovos desses mesmos hospedeiros (Sá & Parra, 1994; Cònsoli & Parra, 1995; Gomes, 1997).

A longevidade das fêmeas criadas em dieta artificial foi bastante variável quando comparada àquela encontrada para os insetos criados *in vivo* (Tabelas 10 e 11). Para *T. galloi*, as dietas 5, 18, 23, 28, 29 e 35 apresentaram fêmeas com longevidade inferior àquela encontrada nas demais dietas artificiais ou no hospedeiro natural ou alternativo (Tabela 10). *T. pretiosum* criado nas dietas 33, 34, 36 e 37 apresentou longevidade semelhante à dos insetos criados no hospedeiro natural, sendo que, adultos emergidos das dietas 5, 14 e 18 foram tão longevos quanto aqueles do hospedeiro alternativo (Tabela 11). Os valores de longevidade observados para *T. galloi* e *T. pretiosum* são comparáveis aos relatados por Cònsoli & Parra (1996b), que criaram esses parasitóides *in vivo* e *in vitro*, submetendo-os ao parasitismo de ovos de *A. kuehniella*.

Fêmeas criadas em dieta artificial deram origem a descendentes com razão sexual inversa àquela encontrada nos insetos criados *in vivo*. Por se tratarem de linhagens que se reproduziam por partenogênese telítica, a razão sexual esperada seria igual a um, ou seja, a

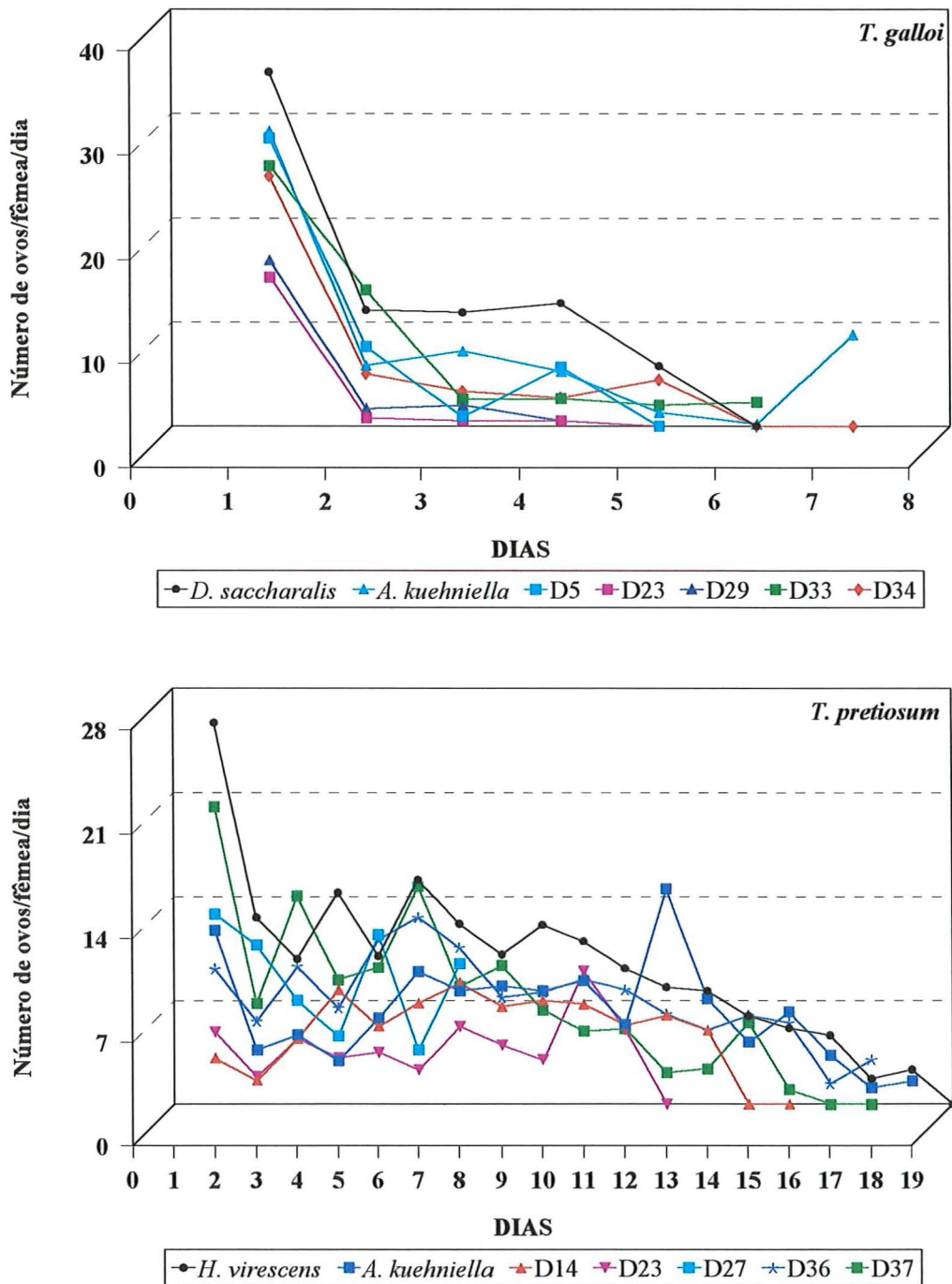


Figura 37. Número de ovos de *A. kuehniella* parasitados/fêmea/dia por *T. galloi* e *T. pretiosum*, criados em algumas dietas artificiais e nos seus respectivos hospedeiros naturais e no hospedeiro alternativo (temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas).

ocorrência exclusiva de fêmeas. No entanto, após o desenvolvimento em meio artificial, as fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum*, submetidas ao parasitismo de ovos de *A. kuehniella*, deram origem à progênie composta exclusivamente de machos. A partenogênese em *Trichogramma* está associada a presença de uma alfa-proteobactéria pertencente ao gênero *Wolbachia*, que infecta os tecidos reprodutivos desse inseto. Essa bactéria infecta insetos das mais diferentes ordens, sempre interferindo no processo reprodutivo dos mesmos. Seus efeitos na população de insetos podem ser causado pela incompatibilidade citoplasmática (citoplasmas das células reprodutivas, óvulo e espermatozóide, são incompatíveis), feminilização de machos e indução de partenogênese telitoca. O mecanismo citogenético envolvido na partenogênese telitoca em *Trichogramma* infectados por essa bactéria, se dá pela diploidização do núcleo durante a metáfase. Esse mecanismo é conhecido como duplicação dos gametas, permitindo a formação de um indivíduo diplóide ($2n$) a partir de um óvulo (n). O indivíduo resultante desse processo apresentará homozigose em todos os *loci*. (Stouthamer & Werren, 1993; Stouthamer & Kazmer, 1994; Werren, 1997). A associação dessa bactéria com a reprodução por partenogênese telitoca por parasitóides do gênero *Trichogramma* foi comprovada pelo tratamento de fêmeas do parasitóide com soluções de antibiótico, que levavam à eliminação desse agente, permitindo que a população voltasse novamente a produzir machos (Stouthamer *et al.* 1990). No entanto, após a eliminação desse microorganismo, *Trichogramma* retorna ao seu processo de reprodução partenogenético normal, onde gametas não-fecundados dão origem a machos e os fecundados, a fêmeas. Assim, no caso das fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum*, que se desenvolveram durante a fase imatura em dieta artificial, provavelmente houve eliminação desse agente contaminante devido às dietas conterem certa quantidade de antibióticos em sua composição, o que permitiu aos adultos emergidos desse meio restabelecerem o processo partenogenético normal. No entanto, como essa geração ainda era composta exclusivamente por fêmeas, os estudos de parasitismo foram conduzidos com fêmeas virgens que, livres de *Wolbachia*, produziram descendência exclusiva de machos.

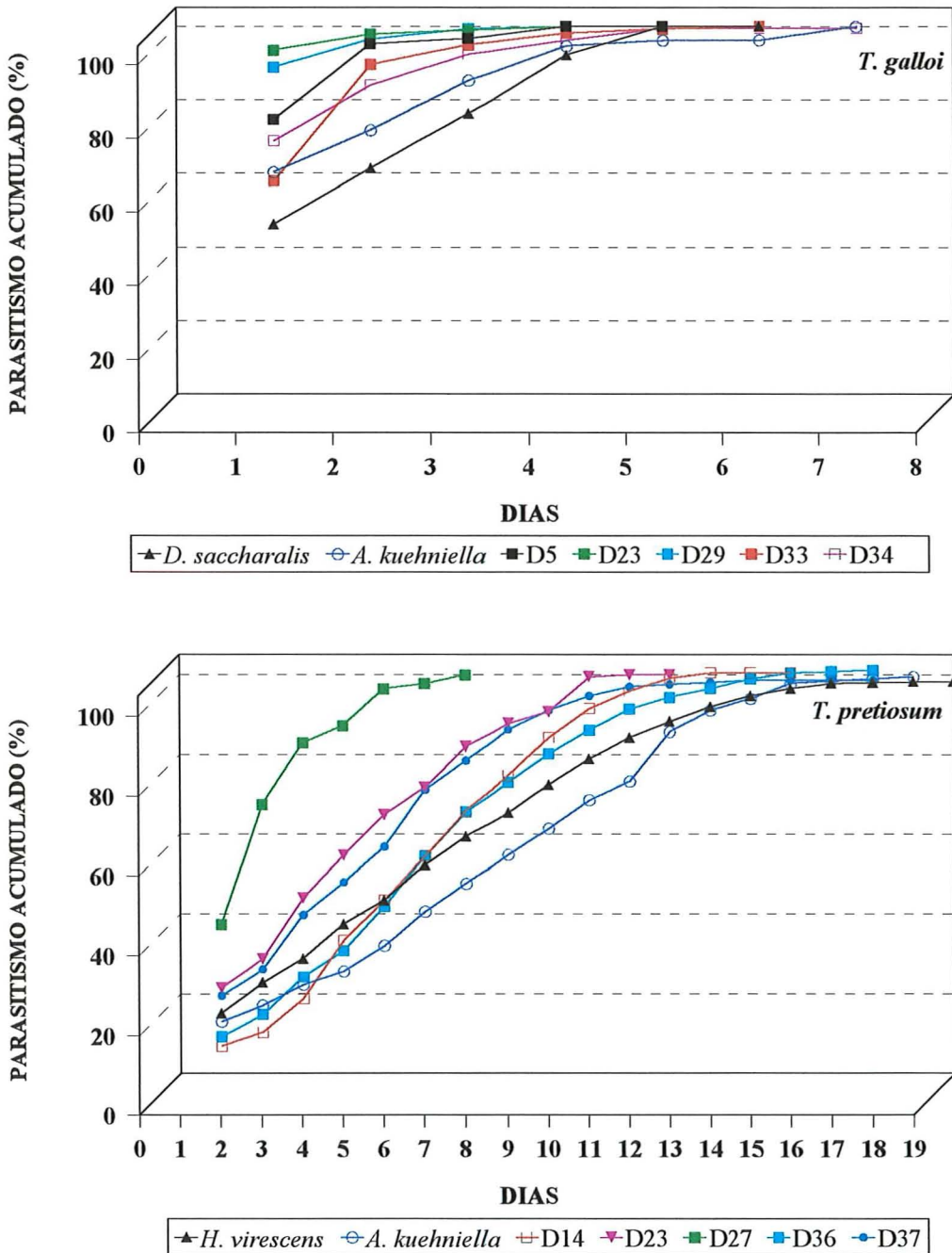


Figura 38. Parasitismo acumulado (%) de ovos de *A. kuehniella* por *T. galloi* e *T. pretiosum*, criados em algumas dietas artificiais e nos seus respectivos hospedeiros naturais e no hospedeiro alternativo (temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas).

4.8.3 Parâmetros morfológicos

O tamanho dos adultos, dentro de certos limites, é determinado pela quantidade de alimento disponível para o inseto, e os resultados aqui apresentados mostram que o volume de dieta oferecido foi adequado ao número de indivíduos que se desenvolveram por ovo artificial, pois tanto *T. galloi*, quanto *T. pretiosum*, apresentaram adultos de tamanho semelhante aos criados *in vivo* (Figura 39). O tamanho dos adultos de *T. galloi* criados *in vitro* e *in vivo* foram muito próximos, sendo que adultos de todas as dietas apresentaram tamanho semelhante aos adultos criados no hospedeiro natural ou alternativo (Figura 39). Os resultados para *T. pretiosum* foram mais variáveis, ocorrendo, porém, diversos casos de semelhança com adultos emergidos dos hospedeiros natural e alternativo (Figura 39). No entanto, ficou evidente a maior variação no tamanho dos adultos criados em dieta artificial, em relação àqueles criados *in vivo*, especialmente nos insetos emergidos de ovos de *A. kuehniella* (Figura 39) que, devido ao seu tamanho, suporta, no máximo, o desenvolvimento de até dois indivíduos do parasitóide (Parra et al. 1997). Ovos de maior volume, como os de *D. saccharalis* e *H. virescens*, que permitem o desenvolvimento de até seis indivíduos por ovo (observação pessoal), tendem a ter o desenvolvimento de insetos com maior variação de tamanho.

Apesar da drástica redução no número de adultos deformados (cerca de 10-15%), ainda é freqüente a ocorrência de deformações comumente relatadas em parasitóides criados em dietas artificiais, tais como adultos com abdome exageradamente desenvolvido e/ou asas não-distendidas (Li, 1982; Strand & Vinson, 1985; Xie et al. 1986a; Cònsoli & Parra, 1997b).

Os resultados obtidos até o momento indicam a possibilidade de criação de *T. galloi* e *T. pretiosum* em dietas artificiais, utilizando-se de ovos artificiais, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de processos automatizados que permitam a produção desses insetos em maior escala, especialmente para *T. pretiosum*. A adição do hidrolisado protéico de lactoalbumina e da solução de extrato de levedura às dietas artificiais permitiram o desenvolvimento de fêmeas com características semelhantes àquelas encontradas pelos insetos produzidos em ovos do hospedeiro alternativo, comumente empregado para a produção massal de *Trichogramma*, visando a programas de controle biológico através de liberações

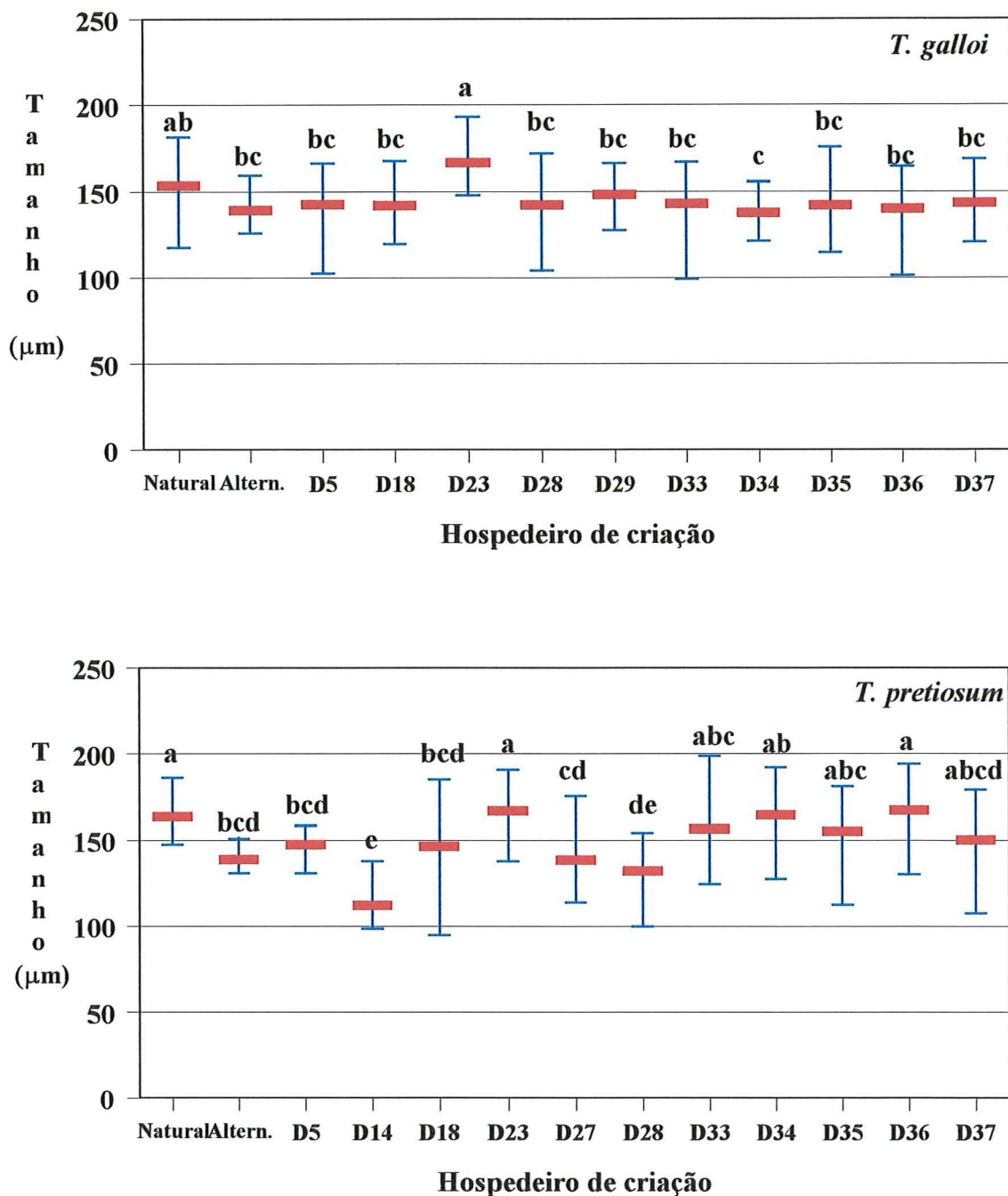


Figura 39. Tamanho médio (μm) (barra vermelha) e intervalo de variação (indicado pela barra azul) da tíbia posterior de fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum*, criadas *in vivo* e *in vitro*. Temperatura: $25\pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60\pm 10\%$ UR; fotofase: 14 horas.

massais desse parasitóide. No entanto, há ainda a necessidade do desenvolvimento de pesquisas, especialmente no que se refere ao aprimoramento dos meios nutritivos utilizados. Assim, devido às variações fisiológicas existentes ao longo do desenvolvimento do inseto, há a necessidade de se verificar quais são os efeitos dessas mudanças na qualidade nutritiva do produto extraído (hemolinfa ou holotécidos) como componente de dietas artificiais para a criação *in vitro* de *Trichogramma*. Por exemplo, no caso da utilização de holotécidos pupais, deve-se determinar qual o momento durante este período em que a extração deve ser feita. Também são necessários trabalhos visando o estabelecimento das condições abióticas ideais durante as diferentes fases do desenvolvimento do inseto, especialmente a umidade, para evitar a concentração ou diluição do meio artificial durante o desenvolvimento larval e a desidratação das fases de prepupa e pupa. Outros fatores importantes a serem pesquisados são as implicações da infecção de linhagens/espécies de *Trichogramma* por *Wolbachia*, no processo de produção *in vitro*, visto que ficaria impossível o estabelecimento de gerações sucessivas em meios artificiais, quando da utilização de linhagens/espécies contaminadas por essa bactéria.

4.9 Efeito da idade da pupa, no momento da coleta dos holotécidos, na qualidade do meio artificial

A idade da pupa no momento da coleta dos holotécidos pupais, para confecção de dietas artificiais para a criação *in vitro* de *T. galloi* e *T. pretiosum* afeta o desenvolvimento dos parasitóides. *T. galloi* depositou um número de ovos/ovo artificial semelhante nas três dietas testadas (Figura 40). Apesar do parasitismo ter sido idêntico nas dietas compostas com holotécidos coletados de pupas de diferentes idades, a sobrevivência dos estágios imaturos foi afetada. *T. galloi* não se desenvolveu em dieta com holotécidos de pupas de *D. saccharalis* com 5-6 dias de idade (Figura 41). Resultados semelhantes foram encontrados para *T. pretiosum*, tanto para o parasitismo quanto para a sobrevivência dos estágios imaturos. No entanto, para este parasitóide, ficou clara a tendência de realizarem menor postura em dietas contendo holotécidos de pupas com 5 a 6 dias de idade (Figuras 40 e 41). O parasitismo dos ovos artificiais só não

foi de 100% para a dieta contendo holotécidos de pupas com 5 a 6 dias de idade, para *T. pretiosum*, onde o parasitismo foi de 92%.

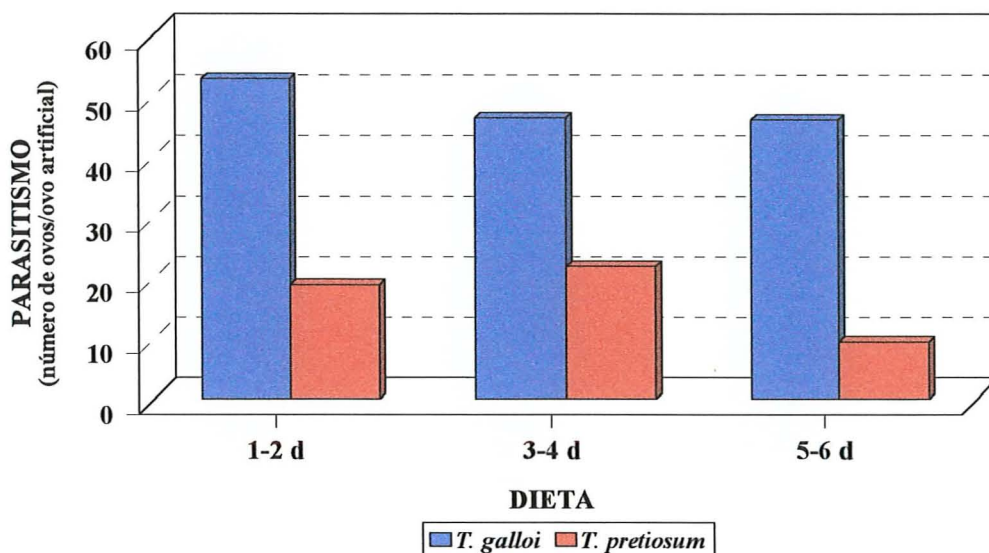


Figura 40. Parasitismo de ovos artificiais, por *T. galloi* e *T. pretiosum*, contendo dietas confeccionadas com holotécidos de pupas de *D. saccharalis* em diferentes idades (1-2 dias, 3-4 dias e 5-6 dias) (temperatura: $25 \pm .1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas).

Adultos de *T. galloi* e *T. pretiosum*, emergidos das dietas contendo holotécidos de pupas com 1-2 e 3-4 dias de idade, apresentaram capacidade de parasitismo e longevidade semelhantes (Tabelas 12 e 13). Adultos de *T. pretiosum*, emergidos da dieta com pupas de 3-4 dias de idade, foram maiores (Tabela 13).

Esses resultados comprovam as sugestões feitas anteriormente de que a idade do hospedeiro como fonte de holotécidos para a composição das dietas pode ser um fator determinante na sua qualidade. Esse fato é baseado na literatura que relata alterações na composição química das pupas no decorrer do seu desenvolvimento. Essas alterações são causadas principalmente pela transformação das proteínas de reserva (localizadas no tecido adiposo), em proteínas circulantes; esse mecanismo é controlado pelos níveis de hormônio juvenil na hemolinfa do inseto. Na realidade, essas alterações iniciam-se no

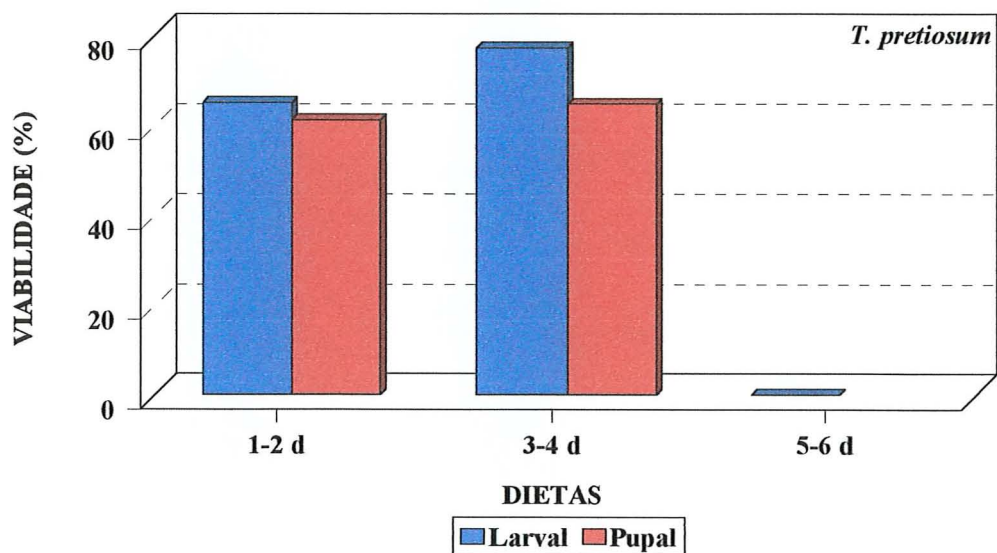
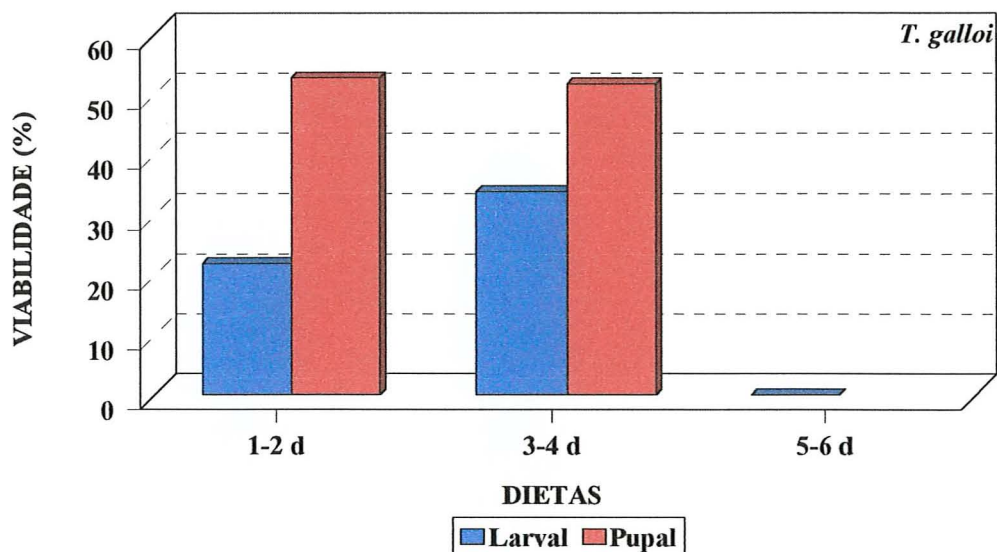


Figura 41. Viabilidade (%) larval e pupal de *T. galloi* e *T. pretiosum*, criados em dietas artificiais confeccionadas com holotecidos de pupas de *D. saccharalis* de diferentes idades (temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas).

último ínstar larval, quando começam a ser produzidas as principais proteínas circulantes na hemolinfa, sendo a quantidade dessas proteínas no estágio pupal muito superior à do estágio larval, fazendo parte ainda da composição do exoesqueleto do inseto. Essas proteínas também estão presentes nos ovos, representando cerca de 30-35% das proteínas solúveis dos mesmos (Plantevin *et al.*, 1987), caracterizando, desta forma, a sua importância neste tipo de trabalho.

É evidente, que ao longo do processo de metamorfose várias outras alterações ocorrem, como a passagem dos resíduos de excremento da forma acumulada (sais de urato - não tóxica às células) para a forma de material excretável (ácido úrico). Este material fica depositado no tubo digestivo recém-formado do adulto, sendo eliminado após a sua emergência. Neste caso, holotécidos derivados de pupas nesse estágio de desenvolvimento apresentam grande quantidade de ácido úrico, substância sabidamente tóxica. Esse poderia ser um dos fatores a explicar a completa ausência de desenvolvimento, tanto de *T. galloi* como *T. pretiosum*, na dieta contendo tecidos derivados de pupas com 5-6 dias de idade. Nessa fase, o adulto de *D. saccharalis* já se encontra próximo a emergência, que ocorrerá a partir do sétimo dia.

Os resultados para *T. galloi* e *T. pretiosum* quando criados em dietas derivadas de holotécidos de pupas de *D. saccharalis* de diferentes idades, associados àqueles encontrados para os mesmos parasitóides criados em dietas contendo esses componentes de *B. mori* (item 4.7), indicam que cada espécie de hospedeiro utilizado apresenta um momento ideal para que os seus holotécidos sejam coletados e processados na criação desses parasitóides em dietas artificiais.

4.10 Parasitismo de ovos artificiais por diferentes linhagens de *T. pretiosum*

O parasitismo de ovos artificiais pelas diferentes linhagens de *T. pretiosum* foi bastante diferenciado. A linhagem 4 apresentou o maior número de ovos depositados por ovo artificial, sendo o menor parasitismo apresentado pela linhagem 1 (Figura 42). Esta linhagem, também foi a única a não parasitar 100% dos ovos artificiais, estando a sua aceitação ao redor de 90%.

Tabela 12. Capacidade de parasitismo (número de ovos parasitados/fêmea), longevidade (dias) e tamanho (μm) de fêmeas de *T. galloi*, criadas em dieta artificial confeccionadas com holotécidos de pupas de *D. saccharalis* em diferentes idades (temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas).

Dieta	Parasitismo (número ovos/fêmea)	Longevidade (dias)	Tamanho (mm)
Idade da pupa (dias)	($\bar{x} \pm \text{se}$)	($\bar{x} \pm \text{se}$)	($\bar{x} \pm \text{se}$)
1-2	40,95 \pm 3,24a	3,33 \pm 0,13a	152,10 \pm 3,28a
3-4	53,25 \pm 13,36a	3,58 \pm 0,22a	157,00 \pm 3,29a
5-6	*	*	*

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) (Parasitismo: $F = 0,888$; gl = 1, 46; $P < 0,05$; Longevidade: $F = 0,963$; gl = 1, 46; $P < 0,05$; Tamanho: $F = 1,054$; gl = 1, 39; $P < 0,05$).*. A dieta confeccionada com holotécidos extraídos de pupas com 5-6 dias de idade não permitiu o completo desenvolvimento de *T. galloi*.

Tabela 13 . Capacidade de parasitismo (número de ovos parasitados/fêmea), longevidade (dias) e tamanho (μm) de fêmeas de *T. pretiosum*, criadas em dieta artificial confeccionadas com holotécidos de pupas de *D. saccharalis* em diferentes idades (temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas).

Dieta	Parasitismo (número ovos/fêmea)	Longevidade (dias)	Tamanho (mm)
Idade da pupa (dias)	($\bar{x} \pm \text{se}$)	($\bar{x} \pm \text{se}$)	($\bar{x} \pm \text{se}$)
1-2	101,87 \pm 12,09a	10,35 \pm 0,88a	148,82 \pm 4,07a
3-4	131,40 \pm 16,20a	12,72 \pm 1,08a	168,20 \pm 3,75b
5-6	*	*	*

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) (Parasitismo: $F = 1,441$; gl = 1, 46; $P < 0,05$; Longevidade: $F = 1,693$; gl = 1, 46; $P < 0,05$; Tamanho: $F = 3,503$; gl = 1, 39; $P < 0,05$).*. A dieta confeccionada com holotécidos extraídos de pupas com 5-6 dias de idade não permitiu o completo desenvolvimento de *T. pretiosum*.

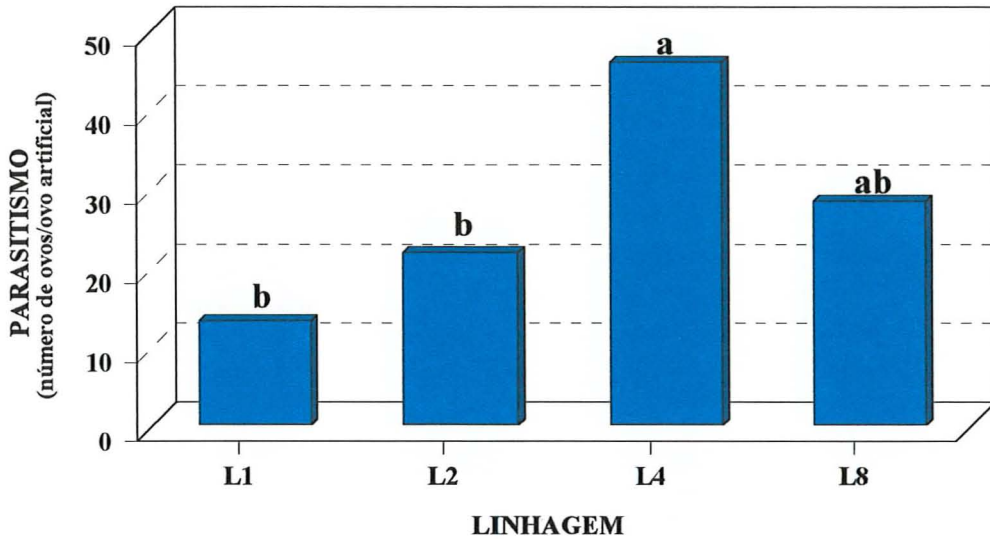


Figura 42. Parasitismo (número de ovos do parasitóide/ovo artificial) de ovos artificiais por diversas linhagens de *T. pretiosum* (temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas).

Essas linhagens também apresentaram diferenças quanto à sobrevivência dos seus estágios imaturos em meio artificial. A linhagem 2, apesar de não ter apresentado o maior número de ovos depositado por ovo artificial, apresentou a maior viabilidade para o estágio imaturo. A linhagem 1, apesar de ter a menor viabilidade larval, apresentou a maior viabilidade para o estágio de pupa (Figura 43).

O sucesso na exploração de um hospedeiro durante os estágios imaturos de *Trichogramma* é determinado geneticamente e as diferenças na sobrevivência dos estágios imaturos entre diferentes linhagens de uma mesma espécie, quando parasitando um mesmo hospedeiro, está relacionado à variação genética entre as populações. Essa variabilidade foi anteriormente relatada para *T. brassicae* (Chassain & Boulétreau, 1991) e *T. voegelei* (Mimouni, 1991), sendo que Gomes (1997) verificou que o sucesso do desenvolvimento pré-imaginal também é dependente da espécie do hospedeiro na qual as linhagens do parasitóide sejam criadas. Este autor demonstrou que a viabilidade do período de desenvolvimento pré-imaginal de diversas linhagens de *T. pretiosum* variou de

acordo com o hospedeiro alternativo utilizado.

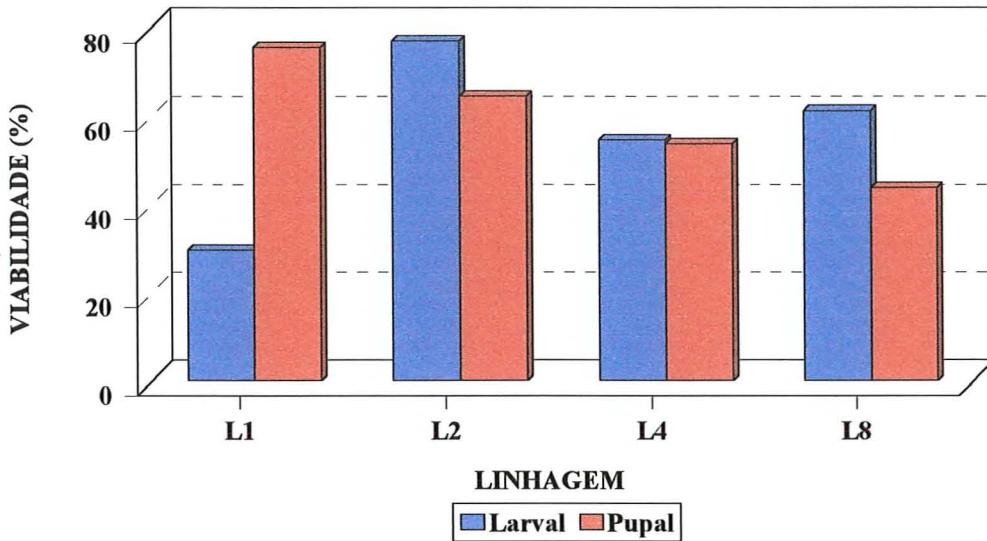


Figura 43. Viabilidade (%) larval e pupal das diferentes linhagens de *T. pretiosum* criadas em dieta artificial (temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 horas).

Esses resultados demonstram que a variabilidade genética existente entre as diversas populações de uma mesma espécie deve ser um fator a ser considerado quando do desenvolvimento de meios artificiais para a produção *in vitro* de parasitóides, quando se busca a produção de parasitóides para o controle de diversas pragas nas mais variadas culturas. Devido a esse fato, que indica uma certa adaptação de cada população a um hospedeiro preferencial, levando, portanto, à ocorrência de uma pequena especialização ao nível nutricional, talvez seja necessária a adaptação nutricional do meio artificial para cada população (linhagem) a ser produzida, já que a seleção de linhagens adequadas para o controle de uma praga-alvo é um dos fatores determinantes para o sucesso no controle da mesma por *Trichogramma* (Hassan, 1994, 1997).

5. CONCLUSÕES

- É possível a criação *in vitro* de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 e *T. pretiosum* Riley, 1879 em substrato artificial, desde o parasitismo até a emergência dos adultos, em 30% das dietas testadas;
- parasitóides com características biológicas, comportamentais e morfológicas semelhantes àquelas dos insetos criados *in vivo*, são obtidos em até 50% das dietas artificiais que resultaram no completo desenvolvimento dos parasitóides;
- os ovos dos hospedeiros naturais (*Diatraea saccharalis*, *Heliothis virescens*, *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*) e alternativos (*Sitotroga cerealella*, *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica*) de *T. galloi* e *T. pretiosum* apresentam tamanho, volume, esculturação e textura do córion bastante diferenciada;
- os hospedeiros naturais de *T. galloi* (*D. saccharalis*) e *T. pretiosum* (*H. virescens*, *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*), assim como os alternativos, apresentam estrutura fina do córion bem distinta, especialmente no número e tamanho das camadas existentes;
- a duração das diversas etapas do parasitismo por *T. galloi* e *T. pretiosum* é variável de acordo com o hospedeiro;
- ovos de *S. cerealella* foram os menos aceitos pelos parasitóides estudados;
- a duração do período de perfuração do córion dos diversos hospedeiros está relacionada com a espessura do córion, especialmente do exocóron;
- o período de oviposição por *T. galloi* e *T. pretiosum* está relacionado com o volume do hospedeiro;

- o método descrito para a confecção de ovos artificiais é adequado;
- a textura da superfície do ovo artificial, resultante da ação térmica do processo de confecção dos ovos, é suficiente para desencadear o processo de parasitismo por fêmeas de *T. galloi* e *T. pretiosum*;
- filmes plásticos de polietileno de alta densidade, de 7-8 e 9-10 µm de espessura, são adequados para a confecção de ovos artificiais, para as espécies dos parasitóides estudadas;
- ovos artificiais de 5 mm de diâmetro e a proporção de 6 fêmeas do parasitóide por ovo artificial é a melhor combinação a ser utilizada para a criação *in vitro* de *T. galloi* e *T. pretiosum*;
- *T. galloi* e *T. pretiosum* apresentam exigências nutricionais distintas;
- as dietas compostas de holotecidos pupais de *D. saccharalis* (65%), gema de ovo (18%), soro fetal bovino (8,5%), hidrolisado de lactoalbumina (8,5%) ou solução de extrato de levedura (8,5%) e anticontaminantes (0,3%) possibilitam o melhor desenvolvimento de *T. galloi* e *T. pretiosum*;
- a composição da dieta influencia a oviposição pelos parasitóides;
- o estímulo à oviposição fornecido pela dieta não está relacionado com a sua qualidade nutricional para o desenvolvimento dos parasitóides;
- a forma de obtenção, o armazenamento e a idade do hospedeiro no momento da coleta de holotecidos pupais afetam a qualidade nutricional desse material como componente para a criação *in vitro* de parasitóides;
- a adição do hidrolisado de lactoalbumina e/ou da solução de extrato de levedura aumenta a sobrevivência larval e pupal, e permite a obtenção de adultos fecundos;
- o parasitismo de ovos artificiais e a sobrevivência larval e pupal de *T. pretiosum* em dietas artificiais é dependente da linhagem utilizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABLES, J.R.; VINSON, S.B.; ELLIS, J.S. Host discrimination by *Chelonus insularis* (Hym.: Braconidae), *Telenomus heliothidis* (Hym.: Scelionidae) and *Trichogramma pretiosum* (Hym.: Trichogrammatidae). **Entomophaga**, v.26, p. 149-156. 1981.
- ALPHEN van, J.J.M.; VISSER, M.E. Superparasitism as an adaptative strategy for insect parasitoids. **Annual Review of Entomology**, v.35, p. 59-79. 1990.
- ALTIERI, M.A.; LEWIS, W.J.; NORDLUND, D.A.; GUELDNER, R.C.; TODD, J.W. Chemical interactions between plants and *Trichogramma* wasps in Georgia soybean fields. **Protection Ecology**, v.3, p. 259-63. 1981.
- ALTIERI, M.A.; ANNAMALAI, S.; KATIYAR, K.P.; FLATH, R.A. Effects of plant extracts on the rates of parasitization of *Anagasta kuehniella* (Lep.: Pyralidae) eggs by *Trichogramma pretiosum* (Hym.: Trichogrammatidae) under greenhouse conditions. **Entomophaga**, v.27, p. 431-8. 1982.
- ANDOW, D.A.; RISCH, S.J. Parasitism in diversified agroecosystems: phenology of *Trichogramma minutum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Entomophaga**, v.32, p. 255-60. 1987.
- ARBOGAST, R.T.; LECATO, G.L.; van BYRD, R. External morphology of some eggs of stored-product moths (Lepidoptera: Pyralidae, Gelechiidae, Tineidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v.9, p. 165-77. 1980.
- ARTHUR, A.P.; COPPEL, H.C. Studies on dipterous parasites of the spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lep. Tortricidae) I. *Sarcophaga aldrichi* (Park) (Dip. Sarcophagidae). **Canadian Journal of Zoology**, v.31, p. 374-91. 1953.
- ARTHUR, A.P.; HEGDEKAR, B.M.; ROLLINS, L. Component of the hemolymph that induces oviposition in a parasitic insect. **Nature**, v.223, p. 331-9. 1969.
- ARTHUR, A.P.; HEGDEKAR, B.M.; BATSCH, W.W. A chemically defined, synthetic medium that induces oviposition in the parasite *Itopectis conquisitor* (Hymenoptera:

Ichneumonidae). **Canadian Entomologist**, v.104, p. 1251-8. 1972.

AWUITOR, K.; MASSELOT, M.; TERSAC, J. *In vitro* rearing of *Pimpla instigator* (Hymenoptera: Ichneumonidae). 2. Completion of development in semi-artificial conditions. **Entomophaga**, v.29, p. 331-9. 1984.

BAR, D.; GERLING, D.; ROSSLER, Y. Bionomics of the principal natural enemies attacking *Heliothis armigera* in cotton fields in Israel. **Environmental Entomology**, v.8, p. 468-74, 1979.

BARRET, M.; SCHMIDT, J.M. A comparison between the amino acids composition of an egg parasitoid wasp and some of its hosts. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.59, p. 29-41. 1991.

BARONIO, P.; SEHNAL, F. Dependence of the parasitoid *Gonia cinerascens* Rond. on the hormones of its lepidopterous hosts. **Journal of Insect Physiology**, v.26, p. 619-26. 1980.

BATTISTI, A.; IANNE, P.; MILANI, N.; ZANATA, M. Preliminary accounts on the rearing of *Ooencyrtus pityocampae* (Mercet) (Hym.; Encyrtidae). **Journal of Applied Entomology**, v.110, p. 121-7. 1990.

BEEVERS, M.; LEWIS, W.J.; GROSS, H.R.; NORDLUND, D.A. Kairomones and their use for management of entomophagous insects. X. Laboratory studies on manipulation of host finding behavior of *Trichogramma pretiosum* with a kairomone extracted from *Heliothis zea* (Boddie) moth scales. **Journal of Chemical Ecology**, v.7, p. 635-48. 1981.

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**, v.104, p. 340-53. 1987.

BOLDT, P.E. Temperature, humidity, and host: effect on rate of search of *Trichogramma evanescens* and *T. minutum* auctt. (not Riley, 1871). **Annals of the Entomological Society of America**, v.67, p.706-8. 1974.

BONNOT, G.; DELOBEL, B.; GRENIER, S. Elevage, croissance et développement de *Phryxe caudata* (Diptera, Tachinidae) sur son hôte de substitution *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) et sur milieu artificiel. **Société Linneenne Lyon**, v.53, p. 313-20. 1984.

BOULETREAU, M. Premiers résultats de l'élevage des larves d'un hyménoptère chalcidien

- (*Pteromalus puparum* L.) sur hémolymph de lépidoptère. **Entomophaga**, v.13, p. 217-22. 1968.
- BOULETREAU, M. Développement et croissance larvaires en conditions semi-artificielles et artificielles chez un hyménoptère entomophage: *Pteromalus puparum* L. (Chalc.). **Entomophaga**, v.17, p. 265-273. 1972.
- BOWEN, W.R.; STERN, V.M. Effect of temperature on the production of males and sexual mosaics in a uniparental race of *Trichogramma semifumatum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.59, p.823-34. 1966.
- BURTON, R. Mass rearing the corn earworm in the laboratory. Tifton, USDA/Agricultural Research Service, 1969. 8 p. (ARS 33-134).
- BRATTI, A. Tecniche di allevamento in vitro per gli stadi larvali di insetti entomofagi parassitoidi. **Bolletino dell Istituto di Entomologia della Università "Guido Grandi" di Bologna**, v.44, p. 169-220. 1990.
- BRATTI, A.; MONTI, M. Allevamento "in vitro" delle larve di *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Dipt. Tachinidae) su omogeneizzato di crisalidi di *Galleria mellonella* L. (Lep. Galleridae). **Bolletino dell Istituto di Entomologia della Università "Guido Grandi" di Bologna**, v.43, p. 115-26. 1988.
- BRATTI, A.; NETTLES Jr., W.C. In vitro rearing of *Palexorista laxa* (Curran) (Diptera: Tachinidae) on haemolymph-based diets. **Bolletino dell Istituto di Entomologia della Università "Guido Grandi" di Bologna**, v.43, p. 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**, v.63, p. 213-9. 1992.
- BRONSKILL, J.F.; HOUSE, H.L. Notes on rearing a pupal endoparasite, *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae), on unnatural food. **The Canadian Entomologist**, v.89, p. 483. 1957.
- CAMPADELLI, G.; DINDO, M.L. Recenti progressi nello studio delle diete artificiali per l'allevamento di insetti entomofagi parassiti. **Bolletino dell Istituto di Entomologia della Università "Guido Grandi" di Bologna**, v.42, p. 101-18. 1987.
- CARPENTER, J.E.; GREANY, P.D. Comparative host-seeking behavior, fecundity, and longevity of artificially-reared versus host-reared *Diapetimorpha introita* (Cresson) (Hymenoptera: Ichneumonidae) wasps. In INTERNATIONAL CONGRESS OF

- ENTOMOLOGY, 20., Firenze, 1996. **Proceedings**. Firenze, Italy, 1996. p. 616.
- CHASSAIN, C.; BOULÉTREAU, M. Genetic variability in quantitative traits of host exploitation in *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Genetica**, v.83, p. 195-202. 1991.
- CHUMAKOVA, B.M. Comparative anatomy and biology of *Trichogramma evanescens* Westw. (Hymenoptera, Chalcidoidea). **Proceedings All. of Union Scientific Research Institute Protection**, v.31, p. 121-63. 1968.
- CLAUSEN, C.P. **Entomophagous Insects**. New York: McGraw-Hill. 1940.
- COLLINS, M.D.; DIXON, A.F.G. The effect of egg depletion on the foraging behaviour of an aphid parasitoid. **Journal of Applied Entomology**, v.102, p. 342-352. 1986.
- CÔNSOLI, F.L. Criação *in vitro* dos parasitóides de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 e *T. galloi* Zucchi, 1988 (Hym.: Trichogrammatidae). Piracicaba, 1993. 112p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P. Effects of constant and alternating temperatures on *Trichogramma galloi* Zucchi (Hym., Trichogrammatidae) biology. II. - Parasitism capacity and longevity. **Journal of Applied Entomology**, v.119, p. 667-670, 1995.
- CÔNSOLI, F.L. & PARRA, J.R.P. Comparison of hemolymph and holotissues of different species of insects as diet components for *in vitro* rearing of *Trichogramma galloi* Zucchi and *T. pretiosum* Riley. **Biological Control**, v.6, p. 401-6. 1996a.
- CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P. Biology of *Trichogramma galloi* and *T. pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) reared *in vitro* and *in vivo*. **Annals of the Entomological Society of America**, v.89, p. 828-834, 1996b.
- CÔNSOLI, F.L. & PARRA, J.R.P. Produção *in vitro* de parasitóides: criação de *Trichogramma galloi* e *T. pretiosum* no Brasil. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. eds., **Trichogramma e o Controle Biológico Aplicado**. Piracicaba: FEALQ/USP, 1997a. p. 259-302.
- CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P. Development of an oligidic diet for *in vitro* rearing of *Trichogramma galloi* Zucchi and *Trichogramma pretiosum* Riley. **Biological Control**, v.8, p. 172-176, 1997b.
- COOPERBAND, M.; FANTI, P.; VINSON, S.B.; MATTHEWS, R.W. Factors involved in *in vitro* rearing *Melittobia digitata*. In INTERNATIONAL CONGRESS OF

- ENTOMOLOGY, 20., Firenze, 1996. **Proceedings**. Firenze, Italy, 1996. p. 638.
- CRUICKSHANK, W.J. Ultrastructural modifications in the follicle cells and egg membranes during development of flour moth oöcytes. **Journal of Insect Physiology**, v.18, p. 485-98. 1972.
- CUMMINGS, M.R. Formation of the vitelline membrane and chorion in developing oocytes of *Ephestia kuehniella*. **Zeitschrift Zellforsch.**, v.127, p. 175-88. 1972.
- DAHLAN, A.N.; GORDH, G. Development of *Trichogramma australicum* Girault (Hymenoptera: Trichogrammatidae) on *Helicoverpa armigera* (Hübner) eggs (Lepidoptera: Noctuidae). **Australian Journal of Entomology**, v.35, p.337-44. 1996.
- DAI, K.J.; CAO, A.H.; LI, X.Y. Oxygen consumption of *Trichogramma dendrolimi*. **Journal of the Wuhan University**, v.4, p. 169-77. 1982.
- DAI, K.J.; ZHANG, L.W.; MA, Z.J.; ZHONG, L.S.; ZHANG, Q.K.; CAO, A.; XU, K.; LI, Q.; GAO, Y. Research and utilization of artificial host egg for propagation of parasitoid *Trichogramma*. **Les Colloques de l'INRA**, v.43, p. 311-18. 1988.
- DIGILIO, M.C.; PENNACHIO, F.; FANTI, P.; TREMBLAY, E. *In vitro* rearing of *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera, Braconidae). In INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 20., Firenze, 1996. **Proceedings**. Firenze, Italy, 1996. p. 615.
- DINDO, M.L. Alcune osservazioni sulla biologia di *Brachymeria intermedia* (Nees) (Hym. Chalcididae) in vivi e in vitro. **Bolletino dell Istituto di Entomologia della Università "Guido Grandi" di Bologna**, v.44, p. 221-32. 1990.
- DING, H.C.; QUI, H.G.; HWANG, C.B. *In vitro* rearing of an egg parasitoid, *Tetrastichus schoenobii* Ferriere (Hymenoptera: Tetrastichidae). **Contribution of the Shangai Institute of Entomology**, v.1, p. 55-9. 1980.
- DOUGHERTY, E.C. Introduction to axenic culture of invertebrate metazoa: a goal. **Annals of the New York Academic Science**, v.77, p. 27-54. 1959.
- DOUTT, R.L. Biological characteristics of entomophagous adults. In: DeBach, P. ed. **Biological Control of Insect Pests and Weeds**. Reinhold: New York. 1964.
- FANTI, P.; BRATTI, A. *In vitro* rearing of the larval stages of the parasitoid *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Diptera Tachinidae): Preliminary results. **Redia**, v.74, p. 449-52. 1991.

- FANTI, P.; VINSON, S.B. *In vitro* rearing of house fly parasitoids (Hymenoptera, Pteromalidae). In INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 20., Firenze, 1996. **Proceedings**. Firenze, Italy, 1996. p. 615.
- FEHRENBACH, H.; DITTRICH, V.; ZISSLER, D. Eggshell fine structure of three lepidopteran pests: *Cydia pomonella* (L.) (Tortricidae), *Heliothis virescens* (Fabr.), and *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Noctuidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v.16, p.201-19. 1987.
- FERKOVICH, S.; GUPTA, P.; DILLARD, C.; OBERLANDER, H.; BLUMBERG, D. Growth and development of the endoparasitoid *Microplitis croceipes* (Braconidae) *in vitro* and on factitious hosts. In INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 20., Firenze, 1996. **Proceedings**. Firenze, Italy, 1996. p. 616.
- FLANDERS, S.E. Host influence on the prolificacy and size of *Trichogramma*. **Pan-Pacific Entomology**, v.11, p.175-7. 1935.
- FLANDERS, S.E. Notes on life history and anatomy of *Trichogramma*. **Annals of the Entomological Society of America**, v.30, p. 304-8. 1937.
- FUTUYMA, D.J.; PETERSON, S.C. Genetic variation in the use of resources by insects. **Annual Review of Entomology**, v.30, p. 217-38. 1985.
- GAO, Y.G.; KAIJIA, D.J.; SHONG, L.S. Studies on the artificial host egg for *Trichogramma*. **Les Colloques de l'INRA**, v.9, p. 181. 1982.
- GARDNER, S.M.; van LENTEREN, J.C. Characterisation of the arrestment responses of *Trichogramma evanescens*. **Oecologia**, v.68, p. 265-70. 1986.
- GODFRAY, H.C.J. **Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology**. Princeton: Princeton University Press. 1994.
- GOMES, S.M. Comparação de três hospedeiros alternativos para criação e produção massal de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 e *T. galloi* Zucchi, 1988. Piracicaba, 1997. 106 p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- GREANY, P. Growth and development of an insect parasitoid *in vitro*. **American Zoologist**, v.20, p. 946. 1980.
- GREANY, P. Culture of hymenopteran endoparasites *in vitro*. **In vitro**, v.17, p. 230. 1981.
- GREANY, P. *In vitro* culture of hymenopterous larval endoparasitoids. **Journal of Insect**

Physiology, v.32, p. 409-19. 1986.

- GREANY, P. Development of a utilitarian, artificial culture medium and presentation system suitable for rearing multiple insect predators and parasitoids. In **INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY**, 20., Firenze, 1996. **Proceedings**. Firenze, Italy, 1996. p. 637.
- GREANY, P.D.; HAWKE, S.D.; CARLYSE, T.C.; ANTHOMY, D.W. Sense organs in the ovipositor of *Biosteres (Opus) longicaudatus*, a parasite of the Caribbean fruit fly *Anastrepha suspensa*. **Annals of the Entomological Society of America**, v.70, p. 319-21. 1977.
- GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v.69, p.487-8. 1976.
- GRENIER, S. Effects nocifs de la Nipagine M sur le parasitoïde *Phryxe caudata* (Dipt.: Tachinidae). **Entomophaga**, v.22, p. 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**, v.26, p. 13-23. 1979.
- GRENIER, S. Rearing of *Trichogramma* and other egg parasitoids on artificial diets. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S.A., eds. **Biological Control with Egg Parasitoids**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 73-92.
- GRENIER, S. Desenvolvimento e produção in vitro de *Trichogramma*. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A., eds. **Trichogramma e o Controle Biológico Aplicado**. Piracicaba: FEALQ/USP, 1997. p. 235-258.
- GRENIER, S.; BONNOT, G. Development of *Trichogramma dendrolimi* and *T. maidis* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) in artificial media and artificial host eggs. **Les Colloques de l'INRA**, v.43, p. 319-26. 1988.
- GRENIER, S.; LIU, W.H. Antifungals: mold control and safe levels in artificial media for *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Entomophaga**, v.35, p. 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. (Diptera Tachinidae) I. Survie du parasitoïde sur milieux dont la composition est basée sur celle de l'hémolymphe de l'hôte. **Ann. Zool. Ecol. Anim.**, 6: 511-520, 1974.

- GRENIER, S.; BONNOT, G.; DELOBEL, B. Définition et mise au point de milieux artificiels pour l'élevage in vitro de *Phryxe caudata* Rond. (Diptera Tachinidae) II. Croissance et mues larvaires du parasitoïde en milieux définis. **Ann. Zool. Ecol. Anim.**, 7: 13-25, 1975.
- GRENIER, S.; DELOBEL, B.; BONNOT, G. Physiological considerations of importance to the success of in vitro culture: an overview. **Journal of Insect Physiology**, v.32, p. 403-8. 1986.
- GRENIER, S.; VEITH, V.; RENO, M. Some factors stimulating oviposition by the oophagus parasitoid *Trichogramma brassicae* Bezd. (Hym., Trichogrammatidae) in artificial host eggs. **Journal of Applied Entomology**, v.115, p. 66-76. 1993.
- GRENIER, S.; GREANY, P.D.; COHEN, A.C. Potential for mass release of insect parasitoids and predators through development of artificial culture techniques. In: ROSEN, D. ed. **Pest Management in the Subtropics: Biological Control - a Florida Perspective**. Andover: Intercept Ltd., 1994. p. 181-205.
- 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 Rendue Academie des Sciences, Série D**, p. 535-38. 1978.
- GUAN, X.C.; WU, Z.X.; WU, T.N.; FENG, H. Studies on rearing *Trichogramma dendrolimi* Matsumura in vitro. **Acta Entomologica Sinica**, v.21, p. 122. 1978.
- GUELDNER, R.C.; NORDLUND, D.A.; LEWIS, W.J.; THEAN, J.E.; WILSON, D.M. Kairomones and their use for management of entomophagous insects. XV. Identification of several acids in scales of *Heliothis zea* moths and comments on their possible role as kairomones for *Trichogramma pretiosum*. **Journal of Chemical Ecology**, v.10, p. 245-51. 1984.
- GUERRA, A.A. In vitro rearing of *Bracon mellitor* and *Catolaccus grandis* with different insect hemolymph-based diets. **Southwestern Entomologist**, v.17, p. 123-6. 1992.
- GUERRA, A.A.; ROBACKER, K.M.; MARTINEZ, S. In vitro rearing of *Bracon mellitor* and *Catolaccus grandis* with artificial diets devoid of insect components. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.68, p. 303-7. 1993.
- GUERRA, A.A.; MARTINEZ, S. An in vitro rearing system for the propagation of the ectoparasitoid *Catolaccus grandis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.72, p. 11-6. 1994.

- HAGEN, K.S.; TASSAN, R.L. A method of providing artificial diets to *Chrysopa* larvae. **Journal of Economic Entomology**, v.58, p. 999-1000. 1965.
- HASSAN, S.A. Strategies to select *Trichogramma* species for use in biological control. In: WAINBERG, E.; HASSAN, S.A. ed. **Biological Control with Egg Parasitoids**. Wallingford: CAB International. 1994. p. 55-68.
- HASSAN, S.A. Seleção de espécies de *Trichogramma* para o uso em programas de controle biológico. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A., eds. **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 183-206.
- HAWKE, S.D.; FARLEY, R.D.; GREANY, P.A. The fine structure of sense organs in the ovipositor of the parasitic wasp *Orgilus lepidus* Muesbeck. **Tissue Cell**, v.5, p. 171-84. 1973.
- HAWLITZKY, N.; BOULAY, C. Régimes alimentaires et développement chez *Trichogramma maidis* Pintureau et Voegelé (Hym. Trichogrammatidae) dans l'oeuf d'*Anagasta kuehniella* Zeller (Lep. Pyralidae). **Les Colloques de l'INRA**, v.9, p. 101-6. 1982.
- HEGDEKAR, B.M.; ARTHUR, A.P. Host hemolymph chemicals that induce oviposition in the parasite *Itopectis conquisitor* (Hymenoptera: Ichneumonidae). **The Canadian Entomologist**, v.105, p. 787-93. 1973.
- HINTON, H. **Biology of Insect Eggs**. Oxford: Pergamon Press. 1981.
- HOFFMAN, J.D.; IGNOFFO, C.M. Growth of *Pteromalus puparum* in a semisynthetic medium. **Annals of the Entomological Society of America**, v.67, p. 524-5. 1974.
- HOFFMAN, J.D.; IGNOFFO, C.M.; LONG, S.H. In vitro cultivation of an endoparasitic wasp, *Pteromalus puparum*. **Annals of the Entomological Society of America**, v.6, p. 633-4. 1973.
- HOFFMAN, J.D.; IGNOFFO, C.M.; DICKERSON, W.A. In vitro rearing of the endoparasitic wasp *Trichogramma pretiosum*. **Annals of the Entomological Society of America**, v.68, p. 335-6. 1975.
- HOHMANN, C.L.; LUCK, R.F.; OATMAN, E.R.; PLATNER, G.R. 1988. Oviposition behavior of *Trichogramma platneri* Nagarkatti (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.17, p. 185-95. 1988.
- 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**, v.32, p. 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**, v.32, p. 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**, v.32, p. 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**, v.32, p. 358-65. 1954d.

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**, v.12, p. 299-310. 1966.

HOUSE, H.L. An artificial host: encapsulated synthetic medium for in vitro oviposition and rearing the endoparasitoid *Itopectis conquisitor* (Hymenoptera: Ichneumonidae). **The Canadian Entomologist**, v.110, p. 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**, v.10, p. 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**, v.79, p. 50-3. 1948.

IRIE, K.; XIE, Z.N.; NETTLES, W.C.; 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**, v.17, p. 269-75. 1987.

JONES, R.L.; LEWIS, W.J.; BEROZA, M.; BIERL, B.A.; SPARKS, A.N. Host seeking stimulants (kairomones) for the egg-parasite *Trichogramma evanescens*. **Environmental Entomology**, v.2, p. 593-6. 1973.

KELLER, M.A. Influence of leaf surfaces on movents by the hymenopterous parasitoid *Trichogramma exiguum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.43, p. 55-9.

1987.

- KEMP, W.P.; SIMMONS, G.A. The influence of stand factors on parasitism of spruce budworm eggs by *Trichogramma minutum*. **Environmental Entomology**, v.7, p. 685-8. 1978.
- KLOMP, K.; TEERINK, B.J. Host selection and number of eggs per oviposition in the egg parasite *Trichogramma embryophagum* Htg.. **Nature**, v.195, p. 1020-1. 1962.
- KLOMP, K.; TEERINK, B.J.; MA, W.C. Discrimination between parasitized and unparasitized hosts in the egg parasite *Trichogramma embryophagum* [Hym.: Trichogrammatidae]: a matter of learning and forgetting. **Netherlands Journal of Zoology**, v.30, p. 254-77. 1980.
- KRISHNAMURTI, B. A microscopical study of the development of *Trichogramma minutum* Riley (the egg-parasite of the sugarcane borers in Mysore) and its parasitization of the *Corcyra cephalonica* Staint. (the flour moth employed in the mass production of *Trichogramma*). **Proceedings of the Indian Academic Science**, v.7B, p. 36-40. 1937.
- LAING, J. Host-finding by insects parasites. I. observations on the finding of hosts by *Alysia manducator*, *Mormoniella vitripennis* and *Trichogramma evanescens*. **Journal of Annual Ecology**, v.6, p. 298-317. 1937.
- LE RALEC, A.; WAJNBERG, E. Sensory receptors of the ovipositor of *Trichogramma maidis* [Hym.: Trichogrammatidae]. **Entomophaga**, v.35, p. 293-9. 1990.
- LEE, H.P.; LEE, K.S. Artificial rearing *in vitro* of *Ooencyrtus kuvanae* Howard (Hymenoptera: Encyrtidae): Artificial media, oviposition and development. **Korean Journal of Entomology**, v.24, p. 311-6. 1994.
- LEWIS, W.J.; SPARKS, A.N.; REDLINGER, L.M. Moth odor: a method of host-finding by *Trichogramma evanescens*. **Journal of Economic Entomology**, v.64, p. 557-8. 1971.
- LEWIS, W.J.; JONES, R.L.; SPARKS, A.N. A host seeking stimulant for the egg-parasite *Trichogramma evanescens*: its source and a demonstration of its laboratory and field activity. **Annals of the Entomological Society of America**, v.65, p. 1087-9. 1972.
- LEWIS, W.J.; JONES, R.L.; NORDLUND, D.A.; GROSS Jr., H.R. Kairomones and their use for management of entomophagous insects. II. Mechanisms causing increase in rate of parasitization by *Trichogramma* spp. **Journal of Chemical Ecology**, v.1, p. 349-60. 1975.

- LEWIS, W.J.; NORDLUND, D.A.; GUELDNER, R.C.; TEAL, P.E.A.; TUMLINSON, J.H. Kairomones and their use for management of entomophagous insects. XIII. Kairomonal activity for *Trichogramma* spp. of abdominal tips, excretion, and a synthetic sex pheromone blend of *Heliothis zea* (Boddie) moths. **Journal of Chemical Ecology**, v.8, p. 1323-31. 1982.
- LI, L.Y. *Trichogramma* sp. and their utilization in People's Republic of China. **Les Colloques de l'INRA**, v.9, p. 23-9. 1982.
- 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**. Tsukuba. p. 1-5.
- LI, L.Y. *In vitro* rearing of parasitoids of insects pests in China. **Korean Journal of Applied Entomology**, v.31, p. 241-6. 1992.
- 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. **Les Colloques de l'INRA**, v.43, p. 339-52. 1988.
- LIU, W.H. & WU, Z.X. Recent results in rearing *Trichogramma in vitro* with artificial media devoid of insectan additives. **Acta Entomologica Sinica**, v.25, p. 160-3. 1982.
- LIU, W.H.; XIE, Z.N.; XIAO, G.F.; OU YANK, D.H. Rearing of *Trichogramma dendrolimi* in artificial diets. **Acta Phytophylacica Sinica**, v.6, p. 17-24. 1979.
- LU, W.G.; LANG, S. *In vitro* rearing of *Dibrachys cavus* Walker. **Natural Enemies of Insect**, v.3, p. 23-5. 1981.
- 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. 22 p.
- MARSTON, N.; ERTLE, L.R. Host influence on the bionomics of *Trichogramma minutum*. **Annals of the Entomological Society of America**, v.66, p. 1155-62. 1973.
- MARTIN, P.B.; LINGREN, P.D.; GREENE, G.L.; GRISSELL, E.E. The parasitoid complex of three noctuids (Lep.) in a Nothen Florida cropping system: seasonal occurrence, parasitization, alternate hosts, and influence of host-habitat. **Entomophaga**, v.26, p. 401-19. 1981.

- MASUTTI, L.; SLAVAZZA, A.; BATTISTI, A. Oviposition of *Ooencyrtus ptyocampae* (Mercet) into artificial eggs (Hym., Encyrtidae). **Redia**, v.74, p. 457-62. 1991.
- MASUTTI, L.; BATTISTI, A.; MILANI, N.; ZANATA, M. First success in the in vitro rearing of *Ooencyrtus ptyocampae* (Mercet) (Hym. Encyrtidae). Preliminary note. **Redia**, v.75, p. 227-32. 1992.
- MASUTTI, L.; BATTISTI, A.; MILANI, N.; ZANATA, M.; ZANAZZO, G. *In vitro* rearing of *Ooencyrtus ptyocampae* (Mercet) (Hym., Encyrtidae), an egg parasitoid of *Thaumetopoea ptyocampa* (Lep., Thaumetopoeidae). **Entomophaga**, v.38, p. 327-33. 1993.
- McIVER, S.B. Structure of cuticular mechanoreceptors of arthropods. **Annual Review of Entomology**, v.20, p. 381-97. 1975.
- MELLINI, E. Possibilità di allevamento di insetti entomofagi parassiti su diete artificiali. **Bolletino dell Istituto di Entomologia "Guido Grandi" della Università di Bologna**, v.32, p. 257-90. 1975.
- MELLINI, E.; CAMPADELLI, G. Prove di incubazione extrauterine e di schiusa delle uova microtipiche di *Pseudogonia rufifrons* Wied.. **Bolletino dell Istituto di Entomologia "Guido Grandi" della Università di Bologna**, v.43, p. 105-13. 1988.
- MELLINI, E.; CAMPADELLI, G.; DINDO, M.L. Artificial culture of the parasitoid *Exorista larvarum* L. (Dipt. Tachinidae) on bovine serum-based diets. **Bolletino dell Istituto di Entomologia "Guido Grandi" della Università di Bologna**, v.47, p. 223-31. 1993a..
- MELLINI, E.; CAMPADELLI, G.; DINDO, M.L. Artificial culture of the parasitoid *Exorista larvarum* L. (Dipt. Tachinidae) on oligidic media: improvements of techniques. **Bolletino dell Istituto di Entomologia "Guido Grandi" della Università di Bologna**, v.48, p. 1-10. 1993b
- MIMOUNI, F. Genetic variations in host infestation efficiency in two *Trichogramma* species from Marocco. **Redia**, v.74, p. 393-400. 1991.
- MINKENBERG, O.P.J.M.; TATAR, M.; ROSENHEIM, J.A. Egg load as a major source of variability in insect foraging and oviposition behavior. **Oikos**, v.65, p. 134-42. 1992.
- MORRISON, R.K.; LEWIS, W.J. The allocation of searching time by *Trichogramma pretiosum* in host-containing patches. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.30, p. 31-9. 1981.

- MORRISSON, R.K.; NETTLES Jr., W.R.; BALL, D.; VINSON, S.B. Successful oviposition by *Trichogramma pretiosum* through a synthetic membrane. **Southwestern Entomologist**, v.8, p. 248-51. 1983.
- NALIM, D.M. Biologia, nutrição quantitativa e controle de qualidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais. Piracicaba, 1991. 150 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- NENON, J.P. Culture *in vitro* des larves d'un Hyménoptère endoparasite polyembryonnaire: *Agéniaspis fuscicollis*. Role des hormones de synthèse. **C. R. Acad. Sc. Paris, serie D**. 274: 3409-3412, 1972.
- NETTLES, W.C., Jr. Asparagine: A host chemical essential for the growth and development of *Eucelatoria bryani*, a tachinid parasitoid of *Heliothis* spp. **Comprehensive Biochemistry and Physiology**, v.85A, p. 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**, v.15, p. 1111-5. 1986b.
- NETTLES, W.C., Jr.; 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**, v.73, p. 180-4. 1980.
- NETTLES, W.C., Jr.; MORRISON, R.K.; XIE, Z.N.; BALL, D.; SHENKIR, C.A.; VINSON, S.B. Synergistic action of potassium chloride and magnesium sulfate on parasitoid wasp oviposition. **Science**, v.218, p. 164-6. 1982.
- NETTLES, W.C., Jr.; MORRISON, R.K.; XIE, Z.N.; BALL, D.; SHENKIR, C.A.; VINSON, S.B. Effect of cations, anions and salt concentrations on oviposition by *Trichogramma pretiosum* in wax eggs. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.33, p. 283-9. 1983.
- NETTLES, W.C., Jr.; 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**, v.38, p. 121-9. 1985.
- NOLDUS, L.P.J.J. Response of the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* to the sex pheromone of its host *Heliothis zea*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.48, p. 293-300. 1988.

- NOLDUS, L.P.J.J. Chemical espionage by parasitic wasps. Wageningen, 1989. 252 p. PhD. Thesis - Wageningen Agricultural University, Wageningen, Netherlands.
- NOLDUS, L.P.J.J.; van LENTEREN, J.C. Kairomones for the egg parasite *Trichogramma evanescens* Westwood. I. Effect of volatile substances released by two of its hosts, *Pieris brassicae* L. and *Pieris rapae* L.. **Journal of Chemical Ecology**, v.11, p. 781-91. 1985a.
- NOLDUS, L.P.J.J.; van LENTEREN, J.C. Kairomones for the egg parasite *Trichogramma evanescens* Westwood. II. Effect of volatile substances released by two of its hosts, *Pieris brassicae* L. and *Pieris rapae* L.. **Journal of Chemical Ecology**, v.11, p. 793-800. 1985b.
- NOLDUS, L.P.J.J.; LEWIS, W.J.; TUMLINSON, J.H.; van LENTEREN, J.C. Olfactometer and windtunnel experiments on the role of sex pheromone of noctuid moths in the foraging behavior of *Trichogramma* spp. **Les Colloques de l'INRA**, v.43, p. 223-38. 1988a.
- NOLDUS, L.P.J.J.; BUSER, J.H.M.; VET, L.E.M. Volatile semiochemicals in host-community location by egg parasitoids. **Les Colloques de l'INRA**, v.48, p. 19-20. 1988b.
- NORDLUND, D.A. Habitat location by *Trichogramma*. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S.A. ed. **Biological Control with Egg Parasitoids**. Wallingford: CAB International. 1994. p. 155-63.
- NORDLUND, D.A.; CHALFANT, R.B.; LEWIS, W.J. Arthropod populations, yield and damage in monocultures and polycultures of corn, beans and tomatoes. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.11, p. 353-67. 1984.
- NORDLUND, D.A.; CHALFANT, R.B.; LEWIS, W.J. Response of *Trichogramma pretiosum* females to extracts of two plants attacked by *Heliothis zea*. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.12, p. 127-33. 1985a.
- NORDLUND, D.A.; CHALFANT, R.B.; LEWIS, W.J. Response of *Trichogramma pretiosum* females to volatile synomones from tomato plants. **Journal of Entomological Science**, v.20, p. 372-6. 1985b.
- NORDLUND, D.A.; STRAND, M.A.; LEWIS, W.J.; VINSON, S.B. Role of kairomones from host accessory gland secretion in host recognition by *Telenomus remus* and *Trichogramma pretiosum*, with partial characterization. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.44, p. 37-43. 1987.

- OHBAYASHI, T.; IWABUCHI, K.; MITSUHASHI, J. *In vitro* rearing of a larval endoparasitoid, *Venturia canescens* (Gravenhorst) (Hymenoptera: Ichneumonidae). I. Embryonic development. **Applied Entomology and Zoology**, v.29, p. 123-6. 1994.
- OHTA, I.; MIURA, K.; KOBAYASHI, M. Effect of the scale-hair of the common cutworm egg mass on the oviposition behavior of *Trichogramma chilonis* Ishii (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Applied Entomology and Zoology**, v.29, p. 608-9. 1994.
- OLSON, D.M.; ANDOW, D.A. Antennal sensilla of female *Trichogramma nubilale* (Ertle and Davis) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and comparisons with other parasitic Hymenoptera. **International Journal of Insect Morphology & Embryology**, v.22, p. 507-20. 1993.
- PAK, G.A. Selection of *Trichogramma* for inundative biological control. Wageningen, 1988. 224p. PhD. Thesis, Wageningen Agricultural University.
- PAK, G.A.; OATMAN, E.R. Biology of *Trichogramma brevicapillum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.32, p. 61-7. 1982.
- PAK, G.A.; van HALTER, I.; LINDEBOOM, R.; STROET, J.J.G. Ovarian egg supply, female age and plant spacing as factors influencing searching activity in the egg parasite *Trichogramma* sp. **Meded. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent**, v.50, p. 369-78. 1985.
- PAK, G.A.; JONG, E.J. Behavioral variations among strains of *Trichogramma* spp.: host recognition. **Netherlands Journal of Zoology**, v.37, p. 136-66. 1987.
- PARRA, J.R.P. Técnicas de criação de *Anagasta kuehniella*, hospedeiro alternativo para produção de *Trichogramma*. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. eds. **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 121-150.
- PARRA, J.R.P.; CÔNSOLI, F.L. *In vitro* rearing of *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879. **Ciência e Cultura**, v.44, p. 407-9. 1992.
- PARRA, J.R.P.; CÔNSOLI, F.L.; HASSAN, S.A. Effects of the factitious hosts, *Ephesttia kuehniella* and *Sitotrogra cerealella*, on the quality of *Trichogramma pretiosum*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PESTS IN AGRICULTURE, Montpellier, 1997. **Annales**. Montpellier: WPRS IOBC - OILB SROP, 1997. p. 735-740.
- 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**, v.18, p. 403-5. 1989.

- PENNACCHIO, F.; VINSON, S.B.; TREMBLAY, E. Preliminary results on *in vitro* rearing of the endoparasitoid *Cardiochiles nigriceps* from egg to second instar. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.64, p. 209-16. 1992.
- PIMENTEL GOMES, F.; NOGUEIRA, I.R. **Análise matemática**. Piracicaba, 1980. 371p.
- PIZZOL, J. La diapause chez *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera, Trichogrammatidae), ecotype Moldave parasite oophage de la pyrale du maïs. Antibes, 1978. 75p. Diplôme d'Elève titulaire, Station de Zoologie et de Lutte Biologique, I.N.R.A..
- PIZZOL, J.; WAJNBERG, E. Inter-population genetic variation in the walking behavior of *Trichogramma brassicae* females. **Les Colloques l'INRA**, v.73, p. 27-9. 1995.
- PLANTEVIN, G.; DE REGGI, M.; NARDON, C. Changes in ecdysteroid and juvenile hormone titers in the hemolymph of *Galleria mellonella* larvae and pupae. **General and Comparative Endocrinology**, v.56, p. 218-30. 1984.
- PLANTEVIN, G.; BOSQUET, G.; CALVEZ, B.; NARDON, C. Relationships between juvenile hormone levels and synthesis of major haemolymph proteins in *Bombyx mori* larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.86B, p. 501-7. 1987.
- PRELL, H. Zur biologie der tachinen *Parasetigena segregata* Rdi und *Panzeria rudis* Fall. **Zeithischrift angewadte Entomologie**, v.3, p. 57-148. 1915.
- QIN, J.; WU, Z.X. Studies on cultivation of *Trichogramma* in vitro: ovipositional behaviour and larval nutritional requirements of *T. dendrolimi*. **Les Colloques de l'INRA**, v.43, p. 379-87. 1988.
- RABB, R.L.; BRADLEY, J.R. The influence of host plants on parasitism of eggs of the tobacco budworm. **Journal of Economic Entomology**, v.61, p. 1249-52. 1968.
- RAJENDRAM, G.F. Oviposition behavior of *Trichogramma californicum* on artificial substrates. **Annals of the Entomological Society of America**, v.71, p. 92-4. 1978a.
- RAJENDRAM, G.F. Some factors affecting oviposition of *Trichogramma californicum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in artificial media. **The Canadian Entomologist**, v.110, p. 345-52. 1978b.
- RAJENDRAM, G.F.; HAGEN, K.S. *Trichogramma* oviposition into artificial substrates. **Environmental Entomology**, v.3, p. 399-401. 1974.
- REZNIK, S.Ya.; UMAROVA, T.Ya. Host population density influence on host acceptance

in *Trichogramma*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.58, p. 49-54. 1991.

ROSENHEIM, J.A.; ROSEN, D. Foraging and oviposition decisions in the parasitoid *Aphytis lingnanensis*: distinguishing the influence of egg load and experience. **Journal of Animal Ecology**, v.60, p. 873-893. 1991.

ROTUNDO, G.; CAVALLORO, R.; TREMBLAY, E. In vitro rearing of *Lysiphlebus fabarum* (Hym.: Braconidae). **Entomophaga**, v.33, p. 261-7. 1988.

SÁ, L.A.N. de; PARRA, J.R.P. Biology and parasitism of *Trichogramma pretiosum* Riley (Hym., Trichogrammatidae) on *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lep., Pyralidae) and *Heliothis zea* (Boddie) (Lep., Noctuidae) eggs. **Journal of Applied Entomology**, v.118, p. 38-43, 1994.

SAAKYAN-BARANOVA, A.A. Morphological study of preimaginal stages of six species of the genus *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera, Trichogrammatidae). **Entomologicheskoe Obozrenie**, v.69, p. 257-63. 1990. **Apud CAB International, CD-ROM 1989-1992.**

SALT, G. Experimental studies in insect parasitism. III. Host selection. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.117, p. 413-35. 1935.

SALT, G. Experimental studies in insect parasitism. VII. The effects of different hosts on the parasite *Trichogramma evanescens* Westw. (Hym. Chalcidoidea). **Proceedings of the Royal Society of London**, v.15, p. 81-95. 1940.

SCHMIDT, J.M. Host recognition and acceptance by *Trichogramma*. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S.A. ed. **Biological Control with Egg Parasitoids**. Wallingford: CAB International. p. 165-200. 1994.

SCHMIDT, J.M.; SMITH, J.J.B. Host volume measurement by the parasitoid wasp *Trichogramma minutum*: the roles of curvature and surface area. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.39, p. 213-21. 1985a.

SCHMIDT, J.M.; SMITH, J.J.B. The mechanism by which the parasitoid wasp *Trichogramma minutum* responds to host clusters. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.39, p. 287-94. 1985b.

SCHMIDT, J.M.; SMITH, J.J.B. Measurement of host curvature by the parasitoid wasp *Trichogramma minutum*, and its effect on host examination and progenie allocation. **Journal of Experimental Biology**, v.129, p. 151-64. 1987a.

SCHMIDT, J.M.; SMITH, J.J.B. The measurement of exposed host volume by the

parasitoid wasp *Trichogramma minutum* and the effects of wasp size. **Canadian Journal of Zoology**, v.65, p. 2837-45. 1987b.

SCHMIDT, J.M.; PAK, G.A. The effect of temperature on progenie allocation and short interval timing in a parasitoid wasp. **Physiological Entomology**, v.16, p. 345-54. 1991.

SHANNON, R.C. Rearing dipterous larvae on nutrient agar. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v.25, p. 103-4. 1923.

SHU, S.Q.; JONES, R.L. Laboratory studies of the host-seeking behavior of a parasitoid, *Trichogramma mubilale* and a kairomone from its host, *Ostrinia mubilale*. **Les Colloques de l'INRA**, v.43, p. 249-65. 1988.

SINGH, P. & HOUSE, H.L. Antimicrobials: safe levels in a synthetic diet of an insect, *Agria affinis*. **Journal of Insect Physiology**, v.16, p. 1769-82. 1970.

SMITH, E.L. Evolutionary morphology of the external insect genitalia. 2. Hymenoptera. **Annals of the Entomological Society of America**, v.63, p. 1-27. 1970.

SMITH, R.W. Parasites of nymphal and adult grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) in Western Canada. **Canadian Journal of Zoology**, v.36, p. 217-62. 1958.

SNODGRASS, R.E. The sense organs. In: SNODGRASS, R.E. ed. **Principles of Insect Morphology**. New York: McGraw-Hill, 1935. p. 515-25.

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**, v.16, p.229-31. 1987.

STINNER, R.E.; RIDWAY, R.L.; MORRISON, R.K. Longevity, fecundity and searching ability of *Trichogramma pretiosum* reared by three methods. **Environmental Entomology**, v.3, p. 558-60. 1974.

STRAND, M.R.; VINSON, S.B. In vitro culture of *Trichogramma pretiosum* on an artificial medium. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.39, p. 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**, v.46, p. 71-8. 1988.

STOUTHAMER, R.; LUCK, R.F.; HAMILTON, W.D. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) to revert to sexual reproduction.

Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America, v.87, p. 2424-7. 1990.

- STOUTHAMER, R.; WERREN, J.H. Microbes associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.61, p. 6-9. 1993.
- STOUTHAMER, R.; KAZMER, D.J. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. **Heredity**, v.73, p. 317-27. 1994.
- SUZUKI, Y.; TSUJI, H.; SASAKAWA, M. Sex allocation and effects of superparasitism on secondary sex ratios in the gregarious parasitoid, *Trichogramma chilonis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Animal Behaviour**, v.32, p. 478-84. 1984.
- TAKASU, K.; YAGI, S. *In vitro* rearing of the egg parasitoid *Ooencyrtus nezarae* Ishii (Hymenoptera: Encyrtidae). **Applied Entomology and Zoology**, v.27, p. 171-3. 1992.
- THOMPSON, S.N. Aspects of amino acid metabolism and nutrition in the ectoparasitoid wasp, *Exeristes roborator*. **Journal of Insect Physiology**, v.20, p. 1515-28. 1974.
- 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**, v.68, p. 220-6. 1975.
- THOMPSON, S.N. The amino acid requirements for larval development of the hymenopterous parasitoid *Exeristes roborator*. **Annals of the Entomological Society of America**, v.69, p. 835-8. 1976.
- THOMPSON, S.N. Lipid nutrition during larval development of the parasitic wasp, *Exeristes roborator*. **Journal of Insect Physiology**, v.23, p. 579-83. 1977.
- THOMPSON, S.N. The effects of dietary carbohydrate on larval development and lipogenesis in the parasite, *Exeristes roborator* (Fabricius) (Hymenoptera: Ichneumonidae). **Journal of Parasitology**, v.65, p. 849-54. 1979.
- THOMPSON, S.N. Artificial culture techniques for rearing larvae of the chalcidoid parasite, *Brachymeria intermedia*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.27, p. 133-43. 1980.
- THOMPSON, S.N. Essential amino-acid requirements of four species of parasitic hymenoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.69A, p. 173-4. 1981a.

- THOMPSON, S.N. *Brachymeria lasus*: culture in vitro of a chalcid insect parasite. **Experimental Parasitology**, v.52, p. 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**, v.54, p. 229-34. 1982.
- THOMPSON, S.N. Larval growth of the insect parasite *Brachymeria lasus* reared in vitro. **Journal of Parasitology**, v.69, p. 425-7. 1983.
- THOMPSON, S.N. Nutrition and in vitro culture of insect parasitoids. **Annual Review of Entomology**, v.31, p. 197-219. 1986.
- THOMPSON, S.N.; BEDNAR, L.; NADEL, H. Artificial culture of the insect parasite, *Pachycrepoideus vindemiae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.33, p. 121-2. 1983.
- THOMSON, M.S.; STINNER, R.E. The scale response of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): variation among species in host specificity and the effect of conditioning. **Entomophaga**, v.35, p. 7-21. 1990.
- 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**, v.81, p. 152-6. 1988.
- TREACY, M.F.; BENEDICT, J.H.; SEGERS, J.C.; MORRISON, R.K.; LOPEZ, J.D. Role of cotton trichome density in bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) egg parasitism. **Environmental Entomology**, v.15, p. 365-8. 1986.
- VEEN, J.C. VAN & WIJK, M.L.E. VAN The unique structure and functions of the ovipositor of the non-paralyzing ectoparasitoid *Colpoclypeus florus* Walk. [Hym.: Eulophidae] with special reference to antennal sensilla and immature stages. **J. appl. Entomol.**, 99: 511-531, 1985.
- VINSON, S.B. Host selection by insect parasitoids. **Annual Review of Entomology**, v.21, p. 109-34. 1976.
- VINSON, S.B. Parasitoid-host relationship. In: BELL, W.J. & CARDÉ, R.T., (eds). **Chemical Ecology of Insect**. New York, Chapman & Hall Ltd., 1984. p. 205-233.
- VOEGELÉ, J.; CALS-USCIATI, J.; PIHAN, J.P.; DAUMAL, J. Structure de l'antenne des Trichogrammes. **Entomophaga**, 20: 161-169, 1975.

- VÖLKL, W.; MACKAUER, M. Age-specific pattern of host discrimination by the aphid parasitoid *Ephedrus californicus* Baker (Hymenoptera: Aphidiidae). **Canadian Entomologist**, v.122, p.349-361. 1990.
- VOLKOFF, A.N.; DAUMAL, J. Ovarian cycle in immature and adult stages of *Trichogramma cacoeciae* and *T. brassicae* (Hym.: Trichogrammatidae). **Entomophaga**, v.39, p. 303-12. 1994.
- VOLKOFF, A.N.; VINSON, S.B.; WU, Z.X.; NETTLES Jr., W.C. In vitro rearing of *Trissolcus basalus* [Hym., Scelionidae] an egg parasitoid of *Nezara viridula* [Hem., Pentatomidae]. **Entomophaga**, 37: 141-148, 1992.
- VOLKOFF, A.N.; DAUMAL, J.; BARRY, P.; FRANÇOIS, M.C.; HAWLITZKY, N.; ROSSI, M.M. Development of *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae): Time table and evidence for a single larval instar. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v.24, p. 459-66. 1995.
- WAJNBERG, E. Inter-population genetic variation in *Trichogramma*. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S.A. (eds.) **Biological Control with Egg parasitoids**. Wallingford: CAB International. 1994. p. 245-271.
- WATANABE, M.; MITSUHASHI, J. In vitro rearing of an endoparasitic fly, *Exorista sorbillans* (Diptera: Tachinidae). **Applied Entomology and Zoology**, v.30, p. 319-25. 1995. **Apud**: Abstracts of Entomology, v.26, n.9, p. 213. 1996.
- WERREN, J.H. Biology of *Wolbachia*. **Annual Review of Entomology**, v.42, p. 587-609. 1997.
- WU, Z.X.; QIN, J.D. Ovipositional response of *Trichogramma dendrolimi* to the chemical contents of artificial eggs. **Acta Entomologica Sinica**, v.25, p. 363-71. 1982.
- XIE, Z.N.; NETTLES Jr., W.C.; MORRISON, R.K.; IRIE, K.; VINSON, S.B. Three methods for the in vitro culture of *Trichogramma pretiosum* Riley. **Journal of Entomological Science**, v.21, p. 133-8. 1986a.
- XIE, Z.N.; NETTLES Jr., W.C.; MORRISON, R.K.; IRIE, K.; VINSON, S.B. Effect of oviposition stimulants and diets on the growth and development of *Trichogramma pretiosum* in vitro. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.42, p. 119-24. 1986b.
- XIE, Z.N.; LI, L.; XIE, Y. In vitro culture of *Habrobracon hebetor* (Say) (Hym.: Braconidae). **Chinese Journal of Biological Control**, v.5, p. 49-51. 1989.

- XIE, Z.N.; NETTLES Jr., W.C.; SALDAÑA, G.; NORDLUND, D.A. Elmer's glue school and Elmer's glue all: arrestants and probing/oviposition enhancers for *Trichogramma* spp. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.82, p. 115-8. 1997.
- YAGI, S.; SHINBO, H.; NAKAMURA, S. *In vitro* rearing of parasitoids. In INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 20., Firenze, 1996. **Proceedings**. Firenze, Italy, 1996. p. 615.
- YAZGAN, S. A chemically defined synthetic diet and larval nutritional requirements of the endoparasitoid *Itopectis conquisitor* (Hymenoptera). **Journal of Insect Physiology**, v.18, p. 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**, v.91, p. 433-41. 1981.
- YAZGAN, S.; HOUSE, H.L. An hymenopterous insect, the parasitoid *Itopectis conquisitor* reared axenically on a chemically defined synthetic diet. **Canadian Entomologist**, v.102, p. 1304-6. 1970.
- YAZLOVETSKY, I.G. Development of artificial diets for entomophagous insects by understanding their nutrition and digestion. In ANDERSON, T.E.; LEPPLA, N.C. ed. **Advances in Insect Rearing for Research & Pest Management**. San Francisco: Westview Press. 1992. p. 41-62
- YAZLOVETSKY, I.G.; NEPOMNYASHAYA, A.M.; AGEEWA, L.I. Attempts to rear *in vitro* the ectoparasite *Elasmus albipennis* Thompson (Chalcidoidea: Elasmidae). In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 19., BEIJING, 1992. **Proceedings**. Beijing, 1992. p. 341.
- ZABORSKI, E.; TEAL, P.E.A; LAING, J.E. Kairomone-mediated host-finding by spruce budworm egg parasite, *Trichogramma minutum*. **Journal of Chemical Ecology**, v.3, p. 113-22. 1987.
- ZACHARUK, R. Ultrastructure and function of insect chemosensilla. **Annual Review of Entomology**, v.25, p. 27-47. 1980.
- ZHONG, L.S. & ZHANG, J.L. Influence of diet pH on the development and efficacy of reproduction of *Trichogramma confusum* (Hym.: Trichogrammatidae) in artificial rearings. **Chinese Journal of Biological Control**, v.5, p. 101-3. 1989. **Apud**: Review of Agricultural Entomology, 078-07508, 1990.
- ZUCCHI, R.A.; MONTEIRO, R.C. O gênero *Trichogramma* na América do Sul. In:

PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A., eds. *Trichogramma* e o controle biológico aplicado. Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 41-66.