

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**MAGDA FERNANDA PAIXÃO**

**VIABILIDADE DO USO DE OVOS DE *Mythimna sequax* (FRANCLEMONT, 1951)  
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER (LEPIDOPTERA:  
EREBIDAE) ESTOCADOS EM NITROGÊNIO LÍQUIDO PARA A PRODUÇÃO  
MASSAL DE *Trichogramma* WESTWOOD (HYMENOPTERA:  
TRICHOGRAMMATIDAE)**

**CURITIBA**

**2016**

**MAGDA FERNANDA PAIXÃO**

**VIABILIDADE DO USO DE OVOS DE *Mythimna sequax* (FRANCLEMONT, 1951)  
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER (LEPIDOPTERA:  
EREBIDAE) ESTOCADOS EM NITROGÊNIO LÍQUIDO PARA A PRODUÇÃO  
MASSAL DE *Trichogramma* WESTWOOD (HYMENOPTERA:  
TRICHOGRAMMATIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências.

**Orientador:** Prof. Dr. Luís Amilton Foerster  
**Co-orientadora:** Prof. Dra. Marion do Rocio Foerster

**CURITIBA  
2016**

P149 Paixão, Magda Fernanda

Viabilidade do uso de ovos de *Mythimna sequax* (Franclemont, 1951) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae) estocados em nitrogênio líquido para a produção massal de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Magda Fernanda Paixão. / Curitiba: 2016.

115 f. il.

Orientador: Luís Amilton Foerster

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná.  
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação  
em Agronomia.

1. Parasitoides de ovos. 2. *Anticarsia gemmatalis*.  
3. *Trichogramma*. I. Foerster, Luís Amilton. II. Universidade  
Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de  
Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 591.557.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL

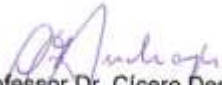


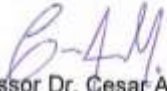
## PARECER


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO, apresentada pela candidata **MAGDA FERNANDA PAIXÃO**, sob o título "VIABILIDADE DE OVOS DE *Mythimna sequax* (Franclemont, 1951) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E *Anticarsia gemmatalis* Hübner (LEPIDOPTERA: EREBIDAE) ESTOCADOS EM NITROGÊNIO LÍQUIDO AO PARASITISMO POR ESPÉCIES DE *Trichogramma* Westwood (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)", para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

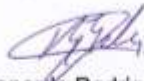
Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata são de parecer pela "APROVAÇÃO" da Tese.

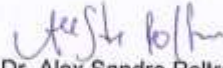
Curitiba, 11 de Março de 2016.

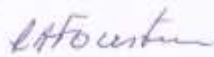
  
Professor Dr. Cícero Deschamps  
Coordenador do Programa

  
Professor Dr. Cesar Augusto Marchioro  
Primeiro Examinador

  
Dr. Bruno Alexis Zachrisson Salamina  
Segundo Examinador

  
Dr. Leonardo Rodrigues Barbosa  
Terceiro Examinador

  
Professor Dr. Alex Sandro Poltronieri  
Quarto Examinador

  
Professor Dr. Luis Amilton Foerster  
Presidente da Banca e Orientador

DEDICO

*À minha querida Tia Marlene (In memoriam) que foi uma das responsáveis por eu ter chegado até aqui. Por todo o carinho, dedicação, apoio e incentivos constantes, por ser o meu exemplo de vida, meu porto seguro e por seu amor incondicional.*

*Te amarei eternamente!*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Dr. Luís Amilton Foerster, o qual tenho um imenso carinho e profunda admiração, pela orientação, atenção, apoio, profissionalismo, seriedade e pelos ensinamentos que levarei por toda a minha vida.

À minha co-orientadora e amiga Professora Dra Marion do Rocio Foerster por toda a participação e contribuição no trabalho, mas acima de tudo pelo carinho, companheirismo, amizade, apoio constante e pela convivência alegre durante todo o período.

Ao Curso de Pós Graduação em Agronomia – Produção Vegetal da Universidade Federal do Paraná por me proporcionar a oportunidade da realização do curso de doutorado contribuindo para o meu crescimento profissional.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante todo o período do curso.

Aos membros da banca de pré-defesa Dr. Alex Poltronieri, Dr. César Augusto Marchioro e Dra Susete Chiarello Penteadó pelas valiosas contribuições na redação da tese.

Aos professores da disciplina de Entomologia Agrícola Dr. Germano Rosado e Dra. Maria Cristina pelo carinho, atenção, pela convivência no laboratório, pelas conversas agradáveis e incentivos.

À Vânia Foerster pelo carinho, bom humor e por tornar as confraternizações do nosso laboratório sempre alegres e especiais.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Agronomia Produção Vegetal: Dr. Cícero Deschamps, Dr. Flavio Zanette, Dr. Henrique Koehler, Dra. Katia Zufellato, Dra. Louise Larissa May de Mio, Dr. Luiz Antonio Biasi, Dr. Ricardo e do curso de Pós-graduação em Entomologia: Dr. Antonio Panizzi, Dr. Daniel Sosa-Gómez e Dr. Gilson Moreira, por compartilharem as suas experiências de forma agradável e interessante, por sempre estarem disponíveis, pelos momentos de convivência e aprimoramento dos meus conhecimentos.

Aos professores do Departamento de Zoologia da UFPR: Dr. Mario Navarro, pela atenção, por disponibilizar a estrutura do seu laboratório para auxílio nas nossas pesquisas; à Dra Mirna Casagrande pela simpatia, atenção e orientação em assuntos sobre o Gênero *Mythimna*.

À professora Dra. Maria Aparecida Zawadneak do departamento de Parasitologia da UFPR pela atenção, carinho e por acreditar na minha capacidade, sempre me convidando para participação em bancas e palestras.

Ao professor Dr. Guilherme Sasaki do Laboratório de Química de Carboidratos por toda orientação e contribuição no desenvolvimento de parte da minha tese, por ter disponibilizado toda a estrutura de seu laboratório. À sua equipe de laboratório Adriana, Alex, Arquimedes, Lauro, André, Adamara e Iglesia por serem sempre atenciosos e por me fazerem sentir como se fizesse parte da sua equipe. Especialmente a Adriana pela amizade e grande contribuição no trabalho, auxiliando no preparo das amostras, me ensinando a usar os equipamentos e me tirando todas as dúvidas em relação aos protocolos de experimentos.

Ao professor Edvaldo Trindade do Laboratório de Biologia Celular, pela atenção e por disponibilizar a estrutura do seu laboratório. À doutoranda Stellee Biscaia e ao mestrando Daniel de Lima Bellan pela grande colaboração na condução dos experimentos com crioprotetores.

A secretária do curso de pós-graduação Lucimara Antunes pela amizade, carinho e atenção, por ser atenciosa e estar sempre pronta para ajudar no que fosse necessário.

Aos funcionários do Depto de Zoologia, Denise e Jefferson, por serem sempre prestativos, atenciosos e divertidos. À Carla, Divina e Vicentina, por serem sempre atenciosas e pela colaboração na limpeza do nosso laboratório.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica: Vera, Rosângela e Luiz pela atenção e auxílio no preparo e leitura das amostras.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná por sempre disponibilizar a sua estrutura para coleta e levantamentos de insetos-praga.

Ao Prof. Dr. Luiz Kozlowski da Pontifícia Universidade Católica (PUC) por ceder a área para levantamento de lepidópteros-praga e liberações de parasitoides.

Ao Dr. Aldo Malavasi e Dr. Jair Virginio juntamente com toda equipe da Moscamed Brasil, em especial, a Maylen, Carla, Danilo, Jacira, Dna Sandra, Ícara, Nilton, Miriam e Aline pelo apoio, hospitalidade, aprendizados e pelos momentos alegres de convivência durante o período de treinamento na Biofábrica.

À Dra. Beatriz Paranhos da Embrapa de Petrolina e a sua equipe de laboratório pelo apoio, orientação, atenção e amizade no período em que estive realizando treinamento com produção massal de parasitoides.

Aos colegas do Laboratório de Controle Integrado de Pragas com quem tive o prazer de conviver durante o período do curso: Adélia, Aline Borba, Aline Yoshie, Amanda, Angélica, Angelo, Carla, Diones, Flavia, Jéssica, Karen, Laura, Leo Riegler, Marilise, Milena, Scheila, Tamara, Tiago, Vanessa, por toda a contribuição na criação dos insetos, auxílio nos experimentos, troca de conhecimentos, amizade e cumplicidade. A contribuição de alguns

membros dessa equipe maravilhosa, especialmente a Tamara, foi imprescindível para o desenvolvimento da tese.

Aos meus orientadores prof. Nilceu R. X. Nazareno (graduação) e prof. Lino B. Monteiro (mestrado) o meu mais sincero agradecimento pelas grandes contribuições, orientações e pelos ensinamentos proporcionados durante todo o período de convivência.

Aos colegas do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas: Débora, Edson, José, Maicon, Marcel, Rafael, Rosângela e Valéria pela amizade, momentos alegres e colaboração nos levamentos de campo realizados no primeiro ano de doutorado.

Aos colegas de pós-graduação Ana Claudia, Ana Paula Andreazza, Eduardo, Gabriel, Gabriela, Guilherme, Giselda, Hagata, Jeidy, Ligia, Luciane, Luiz, Lury, Marcele, Marcos, Mariana, Michele, Mirele, Priscila, Rafaela, Regiane e Salise pelo convívio, conversas descontraídas e troca de experiências durante o período de doutorado.

Aos meus pais José, Santa e Leonor por toda a educação recebida, pelo carinho, compreensão, apoio nas horas difíceis e incentivos durante todos os anos de minha vida.

Ao meu marido e melhor amigo José Lino, por estar presente em todos os momentos alegres e difíceis, por sempre estar disponível para me ajudar, pelo amor, amizade, cumplicidade e por me proporcionar momentos felizes. Seu apoio foi essencial para o desenvolvimento desta tese.

À todos os meus familiares e amigos pelo apoio, amizade, carinho, incentivos, orações, por sempre poder contar com eles e por tornarem meus dias mais felizes.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento.



## RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar a viabilidade da estocagem de ovos de *Mythimna sequax* em nitrogênio líquido visando a produção massal de *Trichogramma*. A tese foi dividida em quatro capítulos, sendo o primeiro destinado à realização de estudos de base visando incrementar os índices de parasitismo e emergência de *Trichogramma* em ovos de *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido. Foram avaliadas a influência da densidade de fêmeas de *Trichogramma pretiosum* no parasitismo de ovos estocados por 15 dias e o desempenho de fêmeas criadas em ovos estocados durante três gerações e comparadas com fêmeas criadas em ovos não estocados, a fim de verificar a necessidade de manter uma linhagem de *Trichogramma* criada em ovos estocados. No segundo capítulo, foi estudado a influência de ovos de *M. sequax*, tratados com crioprotetores antes do congelamento em nitrogênio líquido e ofertados ao parasitismo por *T. pretiosum*. Os ovos foram tratados com dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, sacarose, etilenoglicol e leite desnatado para criopreservação. O parasitismo destes ovos foi comparado com ovos não tratados estocados e não estocados. No terceiro capítulo, avaliou-se a capacidade reprodutiva de *Trichogramma atopovirilia*, *Trichogramma exiguum*, *Trichogramma galloi* e *T. pretiosum* em ovos de *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido para determinar as espécies que apresentam melhor aceitação dos ovos estocados em nitrogênio líquido. Enquanto que no quarto capítulo, foram comparados os índices de parasitismo e emergência de *T. pretiosum* em ovos de *Anticarsia gemmatalis* e *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido. Posteriormente foram determinados e quantificados por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) os metabólitos trealose, fosfocolina e maltodextrina presentes nos ovos desses dois hospedeiros. Após esses experimentos foram avaliadas a influência do tempo de estocagem (um, três, seis, nove e 12 meses) de ovos de *M. sequax* em nitrogênio líquido no parasitismo por *T. atopovirilia* e *T. pretiosum*. Com base nesses estudos verificou-se que a densidade ideal para os experimentos com *T. pretiosum* foi de uma fêmea para dez ovos; e que não há necessidade de manter uma linhagem de *Trichogramma* a partir de ovos estocados, pois não houve diferença nos parâmetros biológicos. Não há necessidade da adição de crioprotetores antes da estocagem dos ovos, uma vez que os maiores índices de parasitismo foram obtidos em ovos sem tratamento prévio. As espécies que mais se destacaram no parasitismo de ovos estocados foram *T. atopovirilia* e *T. pretiosum*. Ovos de *A. gemmatalis* não são viáveis à estocagem em nitrogênio líquido e apresentaram menor quantidade de trealose e maltodextrina do que os ovos de *M. sequax*, sendo que estes foram viáveis para estocagem em nitrogênio líquido por até 12 meses sem afetar os parâmetros biológicos das espécies de *Trichogramma* avaliadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** estocagem de ovos, temperaturas ultrabaixas, parasitoides de ovos

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the viability of *Mythimna sequax* stored eggs in liquid nitrogen for the mass production of *Trichogramma*. The thesis was divided into four chapters, the first for the performing baseline studies to increase the parasitism and emergence of *Trichogramma* on *M. sequax* eggs stored in liquid nitrogen. The influence of the density of *Trichogramma pretiosum* females on parasitism of eggs stored for 15 days was evaluated. The performance of females reared for three generations on stored eggs was compared to females reared on non-stored eggs, to identify possible alterations in the parasitism capacity of stored produced adults in relation to non-stored ones. In the second chapter, has studied the influence of *M. sequax* eggs treated with cryoprotectants before freezing in liquid nitrogen and offered to parasitism by *T. pretiosum*. The eggs were treated with dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol, sucrose, ethylene glycol and skim milk for cryopreservation. The parasitism of the eggs was compared to eggs untreated stored and non- stored. In the third chapter, we evaluated the reproductive capacity of *Trichogramma atopovirilia*, *Trichogramma exiguum*, *Trichogramma galloi* and *T. pretiosum* from eggs of *M. sequax* stored in liquid nitrogen to determine the species with better acceptance of eggs stored in liquid nitrogen. In the fourth chapter the parasitism and emergence of *T. pretiosum* was compared on *Anticarsia gemmatalis* and *M. sequax* eggs stored in liquid nitrogen. After The trehalose metabolites, phosphocholine and maltodetrina present in eggs of these two hosts were determined and quantified by means of nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). After these experiments were evaluated the influence of storage time (one, three, six, nine and 12 months) of *M. sequax* eggs in liquid nitrogen in parasitism by *T. atopovirilia* and *T. pretiosum*. Based on these studies it was found that the ideal density for the experiments with *T. pretiosum* was a female per ten eggs; and there is no need to maintain a *Trichogramma* strain from eggs stored because there was no difference in biological parameters. There is no need for the addition of cryoprotectant prior to storage of eggs, since the larger parasitism were obtained from untreated eggs. The species that stood out in the parasitism of stored eggs were *T. atopovirilia* and *T. pretiosum*. *Anticarsia gemmatalis* eggs are not viable for storage in liquid nitrogen and had lower amount of trehalose and maltodextrin than the *M. sequax* eggs, and these were viable for storage in liquid nitrogen for up to 12 months without affecting the biological parameters of assessed species of *Trichogramma*.

**KEYWORDS:** stored eggs, ultralows temperatures, parasitoid eggs

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1 ASPECTOS GERAIS.....	19
2.2 DESEMPENHO DE <i>Trichogramma</i> EM FUNÇÃO DO TAMANHO DO HOSPEDEIRO.....	20
2.3 PRODUÇÃO DE <i>Trichogramma</i> EM OVOS DE <i>Mythimna sequax</i> .....	21
2.4 MÉTODOS DE ESTOCAGEM EM BAIXAS TEMPERATURAS.....	22
2.4.1 Estocagem em refrigerador.....	23
2.4.2 Estocagem em freezer.....	24
2.4.3 Estocagem em nitrogênio líquido.....	25
2.5 TOLERÂNCIA DOS OVOS AO CONGELAMENTO.....	27
<b>3. CAPÍTULO I – BASES PARA A APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE CRIOPRESERVAÇÃO EM OVOS DE <i>Mythimna sequax</i> (FRANCLEMONT, 1951) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) PARA A PRODUÇÃO DE <i>Trichogramma</i> spp. WESTWOOD .....</b>	<b>28</b>
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	29
3.1 INTRODUÇÃO.....	30
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	31
3.2.1 Criação de insetos.....	31
3.2.2 Estocagem de ovos.....	32
3.2.3 Influência do número de fêmeas de <i>T. pretiosum</i> no parasitismo de ovos estocados.....	32

3.2.4 Parasitismo por fêmeas de <i>T. pretiosum</i> criadas em ovos estocados por três gerações.....	32
3.2.5 Parâmetros avaliados e análise estatística.....	33
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
3.3.1 Influência do número de fêmeas de <i>T. pretiosum</i> no parasitismo de ovos estocados.....	33
3.3.2 Parasitismo por fêmeas de <i>T. pretiosum</i> criadas em ovos estocados por três gerações.....	37
3.4 CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS.....	40
<b>4. CAPÍTULO II – USO DE CRIOPROTETORES NO ARMAZENAMENTO DE OVOS DE <i>Mythimna sequax</i> (FRANCLEMONT, 1951) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM NITROGÊNIO LÍQUIDO VISANDO À PRODUÇÃO DE <i>Trichogramma</i> WESTWOOD.....</b>	<b>44</b>
RESUMO.....	44
ABSTRACT.....	45
4.1 INTRODUÇÃO.....	46
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	47
4.2.1 Criação de insetos.....	47
4.2.2 Congelamento e descongelamento dos ovos.....	48
4.2.3 Efeito da aplicação de dimetilsulfóxido – DMSO e glicerol no armazenamento de ovos de <i>M. sequax</i> em nitrogênio líquido.....	48
4.2.4 Efeito da aplicação de sacarose no armazenamento de ovos de <i>M. sequax</i> em nitrogênio líquido.....	49
4.2.5 Efeito da aplicação de etilenoglicol e leite desnatado no congelamento dos ovos de <i>M. sequax</i> em nitrogênio líquido.....	49
4.2.6 Parâmetros avaliados e análise estatística.....	51
4.3 RESULTADOS.....	51
4.3.1 Efeito da aplicação de dimetilsulfóxido – DMSO e glicerol no armazenamento de ovos de <i>M. sequax</i> em nitrogênio líquido.....	51
4.3.2 Efeito da aplicação de sacarose no armazenamento de ovos de <i>M. sequax</i> em nitrogênio líquido.....	53

4.3.3 Efeito da aplicação de etilenoglicol e leite desnatado no congelamento dos ovos de <i>M. sequax</i> em nitrogênio líquido.....	54
4.4 DISCUSSÃO .....	55
4.5 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
<b>5. CAPÍTULO III – CAPACIDADE REPRODUTIVA E DESENVOLVIMENTO DE QUATRO ESPÉCIES DE <i>Trichogramma</i> WESTWOOD (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE) EM OVOS DE <i>Mythimna sequax</i> (FRANCLEMONT, 1951) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) ESTOCADOS EM NITROGÊNIO LÍQUIDO.....</b>	<b>61</b>
RESUMO.....	61
ABSTRACT.....	62
5.1 INTRODUÇÃO.....	63
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	65
5.2.1 Manutenção dos insetos.....	65
5.2.2 Estocagem de ovos .....	65
5.2.3 Desenvolvimento e emergência.....	65
5.2.4 Capacidade de parasitismo e longevidade das progênes.....	66
5.2.5 Análise estatística.....	66
5.3 RESULTADOS.....	66
5.3.1 Desenvolvimento e emergência.....	66
5.4 DISCUSSÃO.....	70
REFERÊNCIAS.....	72
<b>6. CAPÍTULO IV – UM NOVO PASSO NA PRODUÇÃO DE <i>Trichogramma</i> WESTWOOD: CRIOPRESERVAÇÃO DE OVOS DE <i>Mythimna sequax</i> (FRANCLEMONT, 1951) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) POR LONGOS PERÍODOS.....</b>	<b>78</b>
RESUMO.....	78
ABSTRACT.....	79
6.1 INTRODUÇÃO.....	80
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	82

6.2.1 Criação de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	82
6.2.2 Criação de <i>Mythimna sequax</i> .....	82
6.2.3 Criação de <i>Trichogramma</i> .....	82
6.2.4 Parasitismo de ovos de <i>A. gemmatalis</i> e <i>M. sequax</i> por <i>T. pretiosum</i> .....	83
6.2.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear – RMN.....	83
6.2.6 Parasitismo em ovos de <i>M. sequax</i> estocados por diferentes períodos.....	84
6.2.7 Capacidade de parasitismo e longevidade de progênies obtidas de ovos estocados por nove e 12 meses.....	85
6.2.8 Análise estatística .....	85
6.3 RESULTADOS.....	86
6.3.1 Parasitismo em ovos criopreservados de <i>A. gemmatalis</i> e <i>M. sequax</i> por <i>T. pretiosum</i> .....	86
6.3.2 Espectroscopia de RMN.....	87
6.3.3 Parasitismo de ovos de <i>Mythimna sequax</i> estocados por diferentes períodos.....	88
6.3.4 Capacidade de parasitismo e longevidade das progênies.....	91
6.4 DISCUSSÃO.....	92
6.5 CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS.....	96
<b>7. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>101</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>103</b>

## LISTA DE FIGURAS

### 3 Capítulo I

#### **Bases para a aplicação da técnica de criopreservação em ovos de *Mythimna sequax* (Franclemont, 1951) (Lepidoptera: Noctuidae) para a produção de *Trichogramma* spp. Westwood**

FIGURA 1 - Média ( $\pm$  EP) da porcentagem de parasitismo por *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido e ovos não estocados, parasitados por diferentes números de fêmeas. Barras com letras maiúsculas iguais que representam ovos estocados e minúsculas que representam ovos não estocados, não diferem entre as densidades de fêmeas pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ). Asteriscos indicam significância entre ovos estocados e não estocados para cada densidade de fêmeas pelo teste Mann-Whitney ( $P < 0,05$ )..... 34

FIGURA 2 - Porcentagem média ( $\pm$  EP) de emergência de adultos de *Trichogramma pretiosum* a partir de ovos de *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido por 15 dias e ovos não estocados, parasitados por diferentes números de fêmeas. Barra com letras maiúsculas iguais que representam ovos estocados e minúsculas que representam ovos não estocados, não diferem entre as densidades de fêmeas pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ). Asteriscos indicam significância entre ovos estocados e não estocados para cada densidade de fêmeas pelo teste t – Student e Mann-Whitney ( $P < 0,05$ )..... 35

### 4 Capítulo II

#### **Uso de crioprotetores no armazenamento de ovos de *Mythimna sequax* (Franclemont, 1951) (Lepidoptera: Noctuidae) em nitrogênio líquido visando à produção de *Trichogramma* Westwood**

FIGURA 1 - Ovos de *Mythimna sequax* tratados com crioprotetores dimetilsulfóxido e glicerol submetidos ao congelamento gradual (A), congelamento rápido (B) e ovos submetidos ao congelamento rápido sem adição de crioprotetor (C)..... 53

FIGURA 2 - Ovos de *M. sequax* tratados com etilenoglicol, leite desnatado e ovos não tratados recém tirados do nitrogênio líquido (A, B e C) e ovos 2 h após o descongelamento (D, E e F)..... 55

### 5 Capítulo III

#### **Capacidade reprodutiva e desenvolvimento de quatro espécies de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *Mythimna sequax* (Franclemont, 1951) (Lepidoptera: Noctuidae) estocados em nitrogênio líquido**

FIGURA 1 - Porcentagem média ( $\pm$  EP) de parasitismo e emergência de adultos das espécies de *Trichogramma* em ovos de *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido por 30 dias e ovos não estocados. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si na comparação de ovos estocados e não estocados em cada espécie pelo teste t- Student e Mann-Whitney ( $P < 0,05$ )..... 67

FIGURA 2 - Médias ( $\pm$  EP) da porcentagens de ovos de *Mythimna sequax* parasitados por progenies de espécies de *Trichogramma* provenientes de ovos estocados e não estocados durante quatro dias consecutivos ( $n = 80$ ). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si para cada espécie pelo teste t-Student ( $P < 0,05$ )..... 69

### 6 Capítulo IV

#### **Um novo passo na produção de *Trichogramma* Westwood: Criopreservação de ovos de *Mythimna sequax* (Franclemont, 1951) (Lepidoptera: Noctuidae) por longos períodos**

FIGURA 1 - Médias ( $\pm$  EP) da porcentagem de parasitismo por *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Anticarsia gemmatalis* e *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido por 30 dias e não estocados. ( $n = 80$ ). Letras maiúsculas comparam as espécies e minúsculas representam a significância no parasitismo de ovos estocados e não estocados por espécie pelo teste  $t$  – Student e Mann-Whitney ( $P < 0,05$ )..... 86



FIGURA 2 - Médias ( $\pm$  EP) da porcentagem de adultos emergidos de *Trichogramma pretiosum* a partir de ovos de *Anticarsia gemmatalis* e *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido por 30 dias e não estocados. ( $n= 80$ ). Letras maiúsculas representam a significância entre os hospedeiros e minúsculas comparam a emergência em ovos estocados e não estocados por espécie pelo teste  $t$  – Student ( $P < 0,05$ )..... 87

FIGURA 3 - Médias ( $\pm$  EP) das porcentagens de parasitismo de *Trichogramma atopovirilia* e *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido em ovos não estocados e por um, três, seis, nove e 12 meses. ( $n= 240$ ). Letras maiúsculas comparam o parasitismo por *T. atopovirilia* e letras minúsculas por *T. pretiosum* pelo teste de Kruskal- Wallis ( $P < 0,05$ ). Os asteriscos indicam significância entre as espécies em cada período de armazenamento dos ovos..... 88

FIGURA 4 - Médias ( $\pm$  EP) da porcentagem de emergência de *Trichogramma atopovirilia* e *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido em ovos não estocados e por um, três, seis, nove e 12 meses. ( $n= 240$ ). Letras maiúsculas comparam a emergência de *T. atopovirilia* e letras minúsculas de *T. pretiosum* pelo teste de Kruskal- Wallis ( $P < 0,05$ ). Os asteriscos indicam significância entre as espécies em cada período de armazenamento dos ovos..... 89

## LISTA DE TABELAS

### 3 Capítulo I

#### **Bases para a aplicação da técnica de criopreservação em ovos de *Mythimna sequax* (Franclemont, 1951) (Lepidoptera: Noctuidae) para a produção de *Trichogramma* spp. Westwood**

TABELA 1 - Médias ( $\pm$  EP) da razão sexual e tempo de desenvolvimento (ovo-adulto) de *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido por 15 dias e não estocados, parasitados por diferentes números de fêmeas ( $n= 120$ )..... 36

TABELA 2 - Médias ( $\pm$  EP) de parasitismo e emergência de *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido por 30 dias e ovos não estocados parasitados por fêmeas criadas durante três gerações em ovos de *Mythimna sequax* armazenados em nitrogênio líquido e ovos não armazenados (controle). ( $n= 80$ )..... 38

TABELA 3 - Médias ( $\pm$  EP) da razão sexual e do tempo de desenvolvimento (ovo-adulto) de *T. pretiosum* em ovos de *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido por 30 dias, parasitados por fêmeas criadas em ovos estocados em nitrogênio líquido e não estocados ( $n= 80$ ) ..... 39

### 4 Capítulo II

#### **Uso de crioprotetores no armazenamento de ovos de *Mythimna sequax* (Franclemont, 1951) (Lepidoptera: Noctuidae) em nitrogênio líquido visando à produção de *Trichogramma* Westwood**

TABELA 1 - Médias ( $\pm$  EP) da porcentagem de parasitismo, emergência e tempo de desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Mythimna sequax* tratados com diferentes concentrações de dimetilsulfóxido - DMSO e glicerol, estocados em nitrogênio líquido por dois diferentes métodos: congelamento

gradual e rápido durante 15 dias. ( $n=320$ ). ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ;  $70\pm 10\%$  de umidade relativa e 12L: 12D de fotoperíodo)..... 52

TABELA 2 - Médias ( $\pm$  EP) da porcentagem de parasitismo, emergência e tempo de desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Mythimna sequax*, com e sem adição de sacarose (100%), estocados em nitrogênio líquido por 30 dias e ovos não estocados ( $n= 60$ ). ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ;  $70\pm 10\%$  de umidade relativa e 12L: 12D de fotoperíodo)..... 53

TABELA 3 - Médias ( $\pm$  EP) da porcentagem de parasitismo, emergência e tempo de desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Mythimna sequax* tratados com etilenoglicol, leite desnatado e ovos sem adição de crioprotetor, estocados em nitrogênio líquido por 30 dias e comparados com ovos não estocados. ( $n= 80$ ). ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ;  $70\pm 10\%$  de umidade relativa e 12L: 12D de fotoperíodo)..... 54

### 5 Capítulo III

#### **Capacidade reprodutiva e desenvolvimento de quatro espécies de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *Mythimna sequax* (Franclemont, 1951) (Lepidoptera: Noctuidae) estocados em nitrogênio líquido**

TABELA 1 - Média ( $\pm$  EP) do tempo de desenvolvimento, razão sexual e longevidade das progênes de *Trichogramma* spp. originados de ovos de *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido por 30 dias e em ovos não estocados ( $20\pm 1^\circ\text{C}$  T;  $70\pm 10\%$  RH; 12L: 12D fotoperíodo)..... 68

### 6 Capítulo IV

#### **Um novo passo na produção de *Trichogramma* Westwood: Criopreservação de ovos de *Mythimna sequax* (Franclemont, 1951) (Lepidoptera: Noctuidae) por longos períodos**

TABELA 1 - Comparação do acúmulo de metabólitos em ovos de *Anticarsia gemmatalis* e *Mythimna sequax* obtidos de larvas criadas em dieta artificial. Os desvios químicos estão relacionados ao TMSP (2,2,3,3- tetradeuterium-3-trimethylsilylpropionate) ( $\delta = 0$  ppm) e os valores expressos em nmol..... 87

TABELA 2 - Médias ( $\pm$  EP) do tempo de desenvolvimento (ovo-adulto) e razão sexual de *Trichogramma atopovirilia* e *Trichogramma pretiosum* originados de ovos de *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido por zero, um, três, seis, nove e 12 meses ( $n= 240$ ). ( $20\pm 1^{\circ}\text{C}$  T;  $70\pm 10\%$  RH; 12L: 12D fotoperíodo)..... 90

TABELA 3 - Média ( $\pm$  EP) da longevidade e porcentagem parasitismo acumulado de progênes de *Trichogramma atopovirilia* e *Trichogramma pretiosum* originados de ovos estocados em nitrogênio líquido por nove e 12 meses comparadas com ovos não estocados. ( $20\pm 1^{\circ}\text{C}$  T;  $70\pm 10\%$  RH; 12L: 12D fotoperíodo)..... 91

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Os parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) são os inimigos naturais mais utilizados em programas de controle biológico de lepidópteros-pragas no mundo (KING e COLEMAN, 1989; SMITH, 1996; PEREIRA *et al.*, 2004). Sua produção massal é realizada a partir de hospedeiros alternativos como *Sitotroga cerealella* Olivier (Lepidoptera: Gelechiidae), *Anagasta kuehniella* Zeller e *Corcyra cephalonica* Stainton (Lepidoptera: Pyralidae) (HASSAN, 1981; PARRA, 1997; GREENBERG *et al.*, 1998; ZHENG *et al.*, 2003). Esses hospedeiros são utilizados devido ao seu baixo custo de produção, uma vez que são criados em dieta à base de farinhas (PARRA, 1997).

Os microlepidópteros possuem ovos pequenos com volume aproximado de 0,021 a 0,036 mm<sup>3</sup> (CÔNSOLI *et al.*, 1999). Neste contexto, o tamanho dos ovos da espécie hospedeira influenciam significativamente o tamanho, longevidade e desempenho reprodutivo dos parasitoides que neles se desenvolvem (SALT, 1941; BAI *et al.*, 1992; ROITBERG *et al.*, 2001). Parasitoides originados de ovos hospedeiros de menor volume têm a capacidade de parasitismo afetada quando parasitam ovos de maior volume (KRAZMER e LUCK, 1995; GREENBERG *et al.*, 1998; HOFFMANN *et al.*, 2001). Por outro lado, ovos maiores originam parasitoides mais vigorosos, longevos e com maior capacidade reprodutiva devido à maior disponibilidade de alimento (SALT, 1941; BOLDT e MARSTON, 1974; BAI *et al.*, 1992; NURINDAH *et al.*, 1999).

Atualmente, os parasitoides produzidos a partir de ovos das traças-dos-cereais são empregados tanto no controle de lepidópteros-pragas que possuem ovos minúsculos, quanto os que apresentam ovos mais volumosos, como é o caso dos noctuídeos e erebídeos. A maioria dos lepidópteros-pragas que atacam grandes culturas pertencem a essas duas famílias (HOFFMANN *et al.*, 2001; AVANCI *et al.*, 2005; EL-WAKEIL, 2007; FOERSTER *et al.*, 2014). O sucesso de programas de controle biológico desses lepidópteros-pragas pode ser incrementado com a utilização de parasitoides produzidos a partir de hospedeiros mais volumosos. Alguns estudos já demonstraram que o parasitismo de ovos de noctuídeos foi mais eficiente quando os parasitoides foram produzidos a partir de hospedeiros de maior volume em comparação aos parasitoides obtidos de hospedeiros de menor volume (KRAZMER e LUCK, 1995; GREENBERG *et al.*, 1998).

Neste sentido, surge a necessidade de viabilizar a produção massal de *Trichogramma* a partir de um hospedeiro que atenda essa demanda. Ovos de *Mythimna sequax* (Franclemont, 1951) (Lepidoptera: Noctuidae) apresentam potencial para utilização na produção massal de *Trichogramma* spp. (AVANCI, 2004; KRECHEMER, 2010). Esta espécie, além de apresentar ovos três vezes mais volumosos quando comparado com ovos de *A. kuehniella* (CÔNSOLI *et al.*, 1999; ZAMONER, 2005) possui alta capacidade reprodutiva, facilidade e custo reduzido de criação (SALVADORI e PARRA, 1990; FOERSTER, 1996; MARCHIORO e FOERSTER, 2012).

Entretanto, um dos principais entraves numa produção massal de *Trichogramma* é a disponibilidade contínua de ovos hospedeiros, uma vez que, eventualmente, pode ocorrer queda na produção de ovos. Uma das alternativas para incrementar a produção massal de *Trichogramma* nos períodos de maior incidência das pragas é a criopreservação de ovos hospedeiros em nitrogênio líquido (GRECO e STILINOVIC, 1998; TEZZE e BOTTO, 2004). Esta técnica vem sendo empregada na produção massal dos parasitoides de ovos de percevejos *Trissolcus basalis* Wollaston e *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae) para utilização em programas de controle biológico de percevejos na cultura da soja (CORRÊA-FERREIRA e OLIVEIRA, 1998; DOETZER e FOERSTER, 2013; FAVETTI *et al.*, 2014). A principal vantagem da técnica é a preservação dos ovos hospedeiros por períodos prolongados. Corrêa-Ferreira e Oliveira (1998) estocaram ovos de *Nezara viridula* L. (Heteroptera: Pentatomidae) em nitrogênio líquido por um ano e obtiveram altos índices de parasitismo e emergência de *T. basalis*.

Em lepidópteros, a maioria dos estudos se concentram na estocagem de ovos de microlepidópteros parasitados e mantidos em baixas temperaturas, porém, por períodos curtos, de até dois meses (JALALI e SING, 1992; PITCHER *et al.*, 2002; ÖZDER, 2004). A criopreservação de ovos de lepidópteros em nitrogênio líquido tem se mostrado uma alternativa promissora para a produção massal de *Trichogramma*. Greco e Stilinovic estocaram ovos de *S. cerealella* por 20, 30 e 130 dias e obtiveram índices de parasitismo por *Trichogramma pretiosum* de até 43% e emergência de 69%. Posteriormente, Krechmer (2010) avaliou o parasitismo e emergência de *Trichogramma atopovirilia* Oatman e Platner e *T. pretiosum* em ovos de *M. sequax* armazenados em nitrogênio líquido por 30, 60 e 90 dias e observou índices de parasitismo que variaram de 58,5 a 69,8% para *T. pretiosum* e 48 a 69% para *T. atopovirilia*. A porcentagem de emergência foi superior a 97% para *T. pretiosum* e 85% para *T. atopovirilia*. Esses resultados, embora promissores, indicam que a técnica de estocagem empregada em ovos de *M. sequax*, pode ser aprimorada e se tornar viável para a produção massal de *Trichogramma*.

Portanto, há necessidade de estudos que promovam o incremento do parasitismo por *Trichogramma* em ovos de *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido e o aumento do tempo de estocagem desses ovos.

Nesta tese foi estudada a viabilidade da estocagem de ovos de *M. sequax* em nitrogênio líquido para utilização na produção massal de *Trichogramma*. Portanto, foram avaliados fatores como densidade de parasitoides, desempenho de linhagens e espécies de *Trichogramma*, uso de crioprotetores, tempo de estocagem e tolerância dos ovos de *M. sequax* a baixas temperaturas.

A tese será apresentada em quatro capítulos, sendo o primeiro destinado à realização de estudos para definição da densidade de parasitoides à ser empregada no parasitismo por *Trichogramma* em ovos de *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido; além da comparação do desempenho de fêmeas criadas em ovos estocados com fêmeas criadas em ovos não estocados. O segundo capítulo demonstra a influência do uso de alguns crioprotetores durante o processo de estocagem dos ovos. O terceiro trata-se da avaliação da capacidade reprodutiva de *T. atopovirilia*, *T. exiguum*, *T. galloi* e *T. pretiosum* em ovos estocados comparadas com ovos não estocados. O quarto capítulo apresenta a comparação dos índices de parasitismo e emergência de *T. pretiosum* em ovos de *Anticarsia gemmatalis* e *M. sequax* criopreservados; a determinação e quantificação dos crioprotetores naturais presentes nos ovos das duas espécies; e para concluir, a avaliação do parasitismo por *T. atopovirilia* e *T. pretiosum* em ovos de *M. sequax* mantidos em nitrogênio líquido por até 12 meses.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 ASPECTOS GERAIS**

O controle biológico por meio de inimigos naturais tem se mostrado uma ferramenta eficiente no controle de diversas pragas agrícolas e florestais (VAN LENTEREN *et al.*, 2003; PARRA *et al.*, 2014). Os parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma* são os agentes mais utilizados no controle de lepidópteros-pragas (KING e COLEMAN, 1989; SMITH, 1996). A cada ano, as liberações inundativas de *Trichogramma* em áreas florestais e agrícolas têm aumentado de forma expressiva em mais de 50 países, totalizando aproximadamente 32 milhões de hectares (PIZZOL *et al.*, 2010). No Brasil, as liberações de *Trichogramma* ocorrem em

aproximadamente 750.000 hectares, principalmente em áreas de produção de cana-de-açúcar e soja, mas também em pequenas áreas de cultivo de milho e tomate (PARRA *et al.*, 2015).

O gênero possui ampla distribuição geográfica com mais de 200 espécies distribuídas em todo o mundo (PINTO, 2006). *Trichogramma pretiosum* é a espécie que está associada a um maior número de hospedeiros, portanto, é a mais utilizada em programas de controle biológico no mundo (ZUCCHI e MONTEIRO, 1997). Essa espécie, juntamente com *Trichogramma atopovirilia* Oatman e Platner, *Trichogramma exiguum* Pinto e Platner, *Trichogramma galloi* Zucchi e *Trichogramma lasallei* Pinto ocorrem em todo continente americano (ZUCCHI *et al.*, 2010). Algumas espécies têm hospedeiros específicos, como é o caso de *T. galloi* que está associado à broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (ZUCCHI *et al.*, 2010).

A maioria dos lepidópteros parasitados por *Trichogramma* pertencem à família Noctuidae, como *Chrysodeixis includens* Walker (BUENO *et al.*, 2012), *Helicoverpa armigera* Hübner (GUNDANNAVAR e GIRADDI, 2014; MACFADYEN *et al.*, 2015), *Helicoverpa zea* Boddie (MANANDHAR e WRIGTH, 2015), *Heliothis virescens* Fabricius (ANDRADE *et al.*, 2011), *Spodoptera cosmioides* Walker (CABEZAS *et al.*, 2013), *Spodoptera frugiperda* Smith (DÍAZ *et al.*, 2012), *Trichoplusia ni* Hübner (KRECHEMER e FOERSTER, 2015) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (CAÑETE e FOERSTER, 2003; AVANCI *et al.*, 2005; FOERSTER *et al.*, 2015), esta última recentemente posicionada na família Erebidae. Esses lepidópteros estão associados a culturas de grande importância econômica, como soja, milho e algodão.

Outros lepidópteros como *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) (CÔNSOLI *et al.*, 1999; GEREMIAS e PARRA, 2014), *Lobesia botrana* Denis e Schiffermüller (Lepidoptera: Tortricidae) (EL-WAKEIL *et al.*, 2008; PIZZOL *et al.*, 2012), *Ostrinia nubialis* Hübner (Lepidoptera: Crambidae) (CHAPMANN *et al.*, 2009), *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) (URBANEJA *et al.*, 2012; CHAILLEUX *et al.*, 2013) também são parasitados por inúmeras espécies de *Trichogramma*.

## 2.2 DESEMPENHO DE *Trichogramma* EM FUNÇÃO DO TAMANHO DO HOSPEDEIRO

*Trichogramma* é um parasitoide gregário, com mais de um indivíduo desenvolvendo-se no interior do ovo-hospedeiro dependendo do volume (SALT, 1941). A maioria das espécies apresenta partenogênese arrenótoca, onde óvulos fecundados originarão fêmeas e os não



fecundados darão origem a machos. Algumas espécies são telítocas, cuja produção será apenas de fêmeas; Assim, a qualidade do hospedeiro influenciará a razão sexual, pois as fêmeas necessitam de maior disponibilidade de nutrientes para um desenvolvimento ideal (VINSON, 2010).

Fatores como idade do ovo, volume e espessura do córion estão envolvidos na produção de um parasitoide de qualidade (BOIVIN, 2010). Dentre esses fatores, o tamanho do ovo-hospedeiro além de influenciar o número de parasitoides, também tem um efeito importante sobre o desempenho dos adultos, em aspectos como tamanho, vigor e fecundidade, devido aos recursos disponíveis para o desenvolvimento das formas imaturas (ROITBERG *et al.*, 2001). Neste sentido, parasitoides originados de ovos pequenos podem ter a sua capacidade de parasitismo afetada em ovos mais volumosos. Krazmer e Luck (1995) verificaram que o parasitismo de fêmeas de *T. pretiosum* originadas de ovos *H. zea* foi maior quando comparado com fêmeas originadas de ovos de *S. cerealella*. Greenberg *et al.* (1998) avaliaram o parasitismo de *T. pretiosum* e *Trichogramma minutum* Riley provenientes de ovos de *H. zea*, *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae) e *S. cerealella* e verificaram que as fêmeas originadas dos hospedeiros com ovos de maior volume apresentaram maior capacidade de parasitismo.

Hoffmann *et al.* (2001) compararam o desempenho de *Trichogramma ostrinae* Pang e Chen originados de ovos de *O. nubilalis*, *T. ni*, *Ephestia kuhniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) e *S. cerealella* em ovos de *O. nubilalis* e verificaram baixo desempenho dos parasitoides oriundos de ovos de *S. cerealella*. Siqueira *et al.* (2012) verificaram baixos índices de parasitismo por *T. pretiosum*, originados de ovos de *A. kuehniella*, em ovos de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *C. includens*, cujos ovos são mais volumosos. Esses trabalhos demonstram a importância da seleção de um hospedeiro adequado para a produção de *Trichogramma* visando o controle de lepidópteros-pragas que apresentam ovos mais volumosos, como é o caso dos noctuídeos.

### 2.3 PRODUÇÃO DE *Trichogramma* EM OVOS DE *Mythimna sequax*

*Mythimna sequax* é considerada uma das principais pragas que atacam culturas de inverno, como trigo, cevada e aveia (BERTELS, 1970). Além de ser um inseto de fácil multiplicação em laboratório, as fêmeas possuem alta capacidade reprodutiva tanto em dieta

artificial (SALVADORI e PARRA, 1990; MARCHIORO e FOERSTER, 2012) quanto em dieta natural (FOERSTER, 1996) podendo produzir em média 1.200 ovos durante a sua vida.

Grande parte dos relatos de parasitismo de *M. sequax* se refere ao parasitismo no estágio larval (DOETZER e FOERSTER, 1998; FOERSTER *et al.*, 1999; FOERSTER e DOETZER, 2003), porém, estudos realizados por Avanci (2004) e Krechemer (2010) indicam que os ovos de *M. sequax* tem potencial para a produção de *Trichogramma*, pois, proporcionam mais de um parasitoide por ovo, indivíduos robustos, vigorosos e longevos. Os ovos desse noctuídeo são três vezes mais volumosos do que os ovos de *A. kuehniella* (CÔNSOLI *et al.* 1999, ZAMONER, 2005), o que proporciona maior reserva nutricional para o parasitoide durante a fase larval.

Entretanto, a produção massal de *Trichogramma* em larga escala utiliza como critério o número de parasitoides produzidos por custo de produção e não considera o desempenho do parasitoide (SOUTHARD *et al.*, 1982, BAI *et al.*, 1992), sendo este um fator limitante para a produção de parasitoides mais vigorosos a partir de hospedeiros de maior volume quando comparado com os hospedeiros alternativos que existem no mercado. Neste sentido, Marchioro e Foerster (2012) adaptaram uma dieta artificial para a produção de *M. sequax* com custo reduzido quando comparado às dietas utilizadas por Salvadori e Parra (1990) na criação deste noctuídeo. A utilização da dieta adaptada por Marchioro e Foerster (2012) pode possibilitar uma redução acentuada no custo de produção do hospedeiro tornando viável a produção de *Trichogramma* a partir de ovos de *M. sequax* para liberações inoculativas em programas de controle biológico visando o controle de noctuídeos.

#### 2.4 MÉTODOS DE ESTOCAGEM EM BAIXAS TEMPERATURAS

A estocagem de ovos-hospedeiros em baixa temperatura é uma alternativa que possibilita uma disponibilidade de ovos contínua durante o ano e o incremento da produção massal de *Trichogramma* nos períodos de maior ocorrência da praga (GRECO e STILINOVIC, 1998; ÖZDER, 2004; WANG *et al.*, 2014). Esta técnica vem sendo estudada em muitos países, mas no Brasil ainda é pouco explorada (KRECHEMER, 2010). Os principais métodos utilizados têm sido a estocagem de ovos em refrigerador (JALALI e SING, 1992; LEOPOLD *et al.*, 1998; PITCHER *et al.*, 2002; BAYRAM *et al.*, 2005; LÓPEZ e BOTTO, 2005; RODRIGUES e SAMPAIO, 2011), freezer e nitrogênio líquido (GRECO e STILINOVIC, 1998; LOHMANN *et al.*, 2007; KRECHEMER, 2010).

### 2.4.1 Estocagem em refrigerador

A estocagem de ovos em refrigerador consiste em armazenar ovos já parasitados por *Trichogramma* em temperaturas que variam entre 0 e 15 °C (LEOPOLD *et al.*, 1998). Trata-se de um método com baixo custo de manutenção e permite a sincronização entre a produção de parasitoides com a ocorrência da praga nas culturas (TEZZE e BOTTO, 2004). A maioria dos estudos se concentra na estocagem de ovos dos hospedeiros alternativos *A. kuehniella*, *S. cerealella* e *C. cephalonica* (JALALI e SINGH, 1992; TEZZE e BOTTO, 2004; ÖZDER, 2004). Esse método é o mais utilizado, pois não afeta a capacidade de parasitismo uma vez que apenas as pré-pupas e pupas de *Trichogramma* são armazenadas em baixas temperaturas (AVANCI, 2004; ÖZDER, 2004). Porém, esta técnica só é viável por períodos curtos de estocagem, pois, a medida em que se aumenta o tempo de armazenamento ocorre uma drástica redução no índice de emergência dos parasitoides (JALALI e SINGH, 1992; AYVAZ *et al.*, 2008).

Jalali e Singh (1992) estocaram ovos de *C. cephalonica* parasitados por *Trichogramma achaeae* Nagaraja e Nagarkatti, *Trichogrammatoidea eldanae* Viggiani, *Trichogramma chilonis* Ishii e *Trichogramma japonicum* Ashmead e posteriormente mantidos nas temperaturas de 2, 5 e 10 °C por até 49 dias. Os autores observaram um descrésimo na emergência de adultos a medida em que aumentou o tempo de armazenamento. A emergência das quatro espécies de *Trichogramma* foi inferior a 40% aos 49 dias de estocagem dos ovos nas três temperaturas.

Pitcher *et al.* (2002) armazenaram por até 60 dias a 6, 9 e 12 °C ovos de *S. cerealella* parasitados e verificaram que a temperatura de 9 °C foi a que menos afetou a emergência (63%) de *T. ostrinae*. Rundle *et al.* (2004) estocaram ovos de *S. cerealella* nas temperaturas de 4, 8 e 10 °C por até 60 dias e observaram que o maior índice de emergência de *Trichogramma carverae* Oatman e Pinto foi obtido nos ovos estocados por 15 dias a 10 °C. Rodrigues e Sampaio (2011) avaliaram a viabilidade da estocagem de ovos de *S. cerealella* parasitados por *T. pretiosum* nas temperaturas de 5, 8 e 10 °C mantidos por até 20 dias e obtiveram emergência de parasitoides superior a 90% nas temperaturas de 5 e 8 °C e 79% para a estocagem a 10 °C.

Özder (2004) observou em ovos de *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) parasitados e mantidos a 0 °C por 14 dias uma taxa de emergência de *Trichogramma cacoeciae* Marchal superior a 90% e aos 31 dias 70%. Yilmaz *et al.* (2007) armazenaram ovos de *E. kuehniella* parasitados por *Trichogramma evanescens* Westwood durante 30 dias a 10 °C e

obtiveram 85% de emergência. Ayvaz *et al.* (2008) estocaram ovos de *E. kuehniella* parasitados por *T. evanescens* a 4 °C por 60 dias, e observaram uma drástica redução na emergência dos adultos (47%) a partir de trinta dias. Gardner *et al.* (2012) estocaram ovos de *E. kuehniella* parasitados por *T. ostriniae* por 60 dias a 2 °C e duas vezes por semana aclimataram os ovos a 20 °C por 3 h. Essa técnica permitiu o aumento da emergência, longevidade e fecundidade dos parasitoides. Lessar e Boivin (2013) observaram que a emergência de *Trichogramma brassicae* Bezdenko não foi afetada pela estocagem de ovos de *E. kuehniella* a 10 °C por 30 dias.

Bayram *et al.* (2005) estudaram o efeito da estocagem de ovos do bicho da cana *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre) (Lepidoptera: Noctuidae), de ocorrência nas regiões mediterrâneas, parasitados por *Telenomus busseolae* Gahan (Hymenoptera: Scelionidae) por 30 dias em três temperaturas (4, 8 e 12 °C) e verificaram emergência superior a 60% para as três temperaturas somente nos primeiros 15 dias. Além de *Trichogramma*, outros parasitoides também são afetados pelo armazenamento em baixas temperaturas. López e Botto (2005) estocaram pupas de *Eretmocerus corni* Haldeman e *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae) a 11,5 °C e obtiveram emergência superior a 90% somente até 14 dias de estocagem.

#### 2.4.2 Estocagem em freezer

Este método consiste no armazenamento de ovos-hospedeiros em temperaturas ultra-baixas que variam entre 0 e -140 °C (PEVERIERI *et al.*, 2015). Diferentemente da estocagem em refrigerador, os ovos são parasitados por *Trichogramma* após a retirada do congelador (GRECO e STILINOVIC, 1998). A principal vantagem é a possibilidade de estocagem dos ovos por longos períodos. Peverieri *et al.* (2015) estocaram ovos do percevejo *Leptoglossus occidentalis* (Heidemann) (Heteroptera: Coreidae), importante praga florestal na América do Norte, em quatro temperaturas (+4, -20, -80 e -140 °C) e registraram as maiores taxas de parasitismo de *Gryon pennsylvanicum* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae) nas temperaturas de -80 °C -140 °C (52%) em ovos estocados por 12 meses. Milward-de-Azevedo *et al.* (2004) avaliaram o desempenho reprodutivo de *Nasonia vitripennis* Walker (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas de *Chrysomya megacephala* Fabricius (Diptera: Calliphoridae) armazenadas a -20 °C durante 77 dias e obtiveram 78% de emergência de adultos.

Entretanto, para a produção de *Trichogramma* este método ainda não é viável conforme estudos realizados por Dass e Ram (1983) que estocaram ovos de *C. cephalonica* a -6 °C por

diferentes períodos por até 15 dias e verificaram que a maior taxa de parasitismo (69%) por *T. exiguum* ocorreu nos ovos estocados por sete dias. Após esse período, houve uma acentuada redução na porcentagem de parasitismo chegando a 12% nos ovos estocados durante 15 dias, porém, a emergência de adultos se manteve alta nesse período (88 %). Greco e Stilinovic (1998) mantiveram ovos de *S. cerealella* em freezer a -20 °C por cinco, 10, 15, 20 e 25 dias e posteriormente ofertaram esses ovos ao parasitismo por fêmeas de *T. pretiosum*. A estocagem dos ovos nesta temperatura impossibilitou o parasitismo dos ovos em todos os períodos de estocagem devido aos danos na estrutura do ovo causados durante o processo lento de congelamento. Segundo Castro *et al.* (2011), durante o congelamento lento, em freezer, ocorre uma maior probabilidade de rompimento das membranas celulares devido à formação de cristais de gelo no interior da célula.

#### 2.4.3 Estocagem em nitrogênio líquido

A criopreservação consiste na redução da temperatura como forma de diminuir o metabolismo celular, permitindo que as células sejam conservadas por períodos indeterminados (PEGG, 2007). Esta técnica baseia-se em cinco etapas fundamentais: exposição do material biológico ao agente crioprotetor, resfriamento de forma gradual ou rápida, armazenamento, descongelamento e diluição ou remoção do agente crioprotetor (SHAW *et al.*, 2000).

Os agentes crioprotetores, que podem ser extracelulares ou intracelulares, tem a função de minimizar os danos causados aos tecidos celulares durante o processo de congelamento (VAJTA *et al.*, 2007). Os crioprotetores intracelulares como etilenoglicol, dimetilsulfóxido, propanodiol e glicerol, atuam na substituição parcial da água no interior da célula ligando-se ao hidrogênio das moléculas de água das células e, conseqüentemente, reduzindo o ponto de congelamento das células (JAIN e PAULSON, 2006). Enquanto que os crioprotetores extracelulares como açúcares, lipoproteínas, proteínas do leite e aminoácidos aumentam a osmolaridade do meio extracelular removendo a água do interior da célula evitando a formação de cristais de gelo (AMANN e PICKETT, 1987).

A velocidade de congelamento é um fator determinante para a conservação dos tecidos celulares. O congelamento gradual consiste na redução lenta da temperatura, entre -20 °C e -80 °C, e posteriormente o material é estocado em nitrogênio líquido a -196 °C, enquanto que, no congelamento rápido, denominado vitrificação, o material passa da temperatura ambiente direto para o nitrogênio líquido (CASTRO *et al.*, 2011). Nesse sentido, a vitrificação reduz a formação

de cristais de gelo no interior das células minimizando os danos causados pelo congelamento (MILWARD-DE-AZEVEDO *et al.*, 2004).

Este método tem sido aplicado na preservação de embriões de inúmeras espécies de insetos na América do Norte, Ásia e Europa, como *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) (BANNO *et al.*, 2013), *Pectnophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae) (RAJAMOHAN *et al.*, 2013), *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (GUANG-HONG *et al.*, 2001; LUO *et al.*, 2006), *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) (ROVERSI *et al.*, 2008), *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) (WANG *et al.*, 2000) e *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae) (LEOPOLD *et al.*, 2010).

A técnica de criopreservação em nitrogênio líquido de ovos-hospedeiros tem se mostrado promissora para a produção massal de *Trichogramma*, apesar de ainda ser pouco explorada (KRECHEMER, 2010). Esta técnica tem sido aplicada com sucesso desde a década de 90 na estocagem de ovos dos pentatomídeos *N. viridula* (CÔRREA-FERREIRA e OLIVEIRA, 1998), *Dichelops furcatus* Fabricius, *Acrosternum pengue* Rolston e *Piezodorus guildinii* Westwood (DOETZER e FOERSTER, 2013) para produção massal dos parasitoides de ovos *T. basalis* e *T. podisi* para liberação na cultura da soja.

Este método consiste em armazenar ovos diretamente em nitrogênio líquido e posteriormente ofertá-los ao parasitismo. Uma das vantagens é a possibilidade de armazenar ovos hospedeiros por períodos indeterminados. Côrrea-Ferreira e Oliveira (1998) estocaram ovos de *N. viridula* em nitrogênio líquido durante um ano e obtiveram altas taxas de emergência de adultos de *T. basalis*. Entretanto, em lepidópteros os resultados são restritos; Alguns hospedeiros demonstraram ser promissores à aplicação deste método. Greco e Stilinovic (1998) estocaram ovos de *S. cerealella* por 20, 30 e 130 dias em nitrogênio líquido e posteriormente ofertaram esses ovos ao parasitismo por *T. pretiosum* nas temperaturas de 21 e 26 °C. O índice de parasitismo mais alto foi obtido nos ovos estocados por 130 dias, com 43%, nos ovos desenvolvidos a 26 °C. Lohmann *et al.* (2007) verificaram que o congelamento dos ovos de *A. kuehniella* por nove meses causou a deterioração total após a retirada do nitrogênio, impedindo o parasitismo dos ovos por *T. pretiosum*.

Dentre os lepidópteros, apenas os ovos de *M. sequax* apresentaram um resultado promissor na estocagem em nitrogênio líquido. Krechemer (2010) empregou a técnica em ovos de *M. sequax* por até 90 dias e obteve 58% de ovos parasitados por *T. pretiosum* e 52% por *T. atopovirilia*. Os dados obtidos por Krechemer (2010) sugerem que os ovos de *M. sequax* apresentam potencial para criopreservação visando a produção massal de *Trichogramma*. No

entanto, é necessário aprimorar a técnica para aumentar a taxa de parasitismo, emergência de adultos e a capacidade de parasitismo das progênes de *Trichogramma* criopreservados.

## 2.5 TOLERÂNCIA DOS OVOS AO CONGELAMENTO

A maior tolerância ao congelamento de ovos de *M. sequax* quando comparado com os ovos de traças-dos-cerais pode estar relacionado com o fato de *M. sequax* ser uma espécie de ocorrência durante o período de inverno (BERTELS, 1970) o que não ocorre com as traças-dos-cerais que são criadas em temperaturas mais altas. Vários estudos demonstram que alguns insetos podem apresentar adaptações bioquímicas para sobreviver em temperaturas mais baixas (ZACHARIASSEN, 1985; BLOCK, 1991; ROZSYPAL, 2015). Estudos com a mosca varejeira *Sarcophaga crassipalpis* Macquart (Diptera: Sarcophagidae) demonstraram elevações nos níveis de glicerol quando estas foram expostas ao congelamento a 0 °C por duas horas (CHEN *et al.*, 1987). A trealose, principal açúcar presente na hemolinfa dos insetos, também pode agir como crioprotetor. Em *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae), inseto considerado sensível ao frio, a quantidade de trealose aumentou a tolerância deste inseto a baixas temperaturas (OVERGAARD *et al.*, 2007). Também foram relatadas alterações nos níveis de trealose em nematóides entomopatogênicos em resposta a uma rápida exposição ao estresse térmico, onde foi observado um acúmulo de trealose de até seis vezes (JAGDALE *et al.*, 2005).

### 3 CAPÍTULO I – BASES PARA A APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE CRIOPRESERVAÇÃO EM OVOS DE *Mythimna sequax* (FRANCLEMONT, 1951) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) PARA A PRODUÇÃO DE *Trichogramma* spp. WESTWOOD

**RESUMO** - A criopreservação de ovos de noctuídeos em nitrogênio líquido pode ser uma ferramenta promissora para a produção massal de *Trichogramma*, entretanto, estudos sobre esta técnica são incipientes. Neste trabalho, avaliou-se a resposta de diferentes densidades de fêmeas de *Trichogramma pretiosum* ao parasitismo de ovos de *Mythimna sequax* estocados e não estocados em nitrogênio líquido; comparou-se o desempenho reprodutivo de fêmeas criadas em ovos estocados e não estocados. Para isso, avaliou-se a influência da quantidade de fêmeas de *T. pretiosum* (4, 8 e 12) liberadas para o parasitismo de 40 ovos de *M. sequax* estocados por 15 dias em nitrogênio líquido e não estocados, assim como, o desempenho de fêmeas de *T. pretiosum* criadas por três gerações em ovos estocados e não estocados. O parasitismo de *T. pretiosum* nas densidades de 4 e 8 fêmeas em ovos estocados foi superior a 84 %, o dobro dos resultados obtidos em estudos anteriores. A emergência dos parasitoides foi superior a 90 % em ambos os experimentos. O desempenho das fêmeas criadas em ovos estocados por três gerações não diferiu das fêmeas criadas em ovos não estocados em todos os parâmetros biológicos avaliados. Com base neste estudo, conclui-se que a criopreservação de ovos de *M. sequax* é alternativa viável para a produção massal de *T. pretiosum*.

**Palavras-chave:** Estocagem de ovos. Temperaturas ultrabaixas. Noctuídeos. Parasitoides de ovos.



BASIS FOR THE APPLICATION OF CRYOPRESERVATION TECHNIQUE IN EGGS OF *Mythimna sequax* (FRANCLEMONT, 1951) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) FOR PRODUCTION OF *Trichogramma* spp. WESTWOOD

**ABSTRACT** - The cryopreservation of noctuid eggs in liquid nitrogen can be a promising tool for mass production of *Trichogramma*, however, studies about this technique are incipient. In this study, we evaluated the response of three densities of females of *Trichogramma pretiosum* (4, 8 and 12 females /40 eggs) on parasitism in eggs of *Mythimna sequax* stored for 15 days in liquid nitrogen, as well as the reproductive performance of *T. pretiosum* females reared in stored eggs for three generations with females reared in non-stored eggs.. The performance of females reared on cryopreserved eggs was compared to those reared on non-stored eggs. The parasitism of *T. pretiosum* in densities of females 4 and 8 in stored eggs was higher than 84 %, twice as much as previously described results. The emergence of the parasitoid was above 90% in both experiments. The performance of females reared on stored eggs for three generations did not differ from females reared in non-stored eggs in all biological parameters evaluated. Based in the study, we conclude that the cryopreservation of *M. sequax* eggs is a viable technique for the mass production of *T. pretiosum*.

**Keywords:** Storage of eggs. Ultralow temperature. Noctuids. Eggs parasitoids.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Os parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma* Westwood são os agentes mais utilizados em programas de controle biológico de lepidópteros-praga em áreas agrícolas e florestais em todo o mundo (PEREIRA *et al.*, 2004). Sua produção massal é realizada a partir de ovos de hospedeiros alternativos como *Anagasta kuehniella* Zeller, *Sitotroga cerealella* Olivier e *Corcyra cephalonica* Staiton por apresentarem facilidade na criação e baixo custo de produção (PARRA, 1997). No entanto, estes hospedeiros fornecem ovos de tamanho reduzido (CÔNSOLI *et al.*, 1999) e que resultam em parasitoides pequenos e com menos vigor quando comparados aos parasitoides originados de ovos de hospedeiros de maior volume, devido à maior disponibilidade de nutrientes para os imaturos (SALT, 1941; BAI *et al.*, 1992).

Os parasitoides originados de hospedeiros alternativos são utilizados com sucesso no controle de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) (GEREMIAS e PARRA, 2014), *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) (URBANEJA *et al.*, 2012), *Lobesia botrana* Denis e Schiffermüller (Lepidoptera: Tortricidae) (PIZZOL *et al.*, 2012). Entretanto esses parasitoides não tem a mesma eficiência quando parasitam ovos mais volumosos, como aqueles da família Noctuidae (KRAZMER e LUCK, 1995; GREENBERG *et al.*, 1998; HOFFMANN *et al.*, 2001). Segundo Bai *et al.* (1992) a criação de *Trichogramma* a partir de hospedeiros que apresentam ovos com maior volume proporcionam maior número de parasitoides por ovo, indivíduos mais longevos e robustos, favorecendo o sucesso no controle das pragas.

Neste contexto, o noctuídeo *Mythimna sequax* (Franclemont, 1951), considerado uma das principais pragas de culturas de inverno no Brasil (BERTELS, 1970), além de apresentar ovos de maior volume do que os ovos de traças criadas em farinha, possui alta capacidade reprodutiva (SALVADORI e PARRA, 1990) e facilidade com custo reduzido de criação (MARCHIORO e FOERSTER, 2012). Estudos realizados por Zamoner (2005) e Krechemer (2010) mostraram que este hospedeiro apresenta potencial para a produção de *Trichogramma*, pois, proporciona indivíduos maiores quando comparado a parasitoides originados de *A. kuehniella*, com alta capacidade de parasitismo e longevidade.

Entretanto, o sucesso de um programa de controle biológico realizado por *Trichogramma* depende de uma produção massal que atenda a alta demanda para liberação de parasitoides nas culturas nos períodos de maior incidência da praga. Um dos fatores que pode comprometer uma produção massal é a falta de sincronização entre a produção do hospedeiro e o parasitoide (TEZZE e BOTTO, 2004). Uma das alternativas para atender à demanda de produção de

parasitoides em larga escala é a criopreservação de ovos hospedeiros em nitrogênio líquido (GRECO e STILINOVIC, 1998; KRECHEMER, 2010).

Em lepidópteros, essa técnica ainda é pouco explorada, no entanto, ela tem sido aplicada com sucesso na estocagem de ovos de percevejos pentatomídeos para produção de *Trissolcus basalis* Wollaston e *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae) para utilização em programas de controle biológico de percevejos que atacam a cultura da soja (CORRÊA-FERREIRA e OLIVEIRA, 1998; DOETZER e FOERSTER, 2013; FAVETTI *et al.*, 2014).

A maioria dos estudos sobre estocagem de ovos de lepidópteros para a produção de *Trichogramma* concentram-se na estocagem em baixas temperaturas de ovos de hospedeiros alternativos já parasitados, porém, os melhores índices de emergência foram obtidos por períodos curtos de armazenamento que variam de 15 a 49 dias (PITCHER *et al.*, 2002; ÖZDER, 2004; JALALI e SING, 1992). A principal vantagem da estocagem em nitrogênio líquido é o armazenamento de ovos hospedeiros por períodos prolongados (CORRÊA-FERREIRA e OLIVEIRA, 1998). Esta técnica tem se mostrado promissora para a produção de *Trichogramma*, como demonstram alguns estudos conduzidos com diferentes hospedeiros (GRECO e STILINOVIC, 1998; KRECHEMER, 2010). Apesar dos resultados promissores, a taxa de parasitismo nestes estudos ficou abaixo de 70%, indicando que é necessário o aprimoramento desta técnica.

Fatores como a densidade de fêmeas (PEREIRA *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2009) e a seleção de linhagens de *Trichogramma* podem aumentar a eficiência do parasitismo de ovos estocados (NAVA *et al.*, 2007; PRATISSOLI e PARRA, 2001). O presente trabalho avaliou a resposta de diferentes densidades de fêmeas de *T. pretiosum* ao parasitismo de ovos de *M. sequax* estocados e não estocados em nitrogênio líquido e comparou-se o desempenho reprodutivo de fêmeas criadas por três gerações consecutivas em ovos estocados comparadas com fêmeas criadas em ovos não estocados.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Criação de insetos

Os ovos de *M. sequax* foram obtidos de criações de laboratório, em temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa e fotoperíodo de 12L: 12D. As lagartas foram mantidas em dieta artificial adaptada por Marchioro e Foerster (2012) até a fase de pupa. Os adultos foram liberados em gaiolas de madeira (40 x 30 x 27 cm) com laterais cobertas com tela de náilon e

alimentados com mel diluído (10 %). Utilizou-se como substrato de oviposição tiras papel de seda sanfonadas.

A criação de *T. pretiosum* foi mantida em tubos de vidro (1,0 x 10 cm), na mesma temperatura do seu hospedeiro. A cada dois dias, aproximadamente 100 ovos de *M. sequax* foram ofertados ao parasitismo por *T. pretiosum*. Os adultos foram alimentados com mel puro distribuído em filetes no interior do tubo de vidro.

### 3.2.2 Estocagem dos ovos

Ovos de *M. sequax* com 24 horas de idade foram transferidos para criotubos com capacidade para 2 mL (Corning®) na quantidade aproximada de 400 ovos por tubo. Os ovos permaneceram em nitrogênio líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 e 30 dias. Após o período de armazenamento, os ovos foram retirados e descongelados em banho-maria a temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos e acondicionados a  $20\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $70\pm 10\%$  de umidade relativa e 12L: 12D de fotoperíodo durante a condução dos experimentos.

### 3.2.3 Influência do número de fêmeas de *T. pretiosum* no parasitismo de ovos estocados

O efeito do número de fêmeas foi avaliado em ovos de *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido por 15 dias e em ovos não estocados (controle). Os tratamentos foram: quatro, oito e 12 fêmeas de *T. pretiosum* por 40 ovos, resultando em uma relação de 10, 5 e 3,3 fêmeas/ovos, respectivamente. Posturas, aderidas em papel de seda, contendo 40 ovos de *M. sequax* foram transferidas para tubos de vidro (1,0 x 10 cm) e ofertados ao parasitismo durante 24 h. Utilizaram-se fêmeas com até 48 h de idade, as quais foram alimentadas com filetes de mel puro no interior de cada tubo. O delineamento foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e 20 repetições, sendo cada repetição composta por 40 ovos.

### 3.2.4 Parasitismo por fêmeas de *T. pretiosum* criadas em ovos estocados por três gerações

Avaliou-se o desempenho de fêmeas criadas em ovos estocados em nitrogênio líquido durante três gerações e comparou-se com fêmeas criadas em ovos não estocados. Ambas as fêmeas receberam ovos de *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido por 30 dias e ovos não estocados. Foram transferidos para tubos de vidro (1,0 x 10 cm) 20 ovos de *M. sequax* aderidos em papel de seda e expostos ao parasitismo por duas fêmeas de *T. pretiosum* com até 48 h de

idade. A razão de 10 ovos/fêmea foi empregada devido aos resultados obtidos do experimento anterior. As fêmeas foram alimentadas com mel no interior dos tubos e permaneceram parasitando durante 24 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado composto por quatro tratamentos: fêmeas criadas em ovos estocados parasitando ovos estocados e não estocados e fêmeas criadas em ovos frescos parasitando ovos estocados e não estocados, com 20 repetições, sendo cada repetição constituída por 20 ovos e duas fêmeas de *T. pretiosum*.

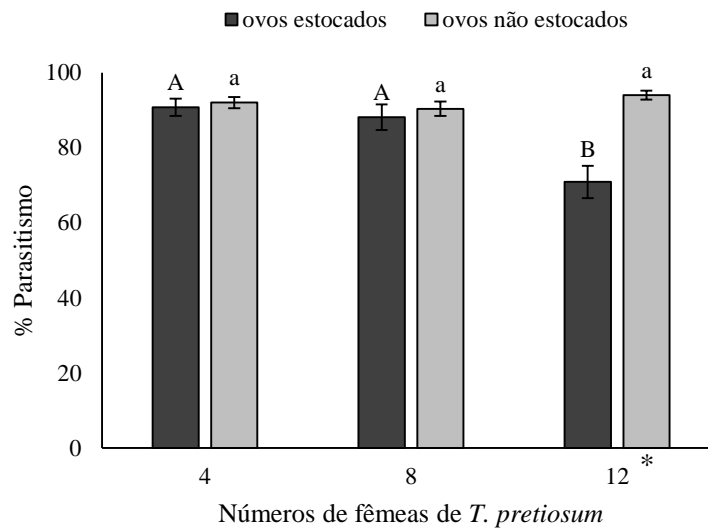
### 3.2.5 Parâmetros avaliados e análise estatística

Foram avaliadas a porcentagem de parasitismo e emergência, o tempo de desenvolvimento e a razão sexual. Os parâmetros cujas variâncias mostraram-se normais pelo teste de Shapiro-Wilk e homogêneas pelo teste de Levene tiveram os efeitos dos tratamentos testados por meio do teste de T- Student ( $P < 0,05$ ) e os que não se mostraram homogêneos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ) e Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ). A razão sexual foi calculada pela fórmula:  $RS = \frac{\text{número de fêmeas}}{\text{n}^\circ \text{ de machos} + \text{n}^\circ \text{ de fêmeas}}$  e comparada por meio do teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) tendo como valor esperado a proporção de ♂ e ♀ obtidas de ovos não estocados.

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 Influência do número de fêmeas de *T. pretiosum* no parasitismo de ovos estocados

As maiores médias de parasitismo por *T. pretiosum* em ovos de *M. sequax* estocados foram observadas quando os 40 ovos foram expostos ao parasitismo por quatro (90,7%) e oito (88%) fêmeas, enquanto que a menor média foi verificada quando os ovos foram ofertados a 12 fêmeas (70,9%) diferindo dos demais tratamentos ( $H = 13,542$ ;  $p < 0,001$ ). O parasitismo das densidades de quatro ( $U = 198,00$ ;  $p = 0,957$ ) e oito ( $U = 19300$ ;  $p = 0,850$ ) fêmeas não diferiram entre ovos estocados e não estocados (Figura 1).



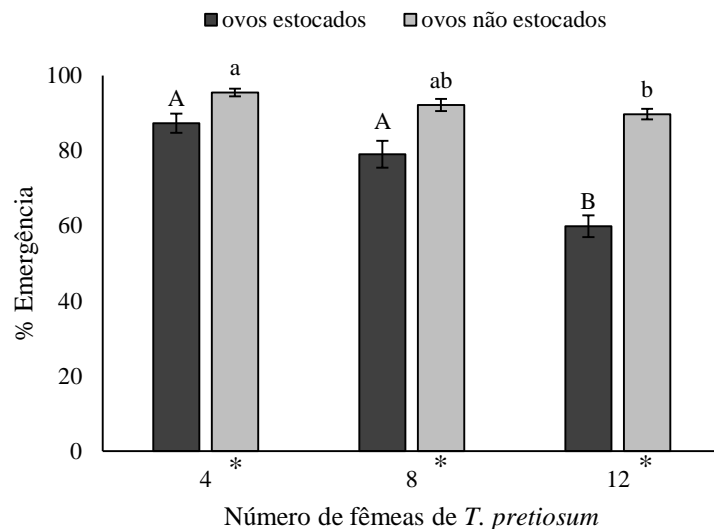
**Figura 1.** Média ( $\pm$  EP) da porcentagem de parasitismo por *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido e ovos não estocados, parasitados por diferentes números de fêmeas. Barras com letras maiúsculas iguais que representam ovos estocados e minúsculas que representam ovos não estocados, não diferem entre as densidades de fêmeas pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ). Asteriscos indicam significância entre ovos estocados e não estocados para cada densidade de fêmeas pelo teste Mann–Whitney ( $P < 0,05$ ).

Esses índices de parasitismo foram o dobro dos obtidos por Greco e Stilinovic (1998) ao criopreservarem ovos de *S. cerealella* em nitrogênio líquido por 20, 30 e 130 dias, onde o parasitismo por *T. pretiosum* foi de 32, 41 e 43% respectivamente. Entretanto, os autores não mencionaram a relação número de fêmeas/ ovo utilizado no experimento. Krechemer (2010) utilizou a densidade de uma fêmea para 20 ovos de *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido por 30, 60 e 90 dias e obteve 61, 70 e 58% de parasitismo por *T. pretiosum*, respectivamente. Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que o aumento da proporção de uma fêmea para 10 ovos (4 fêmeas: 40 ovos) promoveu o incremento no parasitismo dos ovos de *M. sequax* estocados quando comparados aos obtidos por Krechemer (2010).

No entanto, a proporção de 12 fêmeas ocasionou um declínio no índice de parasitismo de ovos de *M. sequax* estocados. Essa queda se deve provavelmente a algum dano causado na estrutura do córion durante o parasitismo devido ao aumento considerável no número de fêmeas. Alguns ovos submetidos ao congelamento podem ter sofrido alterações na sua estrutura, pois se desidrataram após o parasitismo das diversas fêmeas. Paron *et al.* (1998) verificaram que o aumento da proporção de fêmeas de *T. atopovirilia* afetou o parasitismo e o

desenvolvimento dos parasitoides em ovos de *Helicoverpa zea* devido à competição intra-específica pela busca de alimento das larvas dos parasitoides no interior do ovo. Beserra et al. (2003) também constataram uma redução no parasitismo com o aumento da densidade de fêmeas de *T. pretiosum*, pois as fêmeas parasitam várias vezes o mesmo ovo ao invés de parasitarem diferentes ovos. O parasitismo do mesmo ovo por inúmeras vezes provoca o hiperparasitismo ocasionando uma drástica redução no índice de parasitismo.

Os maiores índices de emergência de parasitoides em ovos estocados foram observados nas densidades de quatro (87%) e oito fêmeas (79%), as quais diferiram da densidade de 12 fêmeas (59,8%) ( $H= 27,452$ ;  $p < 0,001$ ). A emergência em ovos estocados foi menor que em ovos não estocados nas densidades de quatro ( $t= 2,963$ ;  $p= 0,005$ ), oito ( $U= 85,00$ ;  $p= 0,002$ ) e 12 fêmeas ( $U= 6,00$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 2). Observou-se que à medida que aumentou o número de fêmeas, diminuiu a porcentagem de emergência dos parasitoides, tanto em ovos estocados quanto em ovos não estocados.



**Figura 2.** Porcentagem média ( $\pm$  EP) de emergência de adultos de *Trichogramma pretiosum* a partir de ovos de *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido por 15 dias e ovos não estocados, parasitados por diferentes números de fêmeas. Barra com letras maiúsculas iguais que representam ovos estocados e minúsculas que representam ovos não estocados, não diferem entre as densidades de fêmeas pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ). Asteriscos indicam significância entre ovos estocados e não estocados para cada densidade de fêmeas pelo teste t – Student e Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ).

Esse resultado corroborou com os obtidos por Krechmer (2010) na emergência de *T. pretiosum* em ovos de *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido e foi superior à Greco e Stilinovic (1998), onde a emergência dos parasitoides foi de no máximo 69 % em ovos de *S. cerealella* estocados em nitrogênio líquido. Neste trabalho, a porcentagem de emergência se manteve dentro do padrão para *T. pretiosum*, pois, segundo Navarro (1998), no controle de qualidade de produção de *Trichogramma* o índice de emergência deve ser superior a 85%.

Em relação à razão sexual, os ovos estocados e não estocados parasitados por diferentes densidades de fêmeas de *T. pretiosum* originaram maior número de fêmeas do que machos (Tabela 1). Sabe-se que o fator nutricional pode influenciar na razão sexual dos parasitoides, então, o fato dos ovos de *M. sequax* apresentarem maior reserva nutricional devido ao seu volume, o qual é três vezes maior do que os ovos de *A. kuehniella* (ZAMONER, 2005), contribuiu para que o aumento da densidade de fêmeas não afetasse a razão sexual. Esses resultados corroboraram com os obtidos por Greco e Stilinovic (1998) e Krechmer (2010), os quais obtiveram maior predominância de fêmeas de *T. pretiosum* tanto em ovos estocados em nitrogênio líquido quanto não estocados.

**Tabela 1.** Médias ( $\pm$  EP) da razão sexual e tempo de desenvolvimento (ovo-adulto) de *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido por 15 dias e não estocados, parasitados por diferentes números de fêmeas ( $n= 120$ ).

Número de fêmeas	Razão sexual <sup>NS</sup>		Teste de $X^2$	P (valor)
	Ovos estocados	Ovos não estocados		
4	0,76 $\pm$ 0,02	0,71 $\pm$ 0,02	0,362	> 0,050
8	0,75 $\pm$ 0,01	0,66 $\pm$ 0,03	1,047	> 0,050
12	0,72 $\pm$ 0,02	0,66 $\pm$ 0,01	0,510	> 0,050
	Tempo de desenvolvimento (dias)			
	Ovos estocados	Ovos não estocados	Teste Mann – Whitney	P (valor)
4	14,00 $\pm$ 0,00 aB	13,60 $\pm$ 0,11 bB	3,559	0,001
8	14,00 $\pm$ 0,00 aB	14,00 $\pm$ 0,05 aAB	1,000	0,324
12	14,50 $\pm$ 0,11 aA	14,10 $\pm$ 0,08 bA	2,847	0,007

NS= não significativo pelo teste de Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ) para a variável razão sexual. Médias seguidas de mesma letra minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ) e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ) para o tempo de desenvolvimento.

O tempo de desenvolvimento dos parasitoides que se desenvolveram em ovos estocados nas densidades de quatro e oito fêmeas foi 0,5 dias menor em relação à densidade de 12 fêmeas



( $H= 26,481$ ;  $p < 0,001$ ). A mesma diferença foi verificada nos parasitoides que se desenvolveram em ovos não estocados na densidade de quatro fêmeas quando comparada com 12 fêmeas ( $H= 17,605$ ;  $p < 0,001$ ) (Tabela 1). Estes resultados contrastam com os obtidos por Krechemer (2010) onde o tempo de desenvolvimento de *T. pretiosum* em ovos estocados foi de 17 dias. Essa diferença pode estar relacionada com o tempo de armazenamento dos ovos que neste experimento foi de 15 dias, enquanto que nos estudos realizados por Krechemer (2010) os ovos foram estocados por 30 dias. Os resultados observados no presente trabalho sugerem que na medida que aumenta o tempo de armazenamento há uma tendência de aumentar o tempo de desenvolvimento dos parasitoides.

### 3.3.2 Parasitismo por fêmeas de *T. pretiosum* criadas em ovos estocados por três gerações

Comparando-se o parasitismo por fêmeas de *T. pretiosum* criadas em ovos estocados durante três gerações com fêmeas criadas em ovos não estocados, observou-se que não houve diferença quando ambas parasitaram ovos estocados ( $> 8\%$ ) e não estocados ( $> 9\%$ ) (Tabela 2). No entanto, quando as fêmeas criadas em ovos estocados parasitaram ovos estocados o parasitismo foi  $1\%$  menor em relação ao parasitismo de ovos não estocados. Já em relação às fêmeas criadas em ovos não estocados, a diferença no parasitismo entre ovos estocados e não estocados não foi significativa.

A percentagem de emergência de parasitoides nos ovos estocados parasitados por fêmeas criadas em ovos estocados e fêmeas criadas em ovos não estocados foi de cerca de  $9\%$ , não havendo diferença entre elas. A diferença também não foi significativa na emergência de parasitoides originados de ovos não estocados parasitados por ambas as fêmeas, onde os índices ficaram entre  $97$  e  $98\%$  (Tabela 2), demonstrando que não é necessário uma criação constante de parasitoides em ovos estocados em nitrogênio líquido, pois não há uma adaptação das fêmeas a estes ovos. Quando a comparação foi feita separadamente em cada fêmea, analisando apenas a emergência em ovos estocados e não estocados verificou-se que em ovos estocados a emergência foi  $4\%$  menor em comparação aos ovos não estocados para ambas as fêmeas. Embora tenha ocorrido essa pequena diferença, os resultados indicam que os ovos de *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido são adequados para o parasitoide completar o seu desenvolvimento, pois segundo Navarro (1998) um hospedeiro de qualidade deve apresentar índices de emergência superiores a  $85\%$ .

**Tabela 2.** Médias ( $\pm$  EP) de parasitismo e emergência de *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido por 30 dias e ovos não estocados parasitados por fêmeas criadas durante três gerações em ovos de *Mythimna sequax* armazenados em nitrogênio líquido e ovos não armazenados (controle). ( $n= 80$ ).

Fêmeas de <i>Trichogramma pretiosum</i>	% Parasitismo		Teste	P (valor)
	Ovos estocados	Ovos não estocados		
Criadas em ovos estocados	84,75 $\pm$ 5,30 bA	98,00 $\pm$ 1,22 aA	$t= 2,435$	0,020
Criadas em ovos não estocados	84,25 $\pm$ 4,83 aA	90,53 $\pm$ 3,82 aA	$t= 1,012$	0,318
Teste	$t= 0,070$	$U= 136,00$		
P (valor)	0,945	0,129		
	% Emergência		Teste	P (valor)
	Ovos estocados	Ovos não estocados		
Criadas em ovos estocados	92,80 $\pm$ 1,67 bA	97,42 $\pm$ 1,70 aA	$t= 2,233$	0,031
Criadas em ovos não estocados	93,39 $\pm$ 1,23 bA	98,24 $\pm$ 0,74 aA	$t= 2,552$	0,015
Teste	$t= 0,251$	$t= 0,563$		
P (valor)	0,803	0,578		

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste t – Student ou t e Mann-Whitney ou U ( $P < 0,05$ ).

Cobert (1985) relata que parasitoides criados por várias gerações em um determinado hospedeiro desenvolvem um condicionamento pré-imaginal adquirido durante a fase imatura que faz com que os adultos tenham preferência por parasitar ovos do mesmo hospedeiro em que são mantidos. Entretanto, neste estudo verificou-se que tanto as fêmeas criadas em ovos de *M. sequax* não estocados quanto as fêmeas criadas em ovos estocados parasitam com sucesso ovos estocados em nitrogênio líquido, sem afetar a emergência das progenies. Portanto, não há necessidade de manter uma linhagem de *Trichogramma* criada somente em ovos estocados, o que pode contribuir para a redução de custos com mão-de-obra e manutenção das criações dos hospedeiros.

Os altos índices de parasitismo e emergência de *T. pretiosum* em ovos estocados obtidos neste experimento podem estar relacionados com a espécie hospedeira. Avanci e Foerster (2006) verificaram que ovos de *M. sequax* apresentam em sua composição maior reserva lipídica por se tratar de hospedeiro de inverno, o que pode refletir uma maior tolerância dos ovos à baixa temperatura. A estrutura do ovo, como a espessura do córion também pode

influenciar na qualidade da estocagem, pois um ovo com a estrutura mais frágil pode ser afetado pelo congelamento devido à formação de cristais de gelo no interior do ovo provocando o rompimento da membrana celular (CASTRO *et al.*, 2011).

A razão sexual dos parasitoides originados de ovos estocados foi de 0,8 enquanto que nos ovos não estocados a taxa foi entre 0,6 e 0,8 não havendo diferença entre os tratamentos pelo teste de qui-quadrado (Tabela 3). Houve uma maior predominância de fêmeas tanto nos ovos parasitados por fêmeas de *T. pretiosum* criadas em ovos estocados quanto não estocados. Segundo Navarro (1998) esses resultados estão dentro do padrão para essa espécie que deve ser igual ou superior a 0,50 (Tabela 3).

O tempo de desenvolvimento dos parasitoides em ovos estocados foi em torno de 16 dias tanto para fêmeas criadas em ovos estocados quanto para fêmeas criadas a partir de ovos não estocados, enquanto que para os parasitoides desenvolvidos em ovos não estocados o tempo foi de 14 dias (Tabela 3). Embora não haja relato na literatura, essa observação pode ser explicada pela ocorrência de alguma alteração fisiológica nos componentes nutricionais dos ovos durante o processo de congelamento. Essa maior duração no ciclo (ovo-adulto) também foi relatada por Krechmer (2010) ao estocar ovos de *M. sequax* em nitrogênio líquido por 30 dias e comprova que a medida que aumenta o tempo de estocagem dos ovos, há uma tendência de aumentar o tempo de desenvolvimento dos parasitoides.

**Tabela 3.** Médias ( $\pm$  EP) da razão sexual e do tempo de desenvolvimento (ovo-adulto) de *T. pretiosum* em ovos de *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido por 30 dias, parasitados por fêmeas criadas em ovos estocados em nitrogênio líquido e não estocados ( $n= 80$ ).

Fêmeas de <i>Trichogramma pretiosum</i>	Razão sexual <sup>ns</sup>		Teste $X^2$	P (valor)
	Ovos estocados	Ovos não estocados		
Criadas em ovos estocados	0,80 $\pm$ 0,01	0,60 $\pm$ 0,04	1,705	>0,050
Criadas em ovos não estocados	0,80 $\pm$ 0,05	0,80 $\pm$ 0,02	1,309	>0,050
	Tempo de desenvolvimento (dias)			
	Ovos estocados	Ovos não estocados	Teste t	P (valor)
Criadas em ovos estocados	16,35 $\pm$ 0,11 aA	14,10 $\pm$ 0,07 bB	17,405	<0,001
Criadas em ovos não estocados	16,60 $\pm$ 0,11 aA	14,84 $\pm$ 0,09 bA	12,331	<0,001

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste t-Student ( $P < 0,05$ ). \*NS= não significativo pelo teste de qui-quadrado ( $P < 0,05$ ).

Este estudo demonstrou que ovos de *M. sequax* são viáveis para a estocagem em nitrogênio líquido por 30 dias visando a produção massal de *Trichogramma*. Estudos realizados por Krechemer (2010) demonstram que ovos de *M. sequax* tem potencial para estocagem por períodos de até 90 dias com parasitismo de 58%. Entretanto, nossa hipótese é que os altos índices de parasitismo e emergência se mantenham por períodos superiores aos já estudados.

### 3.4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. Pode ser utilizado até uma fêmea para 10 ovos, não necessitando aumentar a densidade para obter um maior índice de parasitismo;
2. As fêmeas de *T. pretiosum* criadas em ovos estocados em nitrogênio líquido tiveram desempenho semelhante à fêmeas criadas em ovos não estocados em todos os parâmetros avaliados.

### AGRADECIMENTOS

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – Capes pela concessão da bolsa ao primeiro autor. Ao Prof. Dr. Edvaldo Silva Trindade e à doutoranda Stellee Marcela P. Biscaia do Laboratório de Biologia Celular pelas colaborações no uso do nitrogênio líquido.

### REFERÊNCIAS

AVANCI, M. do. R. F.; FOERSTER, L. A. Composição de lípidios em ovos de duas espécies de hospedeiros de *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e sua relação com a tolerância a baixas temperaturas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 21, 2006, Recife, PE. **Anais...** Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2006. 1 CD.

BAI, B.; LUCK, R. F.; FORSTER, L.; STEPHENS, B.; JANSSEN, J. A. M. The effect of host size on quality attributes of the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 64, p. 37-48, 1992.

BESERRA, E. B.; DIAS, C. T. S.; PARRA, J. R. P. Características biológicas de linhagens de *Trichogramma pretiosum* desenvolvidas em ovos de *Spodoptera frugiperda*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 25, n. 2, p. 479-483, 2003.

BERTELS, A. Pragas do trigo no campo e seu combate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 5, p. 81-89, 1970.

CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 957, 2011.

COBERT, S. A. Insect chemosensory responses: a chemical legacy hypothesis. **Ecological Entomology**, v.10, p. 143-153, 1985.

CÔNSOLI, F. L.; KITAJIMA, E. W.; PARRA, J. R. P. Ultrastructure of the natural and factitious host eggs of *Trichogramma galloi* Zucchi and *Trichogramma pretiosum* Riley (Hym., Trichogrammatidae). **Journal of Insect Morphology Embryology**, v. 28, p. 211-229, 1999.

CORRÊA-FERREIRA, B. S., OLIVEIRA, M. C. N. Viability of *Nezara viridula* (L.) eggs for parasitism by *Trissolcus basalus* (Woll.), under different storage techniques in liquid nitrogen. **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, v. 27, p. 101-107, 1998.

DOETZER, A. K., FOERSTER, L. A. Storage of Pentatomid Eggs in Liquid Nitrogen and Dormancy of *Trissolcus basalus* (Wollaston) and *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae) Adults as a Method of Mass Production. **Neotropical Entomology**, v. 42, p. 534-538, 2013.

FAVETTI, B. M., BUTNARIU, A. R.; DOETZER, A.K. Storage of *Euschistus heros* Eggs (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) in Liquid Nitrogen for Parasitization by *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae). **Neotropical Entomology**, v. 43, p. 291-293, 2014.

GEREMIAS, D. L.; PARRA, J. R. P.; Dispersal of *Trichogramma galloi* in corn for the control of *Diatraea saccharalis*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 7, p. 751-762, 2014.

GRECO, C. F., STILINOVIC, D. Parasitization performance of *Trichogramma* spp. (Hym., Trichogrammatidae) reared on eggs of *Sitotroga cerealella* Oliver (Lep., Gelechiidae), stored at freezing and subfreezing conditions. **Journal of Applied Entomology**, v. 122, p. 311-314, 1998.

GREENBERG, S. M., NORDLUND, D. A., WU, Z. Influence of rearing host on adult size and ovipositional behavior of mass produced female *Trichogramma minutum* Riley and *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Biological Control**, v. 11, p. 43-48, 1998.

HOFFMANN, M. P. O. P. R.; WALKER, D. L.; GARDNER, J.; NOUHUYS, S.; SHELTON, A. M. Performance of *Trichogramma ostriniae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) reared on factitious hosts, including the target host, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Biological Control**, v. 21, p. 1-10, 2001.

JALALI, S. K., SINGH, S. P. Differential response of four *Trichogramma* species to low temperatures for short term storage. **Entomophaga**, v. 37, n. 1, p. 159-165, 1992.

KRAZMER, D. J.; LUCK, R. F. Field tests of size-fitness hypothesis in the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum*. **Ecology**, v. 76, p. 412-425, 1995.

KRECHEMER, F. da S. *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae): **Biologia em ovos de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) e estocagem em baixas temperaturas de ovos de *Mythimna sequax* (Lepidoptera: Noctuidae)**. 65p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

MARCHIORO, C. A., FOERSTER, L. A. Performance of the wheat armyworm, *Mythimna sequax* Franclemont, on natural and artificial diets. **Neotropical Entomology**, v. 41, n. 4, p. 288-295, 2012.

MOREIRA, M. D.; SANTOS, M. C. F. dos; BESERRA, E. B.; TORRES, J. B.; ALMEIDA, R. P. Parasitismo e superparasitismo de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *Sitotroga cerealella* (Oliver) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 2, p. 237-242, 2009.

ÖZDER, N. Effect of different cold storage periods on parasitization performance of *Trichogramma cacoeciae* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) on eggs of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 14, n. 5, p. 441-447, 2004.

NAVA, D. E.; TAKAHASHI, K. M.; PARRA, J. R. P. Linhagens de *Trichogramma* e Trichogrammatoidea para controle de *Stenoma catenifer*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 1, p. 9-16, 2007.

NAVARRO, M. A. *Trichogramma* spp. **Producción, uso y manejo en Colombia**. Guadalajara de Buga, Imprectec, 1998, 176p.

PARON, M. J. F. O.; CIOCIOLA, A. I., CRUZ, I. Resposta de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae) a diferentes densidades de ovos do hospedeiro natural, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, v. 27, p. 427-433, 1998.

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

PEREIRA F. F.; BARROS, R.; PRATISSOLI, D.; PARRA, J. R. P. Biologia e exigências térmicas de *Trichogramma pretiosum* Riley e *T. exiguum* Pinto & Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae) criados em ovos de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Neotropical Entomology*, v. 33, p. 231-236, 2004.

PITCHER, S. A. HOFFMANN, M. P.; GARDNER, J.; WRIGHT, M. G.; KUCHAR, T. P. Cold storage of *Trichogramma ostriniae* reared on *Sitotroga cerealella* eggs. *Biocontrol*, v. 47, p. 25-535, 2002.

PIZZOL, J.; DESNEUX, N.; WAJNBERG, E.; THIÉRY, D. Parasitoid and host egg ages have independent impact on various biological traits in a *Trichogramma* species. *Journal of Pest Science*, v. 85, p. 489-496, 2012.

PRATISSOLI, D.; PARRA, J. R. P. Seleção de Linhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle das traças *Tuta absoluta* (Meyrick) e *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology*, v. 30, n. 2, p. 277-282, 2001.

SALT, G. The effects of hosts upon their insect parasites. *Biological Reviews*, v. 16, p. 239-263, 1941.

SALVADORI J. R.; PARRA, J. R. P. Desempenho de *Pseudaletia sequax* (Lep.: Noctuidae) em dietas naturais e artificiais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 25, n. 12, p. 1679-1686, 1990.

TEZZE, A. A., BOTTO, E. N. Effect of cold storage on the quality of *Trichogramma nerudai* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biological Control*, v. 30, p. 11-16, 2004.

URBANEJA, A.; GONZALEZ-CABRERA, J.; ARNÓ, J.; GABARRA, R. Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. *Pest Management Science*, v. 68, n. 9, p. 1215-1222, 2012.

ZAMONER, M. **Efeito do volume de ovos hospedeiros sobre o desenvolvimento, capacidade de parasitismo e longevidade de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae)**. 2005. 44f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Curso de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná.

#### 4 CAPÍTULO II – USO DE CRIOPROTETORES NO ARMAZENAMENTO DE OVOS DE *Mythimna sequax* (FRANCLEMONT, 1951) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM NITROGÊNIO LÍQUIDO VISANDO À PRODUÇÃO DE *Trichogramma* WESTWOOD

**RESUMO** – A criopreservação consiste na conservação de materiais biológicos em temperaturas ultrabaixas, geralmente a -196 °C. Dentre as inúmeras aplicações, esta técnica também tem sido empregada na estocagem de ovos de algumas espécies de insetos para a produção de parasitoides. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes crioprotetores intra e extracelulares sobre ovos de *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido visando à produção de *Trichogramma pretiosum*. No experimento 1, foram avaliadas diferentes concentrações de Dimetilsulfóxido - DMSO e Glicerol sobre ovos de *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido por dois métodos: congelamento gradual (-20 °C por 2 h, -80 °C por 24 h e -196 °C em nitrogênio líquido por 15 dias) e rápido (diretamente no nitrogênio líquido por 15 dias). Os tratamentos consistiram de ovos tratados com T1= 10% DMSO + 90% Soro fetal bovino, T2= 10% DMSO + 45% Soro fetal bovino+ 45% de meio de cultura líquido; T3= 10% DMSO + 90% meio de cultura; T4= 100% Glicerol; T5= 50% Glicerol + 50% meio de cultura; T6= 10% Glicerol + 90% meio de cultura; T7= ovos sem crioprotetor; T8= ovos não estocados em nitrogênio líquido. No experimento 2, foi avaliada a influência da adição de solução de sacarose a 100% em ovos de *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido que foi comparada com ovos estocados sem adição de sacarose e ovos não estocados. Os ovos permaneceram estocados durante 30 dias. No experimento 3, avaliou-se o uso de etilenoglicol e leite desnatado em ovos de *M. sequax* criopreservados, que foram comparados com ovos estocados sem adição desses crioprotetores e ovos não estocados. Os ovos foram mantidos em nitrogênio líquido por 30 dias. Após a retirada do nitrogênio e o descongelamento, os ovos foram expostos ao parasitismo por fêmeas de *T. pretiosum* durante 24 h. Em cada experimento, avaliou-se a porcentagem de parasitismo, a emergência e o tempo de desenvolvimento das progênies. No experimento 1, o congelamento gradual afetou o parasitismo por *T. pretiosum*, reduzindo o índice para menos de 12% em todos os tratamentos com ovos estocados. O congelamento rápido aumentou os índices de parasitismo, entretanto, o tratamento que mais se destacou foi o T7 que correspondeu aos ovos estocados sem adição de crioprotetor. No experimento 2, nos ovos tratados com sacarose obteve-se 66% de parasitismo, porém nos ovos sem adição de sacarose a porcentagem de parasitismo foi superior. No experimento 3, os ovos tratados com etilenoglicol foram os que apresentaram menor índice de parasitismo (24%) enquanto que o maior índice foi obtido nos ovos estocados sem adição de crioprotetores. Conclui-se que a adição de crioprotetores em ovos de *M. sequax* antes do congelamento em nitrogênio líquido não proporcionou o incremento no parasitismo por *Trichogramma*, sendo os melhores índices verificados nos ovos que não receberam adição de crioprotetores.

**PALAVRAS-CHAVE:** Dimetilsulfóxido, Etilenoglicol, Glicerol, Sacarose, Skim Milk



CRYOPROTECTANTS USE FOR THE STORAGE OF *Mythimna sequax*  
(FRANCLEMONT, 1951) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EGGS IN LIQUID NITROGEN  
AIMING AT THE PRODUCTION OF *Trichogramma* WESTWOOD

**ABSTRACT** - Cryopreservation is the preservation of biological materials in ultra-low temperatures, usually at  $-196^{\circ}\text{C}$ . Among the numerous applications, this technique has also been used in the storage of eggs of some species of insects for the production of parasitoids. This work aims to evaluate the effect of different intracellular and extracellular cryoprotectants on *Mythimna sequax* eggs stored in liquid nitrogen for the production of *Trichogramma pretiosum*. In experiment 1, different concentrations of Dimethylsulfoxide - DMSO and glycerol were evaluated on *M. sequax* eggs stored in liquid nitrogen by two methods: gradual freezing ( $-20^{\circ}\text{C}$  for 2 h,  $-80^{\circ}\text{C}$  for 24 h and  $-196^{\circ}\text{C}$  liquid nitrogen for 15 days) and fast (directly in liquid nitrogen for 15 days). The treatments consisted of eggs treated with T1 = 10% DMSO + 90% fetal bovine serum, T2 = 10% DMSO + 45% fetal bovine serum + 45% of a liquid culture medium; T3 = 10% DMSO + 90% culture medium; T4 = 100% Glycerol; T5 = 50% Glycerol + 50% culture medium; T6 = 10% Glycerol + 90% culture medium; T7 = eggs without cryoprotectants; T8 = eggs not-stored in liquid nitrogen. In experiment 2, we evaluated the effect of adding 100% sucrose solution on *M. sequax* eggs stored in liquid nitrogen and compared to eggs stored without addition of sucrose and non-stored eggs. The eggs remained stored for 30 days. In experiment 3, we evaluated the use of ethylene glycol and skim milk on *M. sequax* eggs cryopreserved and compared with stored eggs without the addition of cryoprotectants and non-stored eggs. The eggs were maintained in liquid nitrogen for 30 days. After the withdrawal of liquid nitrogen and thawing, the eggs were exposed to parasitism by *T. pretiosum* females for 24 h. In each experiment, we evaluated the parasitism rate, adult emergence and development time of progenies. In experiment 1, the gradual freezing affected parasitism by *T. pretiosum*, reducing to less than 12% in all treatments that were stored eggs. The rapid freezing improved parasitism, though the treatment that stood out was the T7 corresponding to eggs stored without addition of cryoprotectants. In experiment 2, the eggs treated with sucrose showed 66% of parasitism, but, the eggs without the addition of sucrose the percentage of parasitism was higher. In experiment 3, eggs treated with ethylene glycol were those with the lowest levels of parasitism (24%) while the highest rate was obtained in eggs stored without addition of cryoprotectants. It is concluded that the addition of cryoprotectants in *M. sequax* eggs before freezing in liquid nitrogen, did not increase the parasitism by *T. pretiosum*, and the best results were obtained with eggs without the addition of cryoprotectants.

**KEYWORDS:** Dimethylsulfoxide, Ethylene Glycol, Glycerol, Skim Milk, Sucrose

## 4.1 INTRODUÇÃO

A criopreservação é uma técnica muito utilizada em diversas áreas da biologia e consiste em preservar em temperaturas inferiores a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , materiais biológicos, como tecidos celulares, células animais e vegetais, fungos, bactérias, vírus e nematoides (WOLFE e BRYANT, 2001). Na área de entomologia, esta técnica tem sido aplicada na preservação de embriões de insetos (GUANG-HONG *et al.*, 2001) para fins de estudos genéticos, preservação de banco de espécies e na produção massal de parasitoides de ovos (CORRÊA-FERREIRA e OLIVEIRA, 1998; DOETZER e FOERSTER *et al.*, 2013). Uma das principais vantagens desta técnica é o armazenamento dos ovos hospedeiros por longos períodos (CORRÊA-FERREIRA e OLIVEIRA, 1998).

A estocagem em nitrogênio líquido pode ser realizada utilizando-se o método de congelamento lento, onde o material biológico é resfriado em etapas ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ou congelamento rápido, onde as amostras são inseridas diretamente no nitrogênio líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (CASTRO *et al.*, 2011). A fim de se evitar injúrias nas células, são empregados agentes crioprotetores intracelulares como etilenoglicol, glicerol, dimetilsulfóxido e extracelulares como sacarose, skim milk, trealose (RALL *et al.*, 1984; CASTRO *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2015) cuja função é evitar a formação de cristais de gelo no interior das células. Os crioprotetores extracelulares atuam no aumento da osmolaridade do meio externo, facilitando a passagem da água do interior da célula para o meio extracelular, enquanto que os intracelulares se ligam a moléculas de água reduzindo as concentrações de soluto no meio extracelular e intracelular (HUBALÉK, 2003).

Inúmeros trabalhos tem sido realizados buscando desenvolver protocolos para criopreservação de embriões de várias espécies de insetos na América do Norte, Ásia e Europa, para *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) (BANNO *et al.*, 2013), *Pectnophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae) (RAJAMOHAN *et al.*, 2013), *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (GUANG-HONG *et al.*, 2001; LUO *et al.*, 2006), *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) (ROVERSI *et al.*, 2008), *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) (WANG *et al.*, 2000) e *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae) (LEOPOLD *et al.*, 2010). Nestes trabalhos, os autores utilizaram agentes crioprotetores com ação intra e extracelulares visando a sobrevivência de embriões (GUANG-HONG *et al.*, 2001), enquanto que na criopreservação de ovos hospedeiros visando a produção de parasitoides esses agentes não são empregados (CORRÊA-FERREIRA *et al.*, 1998; GRECO e STILINOVIC, 1998; KRECHEMER, 2010).

A criopreservação de ovos de lepidópteros visando à produção de *Trichogramma* ainda é pouco explorada, embora existam trabalhos promissores para o emprego desta técnica. Krechmer (2010) demonstrou que resultados satisfatórios podem ser obtidos com ovos de *Mythimna sequax* (Franclemont, 1951) (Lepidoptera: Noctuidae). Neste sentido, a utilização de ovos de *M. sequax*, além de apresentar potencial para a aplicação da técnica de estocagem, é uma alternativa para atender a demanda de produção de *Trichogramma* para o controle de lepidópteros-pragas que apresentem ovos mais volumosos, como ovos de noctuídeos, cuja família abrange as principais pragas de grandes culturas. Estudos realizados por Krechmer (2010) e Zamoner (2005) indicam o potencial para a produção de *Trichogramma* que *M. sequax* apresenta, pois esta espécie proporciona indivíduos robustos, longevos e com alta capacidade reprodutiva.

Entretanto, para que a criopreservação seja aplicada com sucesso em ovos de *M. sequax* faz-se necessário investigar métodos que busquem o aprimoramento da técnica para que os ovos dessa espécie hospedeira se tornem viáveis ao parasitismo por *Trichogramma*. Portanto, este trabalho objetivou testar o efeito de diferentes crioprotetores intra e extracelulares em ovos de *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido avaliando parâmetros como parasitismo, emergência e tempo de desenvolvimento de *T. pretiosum*.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Criação de insetos

As criações de *M. sequax* foram mantidas em laboratório, a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa e fotoperíodo de 12L: 12D. As lagartas foram mantidas em dieta artificial adaptada por Marchioro e Foerster (2012) até a fase de pupa. Os adultos foram liberados em gaiolas de madeira (40 x 30 x 27 cm) com as laterais cobertas com tela de náilon e alimentados com mel diluído em água (10%). Os ovos foram colocados em substrato de oviposição composto de tiras papel de seda sanfonadas.

Os parasitoides foram mantidos em tubos de vidro (1,0 x 10 cm), na mesma temperatura do seu hospedeiro. A cada dois dias, aproximadamente 100 ovos de *M. sequax* foram ofertados ao parasitismo por *T. pretiosum*. Os adultos foram alimentados com mel puro distribuído em filetes no interior do tubo de vidro.

#### 4.2.2 Congelamento e descongelamento dos ovos

Ovos de *M. sequax* com 24 horas de idade foram transferidos para criotubos com capacidade para 2 mL (Corning®) na quantidade aproximada de 400 ovos por tubo. Os ovos permaneceram em nitrogênio líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 e 30 dias. Os ovos tratados com os crioprotetores foram descongelados em banho-maria a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos, pois, a partir desse período alguns crioprotetores poderiam apresentar ação tóxica para os ovos. Após o descongelamento, os ovos tratados foram lavados com água destilada, exceto no tratamento com etilenoglicol, para a remoção dos agentes crioprotetores. Já os ovos não tratados, foram descongelados em banho-maria a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, cujo tempo foi padronizado a partir de experimentos prévios com estocagem de ovos de *M. sequax*. Todos os experimentos foram conduzidos em temperatura de  $20\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $70\pm 10\%$  de umidade relativa e 12L: 12D de fotoperíodo.

#### 4.2.3 Efeito da aplicação de dimetilsulfóxido – DMSO e glicerol no armazenamento de ovos de *M. sequax* em nitrogênio líquido

Avaliou-se o efeito dos crioprotetores intracelulares Glicerol e dimetilsulfóxido em ovos de *M. sequax* visando uma maior proteção dos ovos durante o congelamento. Os tratamentos consistiram de ovos de *M. sequax* tratados com: T1= 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) + 90% de soro fetal bovino, T2= 10% DMSO + 45% soro fetal bovino + 45% de meio de cultura líquido utilizado para cultivo celular, T3= 10% DMSO + 90% de meio de cultura líquido, T4= 100% glicerol, T5= 50% glicerol + 50% meio de cultura líquido, T6= 10% glicerol + 90% meio de cultura líquido, T7= ovos sem adição de crioprotetor e T8= controle (ovos não estocados em nitrogênio líquido). Após o preparo, as soluções de cada tratamento foram transferidas para criotubos e, em seguida, aproximadamente 400 ovos de *M. sequax* com 24 h de idade foram imersos nas soluções.

Os ovos de todos os tratamentos, exceto o controle, foram submetidos à dois métodos de congelamento: gradual e rápido. No congelamento gradual, as amostras foram mantidas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 h e a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h e em seguida transferidas para o nitrogênio líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Outra parte das amostras foi colocada diretamente em nitrogênio líquido, processo denominado vitrificação. Os ovos permaneceram armazenados em nitrogênio líquido durante 15 dias, pois o objetivo foi avaliar a concentração e o método de congelamento (gradual ou rápido) ideal dos agentes crioprotetores.

Após a retirada do nitrogênio e o descongelamento, ovos de *M. sequax* de cada tratamento foram transferidos para tubos de vidro (1 x 10 cm) e ofertados ao parasitismo, durante 24 h por fêmeas de *T. pretiosum* com até 48 h de idade. As fêmeas foram alimentadas com filetes de mel no interior de cada tubo. O delineamento foi inteiramente casualizado com 20 repetições e oito tratamentos. Cada repetição foi composta por 20 ovos de *M. sequax* e duas fêmeas de *T. pretiosum*.

#### 4.2.4 Efeito da aplicação de sacarose no armazenamento de ovos de *M. sequax* em nitrogênio líquido

Este experimento avaliou o efeito de um crioprotetor extracelular em ovos de *M. sequax* para melhorar a proteção dos ovos durante o congelamento. Os tratamentos consistiram de ovos de *M. sequax* tratados com solução de sacarose a 100% dissolvida em água destilada, ovos não tratados e controle (ovos não estocados em nitrogênio líquido). Após o preparo, 2 mL da solução foram transferidos para criotubos com capacidade para 2 mL. Em seguida, aproximadamente 400 ovos de *M. sequax* com 24 h de idade foram imersos na solução de sacarose. Esse tratamento foi comparado com ovos não tratados estocados em nitrogênio líquido e com ovos não estocados. Os ovos foram congelados por vitrificação e permaneceram estocados em nitrogênio líquido por 30 dias.

Após o descongelamento, os ovos de cada tratamento foram transferidos para tubos de vidro (1 x 10 cm) e ofertados ao parasitismo, durante 24 h, por fêmeas de *T. pretiosum* com até 48 h de idade. As fêmeas foram alimentadas com filetes de mel no interior de cada tubo. O delineamento foi inteiramente casualizado com 20 repetições e três tratamentos. Cada repetição foi composta por 40 ovos de *M. sequax* e quatro fêmeas de *T. pretiosum*.

#### 4.2.5 Efeito da aplicação de etilenoglicol e leite desnatado no congelamento dos ovos de *M. sequax* em nitrogênio líquido

O objetivo deste estudo foi adaptar um protocolo de criopreservação de embriões de *S. exigua* (GUANG-HONG *et al.*, 2001) utilizando como crioprotetor intracelular etilenoglicol, para a criopreservação de ovos de *M. sequax* visando a produção de *Trichogramma*. O efeito do etilenoglicol foi comparado com ovos tratados com crioprotetor extracelular a base de leite desnatado, denominado “skim milk”, utilizado para congelamento de microorganismos em baixas temperaturas. O parasitismo por *Trichogramma* em ovos de *M. sequax* tratados com

ambos os crioprotetores foram comparados com o parasitismo em ovos estocados sem adição de crioprotetores e ovos não estocados (controle).

*Tratamento com etilenoglicol.* Ovos de *M. sequax* inicialmente passaram por um processo de permeabilização, no qual foi feita a decorionização dos ovos em solução de hipoclorito (15%) durante 6 minutos. Em seguida, os ovos foram imersos em solução de isopropanol durante 15 segundos para remover a água da superfície. Posteriormente, foi realizada a imersão em hexano por 30 segundos para dissolver a camada de cera da superfície dos ovos. Após a permeabilização, os ovos foram colocados em solução de etilenoglicol (2 mols/L) por 30 minutos para a desidratação dos ovos. Em sequência, uma solução de etilenoglicol na concentração de 8,5 mol/L com adição de 10% de solução de albumina bovina (BSA) foi transferida para criotubos e em seguida foram imersos na solução aproximadamente 400 ovos de *M. sequax* com 24 h de idade. As amostras foram mantidas em nitrogênio líquido por 30 dias.

*Tratamento com leite desnatado.* Para o preparo da solução foram adicionados em 1 L de água destilada, 10 g de leite em pó, 1 g de Triptona e 1 mL de Tris (Hidroximetil) Aminometano (pH 7,5). Em seguida, a solução foi autoclavada por 30 minutos a 109 °C e mantida em refrigerador a 6 °C até o resfriamento. Aproximadamente 400 ovos de *M. sequax* de 24 h de idade foram introduzidos nos criotubos (2 mL) contendo a solução de leite desnatado, e em seguida levados ao congelamento em nitrogênio líquido por 30 dias.

*Ovos sem tratamento com crioprotetores.* Ovos de *M. sequax* com 24 h de idade foram transferidos na quantidade aproximada de 400 ovos para criotubos (capacidade 2 mL). Em seguida, foram armazenados em nitrogênio líquido durante 30 dias.

*Descongelamento.* Os ovos tratados com etilenoglicol foram descongelados através de enxágue em 20 mL de meio de cultura líquido pré-aquecido a 37 °C, enquanto que, os ovos tratados com leite desnatado e ovos não tratados com crioprotetores foram descongelados em banho-maria a 37 °C durante 5 minutos. Após o descongelamento, os ovos foram transferidos para tubos de vidro (1 x 10 cm) e expostos ao parasitismo, durante 24h, por fêmeas de *T. pretiosum* com idade de até 48 h. As fêmeas foram alimentadas com filetes de mel no interior de cada tubo. Para efeito de comparação também foram ofertados ovos de *M. sequax* não estocados em nitrogênio líquido como controle. O delineamento foi inteiramente casualizado

com 20 repetições e quatro tratamentos. As repetições foram compostas por 20 ovos de *M. sequax* e duas fêmeas de *T. pretiosum*.

#### 4.2.6 Parâmetros avaliados e análise estatística

Foram avaliadas a porcentagem de parasitismo, a emergência e o tempo de desenvolvimento dos parasitoides. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade pelo teste de Levene. As variâncias não foram consideradas normais e homogêneas, portanto, tiveram os efeitos dos tratamentos comparados utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Teste H) ( $P < 0,05$ ).

### 4.3 RESULTADOS

#### 4.3.1 Efeito da aplicação de dimetilsulfóxido – DMSO e glicerol no armazenamento de ovos de *M. sequax* em nitrogênio líquido

O congelamento lento dos ovos de *M. sequax* antes da estocagem em nitrogênio líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  afetou o parasitismo por *T. pretiosum* em todos os tratamentos. Utilizando-se esta técnica, o índice de parasitismo tanto em ovos tratados com DMSO quanto em ovos com Glicerol nas diferentes concentrações não passou de 12%. Os ovos que não receberam tratamento com crioprotetores apresentaram 1,4% de ovos parasitados, diferentemente do controle que apresentou 90% de parasitismo dos ovos de *M. sequax* (H: 75,908;  $p < 0,001$ ) (Tabela 1). Embora o parasitismo tenha sido baixo, a emergência se manteve alta em todos os tratamentos ( $> 80\%$ ), não havendo diferença entre eles (H: 7,691;  $p = 0,361$ ).

O maior índice de parasitismo foi verificado nos ovos que não receberam adição de crioprotetor (84,2%). Os tratamentos T3 (10% DMSO+ 90% meio de cultura) e T6 (10% glicerol+ 90% meio de cultura) que receberam menores concentrações dos crioprotetores não diferiram de T7 (ovos sem crioprotetor) e T8 (ovos não estocados). Enquanto que nos demais tratamentos o índice de parasitismo foi inferior a 58% (H: 51,847;  $p < 0,001$ ) (Tabela 1). O índice de emergência de adultos que mais se aproximou do controle (T8) foi verificado nos ovos estocados em nitrogênio líquido sem adição de crioprotetor ( $> 93\%$ ), porém de um modo geral a maioria dos tratamentos apresentaram emergência superior a 82%, exceto o tratamento T1 (10% DMSO+ 90% Soro fetal bovino) que apresentou 76,7 % emergência dos parasitoides (H: 31,874;  $p < 0,001$ ).

O tempo de desenvolvimento dos parasitoides obtidos de ovos tratados com crioprotetores e estocados foi em média de 1-2 dias a mais que no controle (H: 66,982;  $p < 0,001$ ) (Tabela 1). O tempo de desenvolvimento das progênes que se desenvolveram nos ovos estocados e tratados ou não com os crioprotetores foi superior ao desenvolvimento das progênes em ovos não estocados (H: 56,727;  $p < 0,001$ ) (Tabela 1). Entretanto, o método de congelamento rápido não afetou o parasitismo por *T. pretiosum* em ovos de *M. sequax* tratados com as diversas concentrações de crioprotetores.

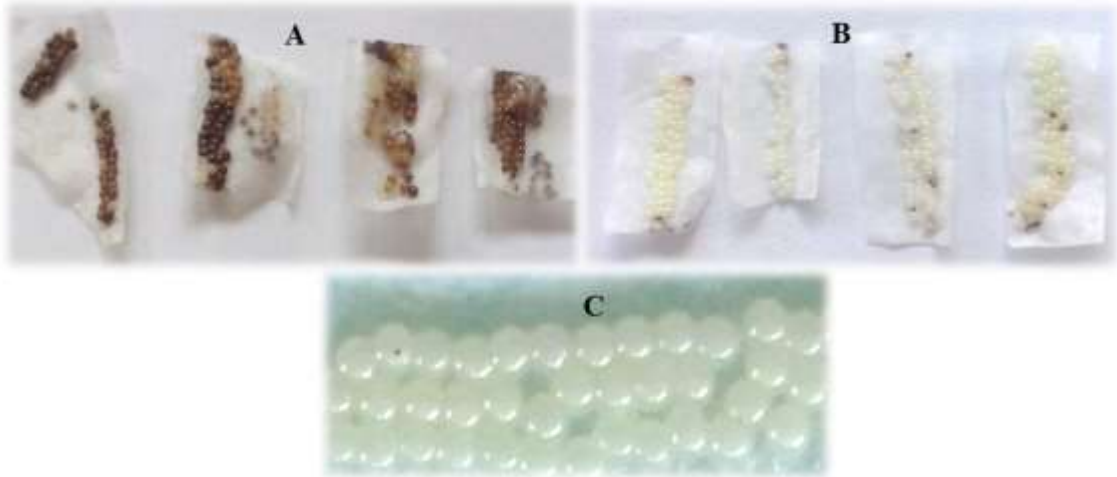
**Tabela 1.** Médias ( $\pm$  EP) da porcentagem de parasitismo, emergência e tempo de desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Mythimna sequax* tratados com diferentes concentrações de dimetilsulfóxido - DMSO e glicerol, estocados em nitrogênio líquido por dois diferentes métodos: congelamento gradual e rápido durante 15 dias. ( $n=320$ ). ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa e 12L: 12D de fotoperíodo).

Tratamentos	Parasitismo	Emergência	Tempo de desenvolvimento (dias)
	%	%	
Congelamento lento			
T1	12,30 $\pm$ 4,10 b	93,62 $\pm$ 2,47 a	16,25 $\pm$ 0,05 a
T2	11,00 $\pm$ 2,40 b	95,83 $\pm$ 2,90 a	16,13 $\pm$ 0,04 a
T3	9,00 $\pm$ 2,80 b	81,71 $\pm$ 6,58 a	16,08 $\pm$ 0,05 a
T4	2,40 $\pm$ 1,20 b	97,78 $\pm$ 2,22 a	15,80 $\pm$ 0,04 ab
T5	3,30 $\pm$ 1,40 b	96,43 $\pm$ 3,57 a	16,14 $\pm$ 0,04 a
T6	8,80 $\pm$ 4,30 b	90,53 $\pm$ 4,86 a	16,40 $\pm$ 0,05 a
T7	1,40 $\pm$ 1,10 c	96,67 $\pm$ 3,85 a	16,25 $\pm$ 0,05 ab
T8	90,50 $\pm$ 3,70 a	98,24 $\pm$ 0,76 a	14,84 $\pm$ 0,04 b
Congelamento rápido			
T1	50,75 $\pm$ 5,63 cd	76,74 $\pm$ 4,66 c	17,35 $\pm$ 0,26 a
T2	53,50 $\pm$ 6,75 cd	85,93 $\pm$ 4,92 abc	15,95 $\pm$ 0,55 b
T3	67,50 $\pm$ 8,78 abc	86,20 $\pm$ 2,38 abc	16,39 $\pm$ 0,14 ab
T4	34,50 $\pm$ 5,14 d	82,30 $\pm$ 5,02 bc	17,00 $\pm$ 0,16 ab
T5	58,50 $\pm$ 7,08 bcd	84,88 $\pm$ 3,13 abc	16,84 $\pm$ 0,13 ab
T6	75,50 $\pm$ 5,48 abc	88,31 $\pm$ 1,71 abc	16,55 $\pm$ 0,15 ab
T7	84,25 $\pm$ 4,83 ab	93,39 $\pm$ 1,70 ab	16,60 $\pm$ 0,11 ab
T8	90,52 $\pm$ 3,72 a	98,24 $\pm$ 0,74 a	14,84 $\pm$ 0,08 c

Tratamentos: T1= 10% DMSO + 90% SFB; T2= 10% DMSO + 45% SFB + 45% de meio de cultura; T3= 10% DMSO + 90% meio de cultura; T4= 100% Glicerol; T5= 50% Glicerol + 50% meio de cultura; T6= 10% Glicerol + 90% meio de cultura; T7= ovos sem crioprotetor; T8= ovos não estocados em nitrogênio líquido. Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).



A figura 1 demonstra a deterioração causada pelo método de congelamento lento quando comparada com o congelamento dos ovos pelo método rápido e ovos congelados, porém, não tratados com crioprotetores.



**Figura 1.** Ovos de *Mythimna sequax* tratados com crioprotetores dimetilsulfóxido e glicerol submetidos ao congelamento gradual (A), congelamento rápido (B) e ovos submetidos ao congelamento rápido sem adição de crioprotetor (C).

#### 4.3.2 Efeito da aplicação de sacarose no armazenamento de ovos de *M. sequax* em nitrogênio líquido

Os ovos tratados com sacarose apresentaram uma porcentagem de parasitismo de 67%, resultado inferior ao observado nos ovos que não receberam adição de sacarose e a testemunha (H: 28,238;  $p < 0,001$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Médias ( $\pm$  EP) da porcentagem de parasitismo, emergência e tempo de desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Mythimna sequax*, com e sem adição de sacarose (100%), estocados em nitrogênio líquido por 30 dias e ovos não estocados ( $n = 60$ ). ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa e 12L: 12D de fotoperíodo).

Tratamento	Parasitismo %	Emergência %	Tempo de desenvolvimento (dias)
Ovos tratados com sacarose	$66,87 \pm 3,55$ b	$87,49 \pm 1,47$ b	$16,30 \pm 0,11$ a
Ovos não tratados e estocados	$90,75 \pm 2,33$ a	$87,31 \pm 2,58$ b	$14,10 \pm 0,05$ b
Ovos não estocados	$92,00 \pm 1,46$ a	$95,51 \pm 1,01$ a	$13,65 \pm 0,11$ b

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).  
<sup>1</sup>Controle= ovos não estocados.

A porcentagem de emergência não diferiu entre os ovos tratados e não tratados com sacarose e foram inferiores aquela verificada em ovos não estocados, diferindo-os apenas do controle (H: 20,181;  $p < 0,001$ ) (Tabela 2).

A duração do ciclo (ovo-adulto) dos parasitoides que se desenvolveram em ovos estocados tratados com sacarose foi de dois dias a mais do que nos ovos estocados não tratados e nos ovos não estocados (H: 40,331;  $p < 0,001$ ) (Tabela 2).

#### 4.3.3 Efeito da aplicação de etilenoglicol e leite desnatado no congelamento dos ovos de *M. sequax* em nitrogênio líquido

Os ovos tratados com etilenoglicol e com leite desnatado foram os que apresentaram os menores índices de parasitismo por *T. pretiosum*. Novamente, a maior porcentagem de parasitismo foi registrada quando os ovos foram estocados em nitrogênio líquido sem a adição de crioprotetor, não diferindo do controle (53,598;  $p < 0,001$ ) (Tabela 3).

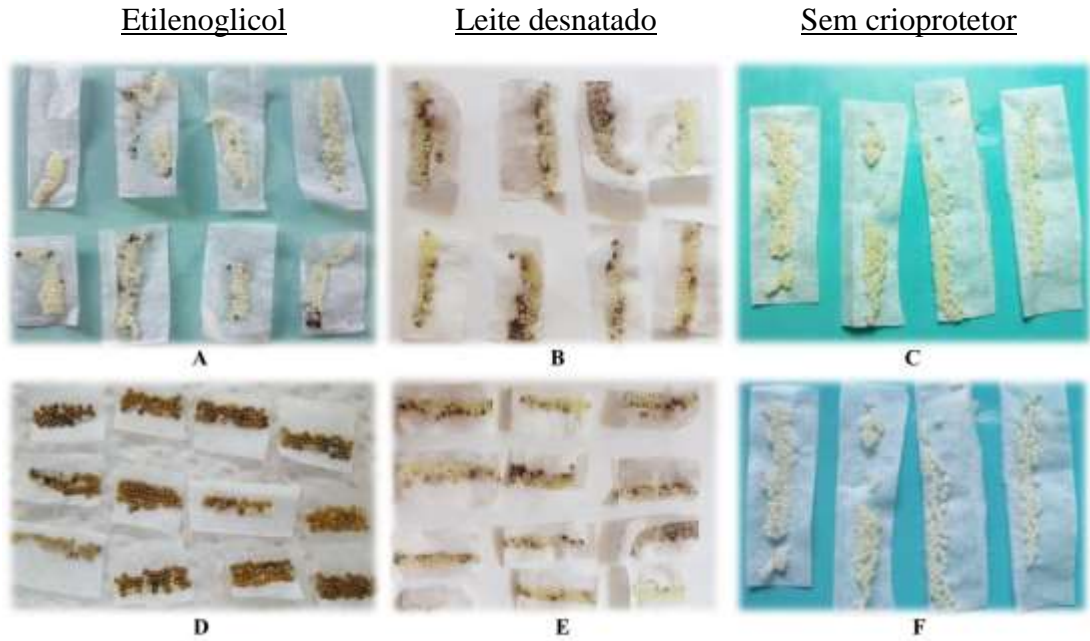
**Tabela 3.** Médias ( $\pm$  EP) da porcentagem de parasitismo, emergência e tempo de desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Mythimna sequax* tratados com etilenoglicol, leite desnatado e ovos sem adição de crioprotetor, estocados em nitrogênio líquido por 30 dias e comparados com ovos não estocados. ( $n = 80$ ). ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa e 12L: 12D de fotoperíodo).

Tratamentos	Parasitismo %	Emergência %	Tempo de desenvolvimento (dias)
Etilenoglicol	24,25 $\pm$ 4,67 b	41,19 $\pm$ 7,87 c	17,17 $\pm$ 0,20 a
Leite desnatado	50,75 $\pm$ 6,70 b	78,40 $\pm$ 3,81 b	16,72 $\pm$ 0,11 a
Sem crioprotetor	84,75 $\pm$ 5,30 a	92,80 $\pm$ 1,28 ab	16,35 $\pm$ 0,11 a
Controle <sup>1</sup>	98,00 $\pm$ 1,26 a	97,28 $\pm$ 1,67 a	14,10 $\pm$ 0,07 b

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

<sup>1</sup>Controle= ovos não estocados.

A emergência dos parasitoides nos tratamentos com adição de crioprotetores foi inferior ao controle. O índice de emergência dos ovos estocados em nitrogênio líquido sem a adição de crioprotetores foi superior (92,8%) aos ovos tratados com crioprotetores e semelhante ao controle (46,152;  $p < 0,001$ ). A figura 2 demonstra a alteração na estrutura dos ovos tratados com os crioprotetores etilenoglicol e leite desnatado comparada com ovos não tratados.



**Figura 2.** Ovos de *M. sequax* tratados com etilenoglicol, leite desnatado e ovos não tratados recém tirados do nitrogênio líquido (A, B e C) e ovos 2 h após o descongelamento (D, E e F).

O tempo de desenvolvimento dos parasitoides foi influenciado pelo armazenamento dos ovos (51,695;  $p < 0,001$ ). As progênes originadas de ovos estocados demoraram de dois a três dias a mais para emergirem em comparação às progênes originadas de ovos não estocados.

#### 4.4 DISCUSSÃO

O parasitismo por *T. pretiosum* foi afetado pelo congelamento lento dos ovos de *M. sequax* tratados com as diferentes concentrações de DMSO e Glicerol. Os ovos que passaram pelo congelamento em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ficaram completamente deteriorados e de aparência marrom escura, comprometendo o parasitismo por *T. pretiosum*. A baixa porcentagem de parasitismo foi atribuída ao congelamento gradual, pois mesmo os ovos que não receberam adição de crioprotetores deterioraram-se, enquanto que os ovos submetidos ao congelamento rápido apresentaram índices de parasitismo superiores. A deterioração dos ovos pelo congelamento lento pode ter sido causada pela formação de cristais de gelo no interior das células provocando o rompimento das membranas. Segundo Castrol *et al.* (2011) a formação de cristais de gelo nas células diminui quando o material biológico é congelado por vitrificação ou congelamento rápido.

Os ovos de *M. sequax* que receberam as menores concentrações de DMSO e Glicerol foram os que apresentaram as porcentagens de parasitismo mais próximas dos ovos estocados

não tratados (84%) e o controle (90%). As maiores concentrações de DMSO e Glicerol causaram deterioração dos ovos provavelmente devido a sua toxicidade. A deterioração pode ter ocorrido no momento do descongelamento, pois durante esse processo alguns crioprotetores intracelulares podem apresentar efeito tóxico ao entrar em contato com a célula. Segundo Fuller e Paynter (2004) a eficiência de crioprotetores intracelulares como DMSO e glicerol depende do tipo de material biológico a ser criopreservado, da concentração e do tempo de exposição antes e depois do processo de congelamento.

Como congelamento gradual provocou a deterioração dos ovos, os demais testes foram realizados utilizando-se o método de congelamento por vitrificação, onde os ovos são colocados diretamente em nitrogênio líquido. O parasitismo por *T. pretiosum* foi afetado pelo tratamento dos ovos com sacarose, etilenoglicol e leite desnatado. O leite desnatado e a sacarose são comumente empregados no congelamento de diversos microorganismos, como por exemplo lactobacilos (REDDY *et al.*, 2009). Embora esses agentes crioprotetores sejam utilizados na criopreservação de diversos materiais biológicos eles não foram eficientes na proteção dos ovos durante o congelamento de ovos de *M. sequax* em nitrogênio líquido. Dentre os crioprotetores, o etilenoglicol foi o que mais causou uma drástica redução no parasitismo dos ovos de *M. sequax*, mesmo seguindo os processos de permeabilização, desidratação e vitrificação dos ovos, recomendado nos protocolos de criopreservação de embriões de algumas espécies de insetos (LEOPOLD *et al.*, 2001).

De um modo geral, a adição de crioprotetores e os diferentes tipos de congelamento dos ovos de *M. sequax* não afetaram a emergência de adultos de *T. pretiosum*. A maioria dos crioprotetores empregados neste estudo apresentaram índices de emergência superiores a 82% se aproximando dos ovos estocados não tratados e dos ovos não estocados, exceto o etilenoglicol. Embora Guang-hong *et al.* (2001) e Luo *et al.* (2006) tenham observado que o etilenoglicol foi o crioprotetor menos tóxico para os embriões do noctuídeo *Spodoptera exigua*, este foi o crioprotetor que mais afetou a emergência de *T. pretiosum*.

Em relação ao tempo de desenvolvimento, em todos os experimentos, os parasitoides que se desenvolveram em ovos estocados, tratados com crioprotetores ou não tratados apresentaram em média 1-2 dias a mais no tempo de desenvolvimento em comparação aos ovos não estocados. Esses resultados mostram que a influência foi da estocagem e não dos crioprotetores. Krechemer (2010) ao estocar ovos de *M. sequax* em nitrogênio líquido observou que o tempo de desenvolvimento de *T. pretiosum* foi superior ao desenvolvimento dos ovos não estocados.

A maioria dos estudos de criopreservação de ovos visando a produção de parasitoides tem sido realizada sem a adição de crioprotetores e tem apresentado bons resultados de parasitismo e emergência. Corrêa-Ferreira e Oliveira (1998) obtiveram índices de parasitismo e emergência superiores a 90% de *T. basalis* em ovos de *N. viridula* estocados por até um ano. No entanto, a criopreservação de ovos de lepidópteros, apesar de ser promissora ainda precisa ser aprimorada. Krechmer (2010) obteve bons resultados, com índices de parasitismo superior a 58% e emergência de 90% em ovos de *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido sem adição de crioprotetores. Neste sentido, o tratamento dos ovos poderia ajudar a incrementar o índice de parasitismo, no entanto, os melhores resultados no presente estudo ainda foram os obtidos dos ovos não tratados com agentes crioprotetores, cujos resultados foram significativamente superiores aos ovos tratados e semelhantes aos ovos não estocados.

Este resultado demonstra que a técnica de criopreservação de ovos de *M. sequax* não requer o emprego de agentes crioprotetores, dessa forma o custo da utilização desta técnica para produção de *Trichogramma* se torna mais barato.

#### 4.5 CONCLUSÃO

O congelamento gradual dos ovos de *M. sequax* causou a deterioração do ovos afetando o parasitismo por *T. pretiosum*. As menores concentrações de DMSO e Glicerol apresentaram maiores porcentagens de parasitismo por *T. pretiosum* em relação às demais concentrações. De um modo geral, os índices de parasitismo e emergência de *T. pretiosum* foram superiores nos ovos estocados sem crioprotetor.

#### AGRADECIMENTOS

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – Capes pela concessão da bolsa ao primeiro autor. À equipe do laboratório de Biologia Celular da UFPR: Prof. Dr. Edvaldo Silva Trindade, doutoranda Stellee Marcela P. Biscaia, mestrando Daniel de Lima Bellan e à doutoranda Ana Paula Andrezza do laboratório de Bioquímica da UFPR pelas colaborações nas conduções dos experimentos.

## REFERÊNCIAS

- BANNO, Y.; NAGASAKI, K.; TSUKADA, M.; MINOHARA, Y.; BANNO, J.; NISHIKAWA, K.; YAMAMOTO, K.; TAMURA, K.; FUJII, T. Development of a method for long-term preservation of *Bombyx mori* silkworm strains using frozen ovaries. **Cryobiology**, v. 66, p. 283-287, 2013.
- CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 957, 2011.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, M. C. N. Viability of *Nezara viridula* (Linnaeus) eggs for parasitism by *Trissolcus basalis* (Woll.), under different storage techniques in liquid nitrogen. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, p. 101–107, 1998.
- DOETZER, A. K., FOERSTER, L. A. Storage of Pentatomid Eggs in Liquid Nitrogen and Dormancy of *Trissolcus basalis* (Wollaston) and *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae) Adults as a Method of Mass Production. **Neotropical Entomology**, v. 42, p. 534–538, 2013.
- FERNANDES, R.C.S.; PINHEIRO, M.S.; GÓIS, P.B.P.; BARRETO, D. M. Análise crítica da utilização do congelamento para conservação de amostras de urina destinadas à urocultura. **Interfaces Científicas**, v. 3, n. 2, p. 29 – 30, 2015.
- FULLER, B.; PAYNTER, S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 9, p. 680-869, 2004.
- GRECO, C. F., STILINOVIC, D. Parasitization performance of *Trichogramma* spp. (Hym., Trichogrammatidae) reared on eggs of *Sitotroga cerealella* Oliver (Lep., Gelechiidae), stored at freezing and subfreezing conditions. **Journal of Applied Entomology**, v. 122, p. 311-314, 1998.
- GUANG-HONG, L.; YI, P.; QI-JIN, C.; ZHI-JIAN, S. Cryopreservation of the beet armyworm eggs. **Entomologia Sinica**, v. 8, p. 124-130, 2001.
- HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, p. 205-229, 2003.

KRECHEMER, F. da S. *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae): **Biologia em ovos de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) e estocagem em baixas temperaturas de ovos de *Mythimna sequax* (Lepidoptera: Noctuidae)**. 65p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

LEOPOLD, R. A., WANG, W. B., BERKEBILE, D. R.; FREEMAN, T. P. Cryopreservation of embryos of the New World Screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). **Annals of Entomological Society of America**, v. 94, p. 695–701, 2001.

LEOPOLD, R. A.; RAJAMOCHAN, A.; SHELLY, T. E.; ALFRED, M. H. Quality testing of three species of tephritid fruit flies after embryo cryopreservation. **Annals of the Entomological Society America**, v. 103, n. 2, p. 264-272, 2010.

LUO, L.; PANG, Y.; CHEN, Q.; LI, G. Cryopreservation of the late stage embryos of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **CryoLetters**, v. 27, n. 6, p. 341-352, 2006.

MARCHIORO, C. A.; FOERSTER, L. A. Performance of the wheat armyworm, *Mythimna sequax* Franclemont, on natural and artificial diets. **Neotropical Entomology**, v. 41, n. 4, p. 288-295, 2012.

RAJAMOCHAN, A. RINEHART, J. P.; FOSTER, S. P.; LEOPOLD, R. A. Permeability barriers to embryo cryopreservation of *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 2, p. 855-861, 2013.

RALL, W.F.; REID, D.S.; POLGE, C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physicochemical methods. **Cryobiology**, v. 21, p. 106-121, 1984.

REDDY, K. B. P. K.; AWASTHI, S. P.; MADHU, A. N.; PRAPULLA, S. G. Role of cryoprotectants on the viability and functional properties of probiotic lactic acid bacteria during freeze drying. **Food Biotechnology**, v. 23, p. 243–265, 2009.

ROVERSI, P. F.; COSI, E.; IRDANI, T. Chill sensitivity and cryopreservation of eggs of the greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Cryobiology**, v. 56, p. 1-7, 2008.

WANG, W. B.; LEOPOLD, R. A.; NELSON, D. R.; FREEMAN, T. P. Cryopreservation of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) embryos. **Cryobiology**, v. 41, p. 153–166, 2000.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v. 24, p. 438-450, 2001.

ZAMONER, M. **Efeito do volume de ovos hospedeiros sobre o desenvolvimento, capacidade de parasitismo e longevidade de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae)**. 2005. 44f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Curso de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná.



**5 CAPÍTULO III – CAPACIDADE REPRODUTIVA E DESENVOLVIMENTO DE QUATRO ESPÉCIES DE *Trichogramma* WESTWOOD (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE) EM OVOS DE *Mythimna sequax* (FRANCLEMONT, 1951) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) ESTOCADOS EM NITROGÊNIO LÍQUIDO**

**Resumo** Avaliou-se a capacidade de parasitismo e emergência de *Trichogramma pretiosum* Riley, *Trichogramma atopovirilia* Oatman e Platner, *Trichogramma exiguum* Pinto e Platner e *Trichogramma galloi* Zucchi em ovos de *Mythimna sequax* Franclemont estocados em nitrogênio líquido e a capacidade de parasitismo das progênes obtidas destes ovos. Durante 30 dias, ovos de *M. sequax* foram estocados em nitrogênio líquido e após o descongelamento em banho-maria a 37 °C por 5 minutos foram ofertados a fêmeas das quatro espécies de parasitoides. Foram utilizados como controle ovos de *M. sequax* não estocados. As quatro espécies apresentaram índice de parasitismo e emergência acima de 80 % nos ovos de *M. sequax* estocados por 30 dias e não diferiram da taxa de parasitismo e emergência obtida em ovos não estocados. A estocagem não afetou a capacidade reprodutiva das progênes. No parasitismo acumulado durante quatro dias *T. atopovirilia* foi a espécie que apresentou a maior capacidade reprodutiva. A técnica de estocagem de ovos de *M. sequax* em nitrogênio líquido mostrou-se viável para a produção das quatro espécies de *Trichogramma* uma vez que a capacidade reprodutiva e o desenvolvimento dos parasitoides não foram afetados pela estocagem do ovo hospedeiro em relação a ovos não estocados.

**Palavras-chave:** *Trichogramma atopovirilia*, *Trichogramma exiguum*, *Trichogramma galloi*, *Trichogramma pretiosum*, Criopreservação, Produção massal

REPRODUCTIVE CAPACITY AND DEVELOPMENT OF FOUR *Trichogramma* WESTWOOD (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE) SPECIES REARED ON *Mythimna sequax* (FRANCLEMONT, 1951) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EGGS STORED IN LIQUID NITROGEN

**Abstract** The rates of parasitism and emergence of *Trichogramma pretiosum* Riley, *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner, *Trichogramma exiguum* Pinto and Platner, and *Trichogramma galloi* Zucchi on eggs of *Mythimna sequax* Franclemont stored in liquid nitrogen, and the fitness of the progenies reared on these eggs were evaluated. Eggs of *M. sequax* were stored in liquid nitrogen for 30 days and after defrosting in a water bath at 37 °C for 5 minutes were offered to females of the four parasitoid species. Were used as control non-stored eggs of *M. sequax*. Parasitism and emergence rates from *M. sequax* eggs stored for 30 days for the four parasitoid species were above 80%. No differences in parasitism and emergence rates were found between stored and non-stored eggs. Storage in liquid nitrogen did not affect the reproductive capacity of progenies. *T. atopovirilia* showed the highest reproductive capacity based on the parasitism rate accumulated during four days. The storage of *M. sequax* eggs in liquid nitrogen was a feasible alternative for the production of the four species of *Trichogramma*, as the reproductive capacity and development of parasitoids were not affected by the storage of the host egg compared to that of non-stored eggs.

**Keywords:** *Trichogramma atopovirilia*, *Trichogramma exiguum*, *Trichogramma galloi*, *Trichogramma pretiosum*, Cryopreservation, Mass rearing

## 5.1 INTRODUÇÃO

Lepidópteros da família Noctuidae correspondem à maioria das pragas que atacam grandes culturas (Avanci et al. 2005; Andrade et al. 2011). Dentre eles estão *Chrysodeixis includens* Walker (Bueno et al. 2012), *Helicoverpa armigera* Hübner (Gundannavar e Giraddi 2014; Macfadyen et al. 2015), *Helicoverpa zea* Boddie (Manandhar e Wrigth 2015), *Heliothis virescens* Fabricius (Andrade et al. 2011), *Spodoptera cosmioides* Walker (Cabezas et al. 2013), *Spodoptera frugiperda* Smith (Díaz et al. 2012) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Cañete e Foerster 2003; Avanci et al. 2005; Foerster et al. 2015) que recentemente foi agrupada na família Erebidae.

Para minimizar o problema, o controle desses lepidópteros-praga é realizado através de aplicações de inseticidas químicos. O emprego do controle biológico por *Trichogramma* é uma alternativa que visa reduzir o uso de inseticidas nas culturas (Avanci et al. 2005). A produção massal desses parasitoides é realizada a partir de ovos de microlepidópteros *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), *Sitotroga cerealella* (Olivier) (Lepidoptera: Gelechiidae) e *Corcyra cephalonica* (Stainton) (Lepidoptera: Pyralidae) (Hassan 1981; Greenberg et al. 1998; Zheng et al. 2003). No entanto, os parasitoides originados desses hospedeiros apresentam dificuldade em parasitar ovos mais volumosos, como os ovos de noctuídeos (Krazmer e Luck 1995; Greenberg et al. 1998; Hoffmann et al. 2001). Neste sentido, a produção massal utilizando-se ovos de um noctuídeo atenderia a demanda de produção de *Trichogramma* para utilização no controle de diversos lepidópteros-pragas que apresentam ovos volumosos.

*Mythimna sequax* Franclemont (Franclemont, 1951) (Lepidoptera: Noctuidae), cujos ovos são três vezes mais volumosos do que os ovos de *A. kuehniella* (Cônsoi et al. 1999; Zamoner 2005), apresentam potencial para produção de *Trichogramma*. Adultos obtidos de tais ovos são mais robustos, longevos e com alta capacidade reprodutiva (Zamoner 2005; Krechmer 2010). Além da facilidade e custo reduzido na criação quando comparado com outros noctuídeos (Marchioro e Foerster 2012), *M. sequax* possui alta capacidade reprodutiva tanto em dieta natural (Foerster 1996) quanto artificial, com fecundidade média de 1.200 ovos (Marchioro e Foerster 2012).

Para atender à demanda de produção de *Trichogramma* em grande escala, é necessário o desenvolvimento de tecnologias de produção que permitam a sincronização entre a liberação de parasitoides e os períodos de maior ocorrência das pragas alvos no campo (Pitcher et al. 2002; Tezze e Botto 2004; Colinet e Boivin 2011). Uma das alternativas para incrementar a

produção massal de *Trichogramma* é a criopreservação de ovos hospedeiros em nitrogênio líquido para utilização nos períodos de maior demanda.

Dentre outras aplicações, a criopreservação é uma técnica empregada na preservação de embriões de insetos, tais como, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (Guanghong et al. 2001), *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Diptera: Calliphoridae) (Leopold et al. 2001), entre outros. A principal vantagem desta técnica é a estocagem de ovos por períodos prolongados (Corrêa-Ferreira et al., 1998). No Brasil, a criopreservação é utilizada com sucesso na produção massal dos parasitoides de ovos *Trissolcus basalus* (Wollaston) e *Telenomus podisi* (Ashmead) (Hymenoptera: Scelionidae) que parasitam ovos de pentatomídeos (Corrêa-Ferreira e Oliveira 1998; Doetzer e Foerster 2013; Favetti et al. 2014).

Em lepidópteros, a técnica mais estudada é a estocagem de ovos em temperaturas que variam entre 0 e 10 °C, porém, com ovos já parasitados por *Trichogramma*. Este método empregado tem produzido índices de emergência em torno de 60 % e por períodos de estocagem de no máximo dois meses (Jalali e Sing 1992; Pitcher et al. 2002; Özder 2004; Spínola-Filho et al. 2014). A técnica de estocagem em nitrogênio líquido, apesar de pouco explorada, tem apresentado percentuais de parasitismo por *Trichogramma* inferiores a 60 % (Greco e Stilinovic, 1998; Krechemer, 2010). Embora promissores, esses resultados necessitam ser melhorados com o aprimoramento da técnica.

Além do hospedeiro e da tecnologia de produção, o sucesso de uma criação massal também depende da seleção de espécies de *Trichogramma* que apresentem características de maior afinidade com o hospedeiro e que possuam ampla distribuição geográfica (Tezze e Botto 2004). *Trichogramma pretiosum* é a espécie mais utilizada em liberações inundativas em diversos países (Smith 1996). Essa espécie juntamente com *Trichogramma atopovirilia* (Oatman e Platner) caracterizam-se por parasitarem ovos da família Noctuidae (Foerster e Avanci 1999, Cañete e Foerster, 2003; Parra e Zucchi 2004, Andrade et al. 2011). Enquanto que *Trichogramma galloi* (Zucchi) e *Trichogramma exiguum* (Pinto e Platner) são espécies utilizadas principalmente no controle de *Diatraea sacharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) e *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) (Monje et al. 1999; Tabone et al. 1999).

Portanto, neste trabalho comparou-se a capacidade de parasitismo de *T. atopovirilia*, *T. exiguum*, *T. galloi* e *T. pretiosum* em ovos de *M. sequax* estocados e não estocados em nitrogênio líquido, pois diferentes espécies de *Trichogramma* podem ter desempenho distinto sobre os ovos estocados.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Manutenção dos insetos

Os parasitoides e os ovos de *M. sequax* utilizados nos experimentos foram obtidos de criações mantidas em laboratório, em temperatura de  $20 \pm 1$  °C,  $70 \pm 10$  % RH e 12: 12 h de fotofase. Na fase larval, *M. sequax* foi criada com dieta artificial (Marchioro e Foerster 2012). Os adultos foram liberados em gaiolas de madeira com 40 cm x 30 cm x 27 cm, com laterais cobertas com tela de náilon e alimentados com mel diluído em água a 10 %. Como substrato para oviposição foram utilizados papéis de seda, dobrados em forma de sanfona, colocados nas paredes da gaiola. Os parasitoides *T. atopovirilia*, *T. exiguum*, *T. galloi* e *T. pretiosum* foram mantidos em tubos de vidro com 1,0 cm de diâmetro x 10 cm de comprimento e alimentados com filetes de mel no interior de cada tubo. As fêmeas de cada espécie de *Trichogramma* receberam cerca de 100 ovos de *M. sequax* a cada dois dias para a manutenção das espécies em laboratório.

### 5.2.2 Estocagem de ovos

Aproximadamente 400 ovos de *M. sequax* com até 24 horas de idade foram separados em pequenas posturas aderidos à papel de seda e transferidos para criotubos com capacidade para 2 mL (Corning®). Em seguida, os criotubos foram colocados em nitrogênio líquido a  $-196$  °C por 30 dias. Após este período, os ovos foram retirados e descongelados em banho-maria a  $37$  °C durante 5 minutos.

### 5.2.3 Desenvolvimento e emergência

Ovos de *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido e ovos não estocados foram transferidos para tubos de vidro (1,0 cm de diâmetro x 10 cm de comprimento) e expostos ao parasitismo por fêmeas de *T. atopovirilia*, *T. exiguum*, *T. galloi* e *T. pretiosum* durante 24 horas. As fêmeas foram alimentadas com filetes de mel no interior de cada tubo. O delineamento foi inteiramente casualizado com oito tratamentos e 20 repetições. Para cada espécie, a repetição foi composta por 20 ovos e duas fêmeas em cada tubo, mantidas em temperatura de  $20 \pm 1$  °C,  $70 \pm 10$  % RH e 12: 12 h de fotofase. Avaliou-se a porcentagem de parasitismo, a emergência dos adultos, a razão sexual e o tempo de desenvolvimento (ovo-adulto).

#### 5.2.4 Capacidade de parasitismo e longevidade das progênes

Após a emergência dos adultos, foram avaliadas a capacidade de parasitismo e a longevidade das progênes de cada espécie. Os indivíduos foram mantidos em tubos de vidro (1,0 cm de diâmetro x 10 cm de comprimento) e alimentados com mel. Comparou-se a capacidade de parasitismo e a fecundidade de fêmeas obtidas de ovos estocados em nitrogênio líquido com fêmeas provenientes de ovos não estocados. Após 24 h da emergência dos parasitoides foram individualizadas 20 fêmeas de cada espécie provenientes de ovos estocados e não estocados, as quais receberam, diariamente, 20 ovos de *M. sequax* não estocados, durante quatro dias consecutivos. Os ovos permaneceram expostos ao parasitismo durante 24 h. Avaliou-se a percentagem de ovos parasitados em quatro dias. Para a avaliação da longevidade foram selecionados 20 casais de cada tratamento com observações diárias realizadas até a morte de todos os indivíduos.

#### 5.2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade pelo teste de Shapiro- Wilk e homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene ( $P < 0,05$ ). A comparação entre ovos estocados e não estocados para cada espécie de *Trichogramma* foi feita através do teste t de Student e Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ). A razão sexual foi calculada pelo número de fêmeas/ (número de machos + número de fêmeas) e analisada através do teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ( $P < 0,05$ ) tendo como valor esperado a proporção de machos e fêmeas de *Trichogramma* obtidas de ovos não estocados. As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Statistica v. 8.0 (Statsoft Inc 2008).

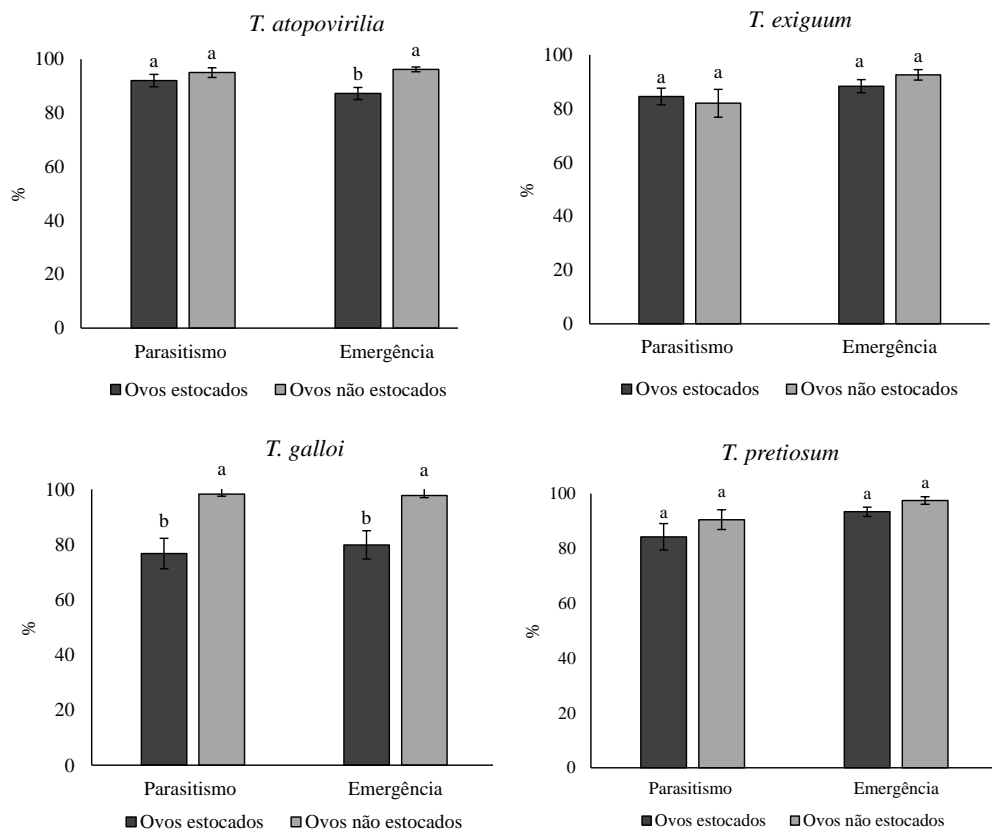
### 5.3 RESULTADOS

#### 5.3.1 Desenvolvimento e emergência

O parasitismo das quatro espécies de *Trichogramma* em ovos estocados não diferiu estatisticamente ( $H = 5,888$ ;  $p = 0,117$ ), embora *T. atopovirilia* tenha se destacado com 92 % de parasitismo, seguidos de *T. pretiosum*, *T. exiguum* com 84 % e *T. galloi* com 77 % dos ovos parasitados (Fig. 1). Também não houve diferença significativa na comparação do parasitismo

entre ovos estocados e não estocados para *T. atopovirilia* ( $t= 1,023$ ;  $p= 0,313$ ), *T. exiguum* ( $t = 0,415$ ;  $p= 0,681$ ) e *T. pretiosum* ( $t= 1,035$ ;  $p= 0,307$ ). Em *T. galloi* o parasitismo de ovos estocados foi menor (77 %) do que em ovos não estocados (98 %) ( $U= 70,50$ ;  $p < 0,001$ ) (Fig. 1).

O maior índice de emergência de parasitoides originados de ovos estocados foi verificado em *T. pretiosum* (93 %), seguido de *T. exiguum* (88 %), *T. atopovirilia* (87 %) e *T. galloi* (80 %). Não houve diferença na emergência de adultos de *T. exiguum* ( $t= 1,351$ ;  $p= 0,185$ ) e *T. pretiosum* ( $t= 1,863$ ;  $p= 0,070$ ) emergidos de ovos estocados em comparação aos não estocados. *Trichogramma atopovirilia* ( $U= 87,50$ ;  $p= 0,002$ ) e *T. galloi* ( $U= 43,00$ ;  $p < 0,001$ ) apresentaram porcentagem de emergência inferior nos ovos estocados em relação aos ovos não estocados (Fig. 1).



**Fig. 1** Porcentagem média ( $\pm$  EP) de parasitismo e emergência de adultos das espécies de *Trichogramma* em ovos de *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido por 30 dias e ovos não estocados. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si na comparação de ovos estocados e não estocados em cada espécie pelo teste t- Student e Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ).

O tempo de desenvolvimento dos parasitoides em ovos estocados foi maior do que em ovos não estocados para *T. atopovirilia* ( $t= 6,919$ ;  $p < 0,001$ ) (1,05 dias) *T. exiguum* ( $U= 66,50$ ;  $p < 0,001$ ) (0,65 dias), *T. galloi* ( $t= 5,305$ ;  $p < 0,001$ ) (0,96 dias) e *T. pretiosum* ( $t= 12,58$ ;  $p < 0,001$ ) (1,75 dias) (Tabela 1). A razão sexual apresentou maior proporção de fêmeas do que de machos, tanto para as progênes originadas de ovos estocados quanto não estocados para *T. atopovirilia* ( $\chi^2= 3,310$ ;  $p > 0,050$ ), *T. exiguum* ( $\chi^2= 0,040$ ;  $p > 0,050$ ), *T. galloi* ( $\chi^2= 0,000$ ;  $p > 0,050$ ) e *T. pretiosum* ( $\chi^2= 1,321$ ;  $p > 0,050$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1** Média ( $\pm$  EP) do tempo de desenvolvimento, razão sexual e longevidade das progênes de *Trichogramma* spp. originados de ovos de *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido por 30 dias e em ovos não estocados ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$  T;  $70 \pm 10\%$  RH; 12L: 12D fotoperíodo).

Tratamentos	Razão sexual <sup>ns</sup>	Tempo de desenvolvimento (dias)	Longevidade (dias)	
			Fêmea	Macho
<i>T. atopovirilia</i>				
Ovos estocados	0,81 $\pm$ 0,01	16,70 $\pm$ 0,11 a	18,70 $\pm$ 1,47 a	11,85 $\pm$ 0,92 a
Ovos não estocados	0,64 $\pm$ 0,05	15,65 $\pm$ 0,11 a	17,60 $\pm$ 1,16 a	13,05 $\pm$ 1,04 a
<i>T. exiguum</i>				
Ovos estocados	0,98 $\pm$ 0,01	17,00 $\pm$ 0,07 a	17,30 $\pm$ 1,16 b	8,43 $\pm$ 1,41 b
Ovos não estocados	0,99 $\pm$ 0,00	16,35 $\pm$ 0,11 b	21,05 $\pm$ 1,28 a	13,43 $\pm$ 1,77 a
<i>T. galloi</i>				
Ovos estocados	1,00 $\pm$ 0,00	18,26 $\pm$ 0,15 a	21,75 $\pm$ 1,33 a	-
Ovos não estocados	1,00 $\pm$ 0,00	17,30 $\pm$ 0,11 b	17,30 $\pm$ 1,08 b	-
<i>T. pretiosum</i>				
Ovos estocados	0,76 $\pm$ 0,04	16,60 $\pm$ 0,11 a	17,15 $\pm$ 1,12 a	15,75 $\pm$ 1,04 a
Ovos não estocados	0,76 $\pm$ 0,02	14,85 $\pm$ 0,08 b	18,75 $\pm$ 1,72 a	15,65 $\pm$ 0,98 a

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste t- Student e Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ). \*NS= não significativo pelo teste de qui-quadrado ( $P < 0,05$ ).

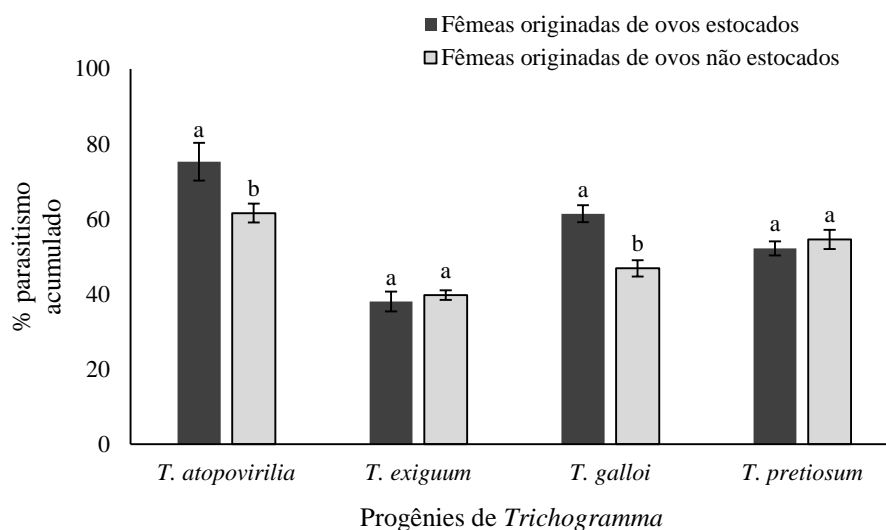
A longevidade das fêmeas variou entre 17 a 22 dias, enquanto que os machos viveram entre 8 a 16 dias tanto em ovos estocados quanto em ovos não estocados (Tabela 1). Os machos e fêmeas de *T. atopovirilia* e *T. pretiosum* originados de ovos estocados não diferiram no tempo de sobrevivência quando comparados com as progênes originadas de ovos não estocados. Entretanto, a longevidade das progênes de *T. exiguum* provenientes de ovos estocados foi menor tanto para machos (5 dias) quanto para fêmeas (4 dias). Já as fêmeas de *T. galloi* oriundas



de ovos estocados viveram quatro dias a mais em relação as originadas de ovos não estocados. Não houve emergência de machos de *T. galloi* (Tabela 1).

A maior porcentagem de parasitismo acumulado em quatro dias foi verificada nas progênes de *T. atopovirilia* que originaram de ovos estocados (75 %) quando comparada com progênes da mesma espécie originadas de ovos não estocados (61 %) ( $U= 104,50$ ;  $p= 0,010$ ) (Figura 2). O mesmo foi verificado em *T. galloi*, onde o parasitismo das fêmeas originadas de ovos não estocados (61 %) foi superior ( $t= 4,617$ ;  $p< 0,001$ ) às fêmeas oriundas de ovos não estocados (47 %). Não houve diferença no parasitismo das fêmeas originadas de ovos estocados e não estocados para *T. pretiosum* ( $t= 0,746$ ;  $p= 0,460$ ) e *T. exiguum* ( $U= 186,00$ ;  $p= 0,705$ ) (Figura 2).

O maior percentual de ovos parasitados ocorreu no primeiro dia após a emergência das fêmeas quando mais de 90 % dos ovos foram parasitados, tanto nas progênes de ovos estocados quanto de ovos não estocados. O menor parasitismo foi verificado nas progênes de *T. exiguum* originadas de ovos estocados (73 %) e ovos não estocados (70 %).



**Fig. 2** Médias ( $\pm$  EP) da porcentagens de ovos de *Mythimna sequax* parasitados por progenies de espécies de *Trichogramma* provenientes de ovos estocados e não estocados durante quatro dias consecutivos ( $n= 80$ ). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si para cada espécie pelo teste t-Student ( $P< 0,05$ ).

## 5.4 DISCUSSÃO

As quatro espécies de parasitoides avaliadas parasitam, desenvolvem-se e emergem dos ovos estocados em nitrogênio líquido em proporções semelhantes aos ovos não estocados. As espécies de *Trichogramma* avaliadas neste trabalho apresentaram taxas de parasitismo superiores a 84 %. A técnica de produção de parasitoides do gênero *Trichogramma* atualmente baseia-se na produção em grande escala de hospedeiros obtidos a partir de espécies de microlepidópteros que são criados na fase larval em farinhas. No entanto, os resultados alcançados com a estocagem de ovos de *M. sequax* abrem a perspectiva de produção de *Trichogramma* com maior capacidade reprodutiva e longevidade do que aqueles originados de ovos menos volumosos, como já observado por Nagarkatti et al. (1991) utilizando ovos de um hospedeiro de maior volume como *M. sexta*. Andrade et al. (2011) utilizaram fêmeas de *T. atopovirilia*, *T. exiguum* e *T. pretiosum* mantidas em ovos de *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) e verificaram o parasitismo de no máximo 43 % em ovos de *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). Estudos realizados por Salt (1941) mostraram que hospedeiros de menor volume, como *S. cerealella*, originam parasitoides menores e menos vigorosos. Os resultados mostraram que ovos de *M. sequax* produzem parasitoides com alta capacidade reprodutiva, morfológica e fisiologicamente mais apta a um controle efetivo de pragas com ovos mais volumosos, como *H. zea* (Greenberg et al. 1998), *H. armigera* (Nurindah et al. 1999), *A. gemmatalis* (Foerster et al. 2015) e outros lepidópteros que possuem ovos de maior volume.

A estocagem de ovos de *M. sequax* produziu resultados significativamente superiores aos relatados por Greco e Stilinovic (1998), que estocaram ovos de *S. cerealella* em nitrogênio líquido por 20 e 130 dias e registraram taxas de parasitismo por *T. pretiosum* de 43 % e 69 % de emergência de adultos. Os resultados obtidos com a estocagem de ovos de *M. sequax* em nitrogênio líquido é uma alternativa promissora para a produção de *Trichogramma*. A técnica de estocagem em nitrogênio líquido é utilizada com sucesso na produção dos parasitoides de ovos de pentatomídeos *T. basalis* e *T. podisi* (Corrêa-Ferreira e Oliveira 1998, Doetzer e Foerster 2013, Favetti et al. 2014) para serem liberados no período de ocorrência dos percevejos na cultura da soja. Corrêa-Ferreira e Oliveira (1998) relatam a produção de *T. basalis* a partir de ovos de *N. viridula* estocados em nitrogênio líquido por um ano com viabilidade superior a 90 %.

A razão sexual das espécies de *Trichogramma* originadas de ovos estocados resultou na predominância de fêmeas com valor superior a 76 %, demonstrando a qualidade nutricional do

hospedeiro, sendo esse valor um indicativo para o sucesso de uma criação massal de *Trichogramma* (Navarro 1998). A razão sexual em torno de 76 % foi verificada por Díaz et al. (2012) para *T. pretiosum*, *T. atopovirilia* e *T. exiguum* em ovos não estocados de *S. cerealella*, indicando que a estocagem dos ovos de *M. sequax* em nitrogênio líquido não afeta a razão sexual das espécies de *Trichogramma*. Nos ovos parasitados por *T. galloi* ocorreu apenas a emergência de fêmeas, tanto em ovos estocados quanto em ovos não estocados. Provavelmente a população de *T. galloi* mantida em laboratório deve ser telítoca, pois só ocorre produção de fêmeas. Há registros na literatura de associação de espécies de *Trichogramma* com bactérias do gênero *Wolbachia*, que são capazes de reverter o sexo, fazendo com que as progêneses se reproduzam por partenogênese telítoca (Stouthamer et al. 1990). Embora *T. galloi* seja comumente empregado no controle de *D. saccharalis* (Monje et al. 1999), essa espécie demonstrou potencial para utilização no controle de noctuídeos quando criados em ovos de *M. sequax*.

A estocagem de ovos de *M. sequax* não afetou a longevidade de fêmeas (17 a 22 dias) e machos (8-16 dias) nas espécies de *Trichogramma* avaliadas, exceto *T. exiguum* onde a longevidade das progêneses foi menor do que as originadas de ovos não estocados. Entretanto, esse hospedeiro originou parasitoides mais longevos quando comparados com parasitoides originados de outros hospedeiros. Parasitoides com longevidade de 13 dias foram relatados por Foerster et al. (2014) quando criados em ovos de *A. gemmatalis* não estocados. Díaz et al. (2012) observaram uma longevidade de aproximadamente cinco dias para adultos de *T. pretiosum*, *T. atopovirilia* e *T. exiguum* oriundos de ovos não estocados de *S. cerealella*.

A maioria das progêneses de *Trichogramma* parasitaram mais de 90 % dos ovos no primeiro dia de parasitismo, no entanto, *T. atopovirilia* se destacou no parasitismo ao longo dos quatro dias de ovos ofertados. A capacidade de parasitismo das quatro espécies de *Trichogramma* avaliadas não foi afetada pelos parasitoides terem se desenvolvido em ovos estocados em nitrogênio líquido por 30 dias. Esses resultados contrastam com os estudos realizados por Jalali e Singh (1992) que demonstraram uma redução no parasitismo das progêneses de *Trichogramma achaeae* (Nagaraja and Nagarkatti), *Trichogramma eldanae* (Viggiani), *Trichogramma chilonis* (Ishii) e *Trichogramma japonicum* (Ashmead) originados de ovos de *C. cephalonica* estocados em baixas temperaturas (2, 5 e 10 °C) por 35 dias apresentando percentuais de parasitismo de no máximo 23 %. Ayvaz et al. (2008) verificaram 26 % de parasitismo em progêneses de *Trichogramma evanescens* (Westwood) originadas de ovos de *E. kuehniella* estocados a 4 °C durante três semanas.

O presente trabalho demonstrou que as quatro espécies avaliadas são passíveis de serem produzidas através de ovos de *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido por 30 dias, pois os parasitoides obtidos de ovos estocados mantiveram as mesmas características de parasitoides oriundos de ovos não estocados. Esse hospedeiro quando armazenado adequadamente, provavelmente pode ser utilizado para a produção massal de outras espécies de *Trichogramma* spp.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes pela concessão da bolsa ao primeiro autor.

## REFERÊNCIAS

- Ayvaz A, Karasu E, Karabörklü S, Tunçbilek AS (2008) Effects of cold storage, rearing temperature, parasitoid age and irradiation on the performance of *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *J Stored Prod Res* 44:232-240
- Andrade GS, Pratisoli D, Dalvi LP, Desneux N, Santos Junior HJG (2011) Performance of four *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) as biocontrol agents of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) under various temperature regimes. *J Pest Sci* 84:313-320
- Avanci MRF, Foerster LA, Cañete CL (2005) Natural parasitism in eggs of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) by *Trichogramma* spp. (Hymenoptera, Trichogrammatidae) in Brazil. *Rev Bras Entomol* 49:148-151
- Bai B, Luck RF, Forster L, Stephens B (1992) The effect of host size on quality attributes of the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum*. *Entomol Exp Appl* 64:37-48
- Bueno RCOF, Parra JRP, Bueno AF (2012) *Trichogramma pretiosum* parasitism of *Pseudoplusia includens* and *Anticarsia gemmatalis* eggs at different temperatures. *Biol Control* 60:154–162

Cabezas FG, Melo M, Garcia MS, Diez-Rodrigues GL, Nava DE (2013) Parasitism of *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) on *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae) at different temperatures. *Rev Colomb Entomol* 39:216-220

Cañete CL, Foerster LA (2003) Incidência natural e biologia de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner, 1983 (Hymenoptera, Trichogrammatidae) em ovos de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera, Noctuidae). *Rev Bras Entomol* 47: 201-204

Colinet H, Boivin G (2011) Insect parasitoids cold storage: A comprehensive review of factors of variability and consequences. *Biol Control* 58:83-95

Cônsoli FL, Kitajima EW, Parra JRP (1999) Ultrastructure of the natural and factitious host eggs of *Trichogramma galloi* Zucchi and *Trichogramma pretiosum* Riley (Hym., Trichogrammatidae). *J Insect Morph Embry* 28:211-229

Corrêa-Ferreira BS, Oliveira MCN (1998) Viability of *Nezara viridula* (L.) eggs for parasitism by *Trissolcus basalus* (Woll.), under different storage techniques in liquid nitrogen. *An Soc Entomol Brasil* 27:101-107

Díaz MF, Ramírez A, Poveda K (2012) Efficiency of different egg parasitoids and increased floral diversity for the biological control of noctuid pests. *Biol Control* 60:182-191

Doetzer AK, Foerster LA (2013) Storage of pentatomid eggs in liquid nitrogen and dormancy of *Trissolcus basalus* (Wollaston) and *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae) adults as a method of mass production. *Neotrop Entomol* 42:534–538

Favetti BM, Butnariu AR, Doetzer AK (2014) Storage of *Euschistus heros* eggs (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) in liquid nitrogen for parasitization by *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae). *Neotrop Entomol* 43:291-293

Foerster LA (1996) Efeito da temperatura no desenvolvimento das fases imaturas de *Mythimna sequax* Franclemont (Lepidoptera: Noctuidae). *An Soc Entomol Bras* 25:27-32

Foerster LA, Avanci MRF (1999) Egg parasitoids of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) in soybeans. An Soc Entomol Bras 28:545-548

Foerster MR, Marchioro CA, Foerster LA (2014) Temperature-dependent parasitism, survival, and longevity of five species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) associated with *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Neotrop Entomol 43:176-182

Foerster MR, Marchioro CA, Foerster LA (2015) How *Trichogramma* survives during soybean offseason in Southern Brazil and the implications for its success as a biocontrol agent. BioControl 60:1-11

Greco CF, Stilinovic D (1998) Parasitization performance of *Trichogramma* spp. (Hym., Trichogrammatidae) reared on eggs of *Sitotraga cerealella* Oliver (Lep., Gelechiidae), stored at freezing and subfreezing conditions. J Appl Entomol 122:311-314

Greenberg SM, Morrison RK, Nordlund DA, King EG, 1998. A review of the scientific literature and methods for production of factitious hosts for use in mass rearing of *Trichogramma* (Hym.: Trichogrammatidae) in the former Soviet Union, the United States, Western Europe and China. J Entomol Sci 33:15-32

Greenberg SM, Nordlund DA, Wu Z (1998) Influence of rearing host on adult size and ovipositional behavior of mass produced female *Trichogramma minutum* Riley and *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Biol Control 11:43-48

Guang-hong L, Yi P, Qi-jin C, Zhi-Jian S (2001) Cryopreservation of the beet armyworm eggs. Entomol Sinica, 8:124-130

Gundannavar KP, Giraddi RS (2014) Studies on the tritrophic interactions involving popular chilli genotypes, *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Trichogramma* species. J Exp Zool India, 17:261-264

Hassan AS (1981) Massenproduktion und anwendung von *Trichogramma* 1. Produktion des wirtes *Sitotroga cerealella*. Entomophaga 26:339-348

Hoffmann MP, Ode PR, Walker DL, Gardner J, Nouhuys S, Shelton AM (2001) Performance of *Trichogramma ostrinae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) reared on factitious hosts, including the target host, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) Biol Control 21:1-10

Jalali SK, Singh SP (1992) Differential response of four *Trichogramma* species to low temperatures for short term storage. Entomophaga 37:159-165

Kazmer DJ, Luck RF (1995) Field tests of size-fitness hypothesis in the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum*. Ecology 76: 412-425

Krechemer F da S. ***Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae): Biologia em ovos de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) e estocagem em baixas temperaturas de ovos de *Mythimna sequax* (Lepidoptera: Noctuidae).** 65p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

Leopold RA, Wang WB, Berkebile DR, Freeman TP (2001) Cryopreservation of Embryos of the new world screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae). Ann Entomol Soc Am 94: 695-701

Macfadyen S, Davies AP, Zalucki MP (2015) Assessing the impact of arthropod natural enemies on crop pests at the field scale. Insect Science 22:20-34

Manandhar R, Wright MG (2015) Enhancing biological control of corn earworm, *Helicoverpa zea* and thrips through habitat management and inundative release of *Trichogramma pretiosum* in corn cropping systems. Biol Control, 89:84–90

Marchioro CA, Foerster LA (2012) Performance of the wheat armyworm, *Mythimna sequax* Franclemont, on natural and artificial diets. Neotrop Entomol 41:288-295

Monje JC, Zebitz CPW, Ohnesorge B (1999). Host and host age preference of *Trichogramma galloi* and *T. pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) reared on different hosts. J Econ Entomol 92:97-103

- Nagarkatti S, Giroux KJ, Killey TP (1991) Rearing *Trichogramma nubilale* [Hymenoptera: Trichogrammatidae] on eggs of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* [Lepidoptera: Sphingidae]. *Entomophaga* 36: 443-446
- Navarro MA (1998) *Trichogramma* spp. Producción, uso y manejo en Colombia. Guadalajara de Buga, Imprectec 176
- Nurindah GG, Cribb BW, Gordh G (1999) Influence of rearing host size acceptance by *Trichogramma australicum*. *BioControl* 44:129-141
- Özder N (2004) Effect of different cold storage periods on parasitization performance of *Trichogramma cacoeciae* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) on eggs of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae) *Biocontrol Sci Technol* 14:441-447
- Parra, JRP, Zucchi RA (2004) *Trichogramma* in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. *Neotrop Entomol* 33:271-281
- Pitcher SA, Hoffmann MP, Gardner J, Wright MG, Kuhar TP (2002) Cold storage of *Trichogramma ostrinae* reared on *Sitotroga cerealella* eggs. *Biocontrol* 47:25-535
- Salt G (1941) The effects of hosts upon their insect parasites. *Biol Rev* 16:239-263
- Smith SM (1996) Biological control with *Trichogramma*: advances, successes, and potential of their use. *Ann Rev Entomol* 41:375-406
- Smith S M (1996) Biological control with *Trichogramma*: advances, successes, and potential of their use. *Ann Rev Entomol* 41:375-406
- Stouthamer R, Luck RF, Hamilton, WD (1990) Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* to revert to sex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 2424-2427
- Spínola-Filho PRC, Leite GLD, Soares MA, Alvarenga AC, Paulo PD, Tuffi-Santos LD, Zanuncio JC (2014) Effects of duration of cold storage of host eggs on percent parasitism and



adult emergence of each of ten Trichogrammatidae (Hymenoptera) Species. Fla Entomol 97:14-21

Tabone E, Pintureau B, Pizzol J, Michel F, Barnay O (1999) Aptitude de 17 souches de Trichogrammes a parasiter lateigne des cruciferes *Plutella xylostella* L. em laboratoire (Lep.: Yponomeutidae). Ann Soc Entomol France 35:427- 433

Tezze AA, Botto EN (2004) Effect of cold storage on the quality of *Trichogramma nerudai* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Biol Control 30:11-16

Zamoner M. **Efeito do volume de ovos hospedeiros sobre o desenvolvimento, capacidade de parasitismo e longevidade de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae)**. 2005. 44f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Curso de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná.

Zheng L, Song K, Zheng SH (2003) Mass production of *Trichogramma brassicae* on eggs of *Sitotroga cerealella* (Olivier). J Hebei Agric Sci 7:9-32

## 6 CAPÍTULO IV- UM NOVO PASSO NA PRODUÇÃO DE *Trichogramma* WESTWOOD: CRIOPRESERVAÇÃO DE OVOS DE *Mythimna sequax* (FRANCLEMONT, 1951) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) POR LONGOS PERÍODOS

### Resumo

O presente trabalho comparou a eficiência de parasitismo por *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Anticarsia gemmatalis* e *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido por 30 dias. Determinou-se e quantificou-se por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ , o acúmulo de metabólitos presentes em maior quantidade nos ovos desses dois lepidópteros. Avaliou-se a viabilidade de ovos de *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido por um, três, seis, nove e 12 meses no parasitismo por *Trichogramma atopovirilia* e *T. pretiosum*. O parasitismo por *T. pretiosum* em ovos de *M. sequax* estocados por 30 dias foi superior (84,2 %) aos ovos de *A. gemmatalis* (6,7 %). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  determinou e quantificou os três principais metabólitos: maltodextrina, trealose e fosfocolina, sendo os dois primeiros presentes em maior quantidade em ovos de *M. sequax*. Com relação ao tempo de estocagem, a média de parasitismo por *T. atopovirilia* se manteve acima de 87 % em todos os períodos de estocagem. Em *T. pretiosum* a média foi superior a 82 % até os seis meses, reduzindo para 79 % aos 12 meses de estocagem. A estocagem de ovos de *M. sequax* por 12 meses não afetou a capacidade reprodutiva e a longevidade das progênes de *T. atopovirilia* e *T. pretiosum*. A criopreservação de ovos de *M. sequax* em nitrogênio líquido mostrou-se viável para a produção das duas espécies de *Trichogramma* em ovos estocados por até 12 meses, o que propicia a sincronização da produção de parasitoides com a ocorrência dos insetos-praga em culturas anuais.

**Palavras-chave:** Controle biológico; Parasitoides de ovos; *Trichogramma pretiosum*; *Trichogramma atopovirilia*; Armazenamento em baixa temperatura; Trealose

A FURTHER STEP ON THE PRODUCTION OF *Trichogramma* WESTWOOD:  
CRIOPRESERVATION OF *Mythimna sequax* (FRANCLEMONT, 1951) (LEPIDOPTERA:  
NOCTUIDAE) FOR LONG PERIODS

**Abstract**

The parasitism efficiency by *Trichogramma pretiosum* on eggs of *Anticarsia gemmatalis* and *Mythimna sequax* stored in liquid nitrogen for 30 days was compared. The presence of metabolites on both lepidopteran eggs was determined and quantified by means of <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The feasibility of *M. sequax* eggs stored in liquid nitrogen for one, three, six, nine and 12 months in the parasitism by *Trichogramma atopovirilia* and *T. pretiosum* was evaluated. The parasitism by *T. pretiosum* in stored *M. sequax* eggs for 30 days was higher (84.2%) in comparison to *A. gemmatalis* eggs (6.7%). The <sup>1</sup>H NMR spectrum determined and quantified the three main metabolites: maltodextrin, trehalose, and phosphocoline, the first two being present in greater quantities in *M. sequax* eggs. Regarding the storage time, the average parasitism by *T. atopovirilia* remained above 87% in all periods of storage. In *T. pretiosum* the average was above 82% up to six months, and declined to 79% after 12 months of storage. The storage of *M. sequax* eggs for 12 months did not affect the reproductive performance and longevity of *T. atopovirilia* and *T. pretiosum* progenies. The technique of storage *M. sequax* eggs in liquid nitrogen proved to be suitable for the production of the two species of *Trichogramma* in eggs stored for up to 12 months, which allows synchronization of parasitoids production with the occurrence of insect pests in annual crops.

**Keywords:** Biological control; parasitoid eggs; *Trichogramma pretiosum*; *Trichogramma atopovirilia*; Cold storage; Trehalose

## 6.1 INTRODUÇÃO

A estocagem de ovos hospedeiros em baixa temperatura pode possibilitar o incremento da produção massal de *Trichogramma* Westwood nos períodos de maior demanda de parasitoides para o controle de lepidópteros-praga em diversas culturas (GRECO e STILINOVIC, 1998; ÖZDER, 2004; WANG *et al.*, 2014). As técnicas frequentemente estudadas são a estocagem de ovos hospedeiros em refrigerador, freezer e nitrogênio líquido (LEOPOLD *et al.*, 1998; GRECO e STILINOVIC, 1998). A criopreservação tem sido empregada com sucesso na produção dos parasitoides de ovos de percevejos pentatomídeos *Trissolcus basalis* Wollaston e *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae) para liberação em áreas de cultivo de soja (CÔRREA-FERREIRA e OLIVEIRA, 1998; DOETZER e FOERSTER, 2013; FAVETTI *et al.*, 2014) e do parasitoide de ovos de coreídeos *Gryon pennsylvanicum* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae) para liberação em áreas de cultivo de *Pinus pinea* L. (PEVERIERI *et al.*, 2015). A criopreservação possibilita a estocagem de ovos-hospedeiros por longos períodos, conforme resultados obtidos por Corrêa-Ferreira e Oliveira (1998) e Peverieri *et al.* (2015) que conseguiram estocar ovos de percevejos por um ano para a produção de parasitoides de ovos.

Em lepidópteros, os estudos têm se concentrado no armazenamento de ovos de microlepidópteros já parasitados por *Trichogramma* e mantidos em refrigerador em temperaturas que variam de 0 a 15 °C por períodos de no máximo 60 dias (LEOPOLD *et al.*, 1998). Dentre os estudos estão o armazenamento de ovos de *Sitotroga cerealella* Olivier (Lepidoptera: Gelechiidae) por até 30 dias nas temperaturas entre 4 e 10 °C (PITCHER *et al.*, 2002; RUNDLE *et al.*, 2004; RODRIGUES e SAMPAIO, 2011); a estocagem de ovos de *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) por no máximo 30 dias nas temperaturas de 2 a 10 °C. Além do armazenamento de ovos de *Corcyra cephalonica* Stainton (Lepidoptera: Pyralidae) (JALALI e SINGH, 1992) por até 49 dias em 2, 5 e 10 °C. Os trabalhos mencionados revelam que, à medida que aumenta o tempo de armazenamento dos ovos diminui drasticamente a emergência de *Trichogramma*.

As pesquisas com ovos de lepidópteros não parasitados estocados em freezer e nitrogênio líquido ainda são pouco exploradas. Dass e Ram (1983) estocaram ovos de *C. cephalonica* em freezer (- 6 °C) e verificaram que a maior porcentagem de parasitismo (69 %) ocorreu aos sete dias de armazenamento. Greco e Stilinovic (1998) estocaram ovos de *S. cerealella* em nitrogênio por até 130 dias e obtiveram no máximo 43 % de parasitismo por *T. pretiosum*. Krechemer (2010) estocou ovos de *Mythimna sequax* (Franclemont, 1951)

(Lepidoptera: Noctuidae) por até 90 dias e verificou índices de parasitismo de 58 % para *T. pretiosum* e 52 % para *T. atopovirilia*.

A espécie hospedeira pode influenciar na tolerância dos ovos à criopreservação, pois, inúmeros estudos demonstram que alguns insetos possuem uma maior adaptação a temperaturas mais frias devido a uma maior concentração de trealose nos seus fluídos corporais (ZACHARIASSEN, 1985; BLOCK, 1991; BECKER *et al.*, 1996; ROZSYPAL, 2015). Uma das formas de se quantificar a trealose nos insetos é através do uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ , que dentre as várias aplicações na biologia, é comumente utilizada nos estudos do metabolismo dos insetos (THOMPSON, 1990).

Nesse sentido surge o interesse em verificar se os ovos de espécies hospedeiras que ocorrem em temperaturas mais baixas apresentam vantagem para serem estocados em nitrogênio líquido em relação aos ovos de espécies que ocorrem em temperaturas mais altas. Dentre as espécies estão *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae) praga primária da cultura da soja de ocorrência no verão (HOFFMAN-CAMPO *et al.*, 2000) e *M. sequax* uma das principais pragas de culturas de inverno (BERTELS, 1970).

Ambas as espécies apresentam potencial para produção de *Trichogramma*, uma vez que originam parasitoides robustos, longevos e com alta capacidade de parasitismo (CAÑETE e FOERSTER, 2003; AVANCI *et al.*, 2005; FOERSTER *et al.*, 2015). Além da qualidade do hospedeiro, o sucesso de um programa de controle biológico depende da utilização de espécies de *Trichogramma* que parasitem um maior número de pragas-alvos. Neste sentido, *T. atopovirilia* e *T. pretiosum* caracterizam-se por estarem associadas à um maior número de hospedeiros e por parasitarem principalmente lepidópteros-praga da família Noctuidae (ZUCCHI *et al.*, 2010).

O presente trabalho comparou o parasitismo por *T. pretiosum* em ovos de *A. gemmatalis* e *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido por 30 dias. Após a verificação do potencial que desses hospedeiros, foram determinados e quantificados os metabólitos presentes nos ovos das duas espécies de lepidópteros e posteriormente, foi avaliada a viabilidade de ovos de *M. sequax* estocados por diferentes períodos (um, três, seis, nove e 12 meses) ao parasitismo por *T. atopovirilia* e *T. pretiosum*.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 Criação de *Anticarsia gemmatalis*

A criação de *A. gemmatalis* foi mantida a  $25 \pm 1$  °C,  $70 \pm 10$  % RH e 14: 10 h de fotofase. Durante a fase larval, os indivíduos se desenvolveram em copos plásticos com capacidade para 50 ml contendo dieta artificial (GREENE *et al.*, 1976). Os adultos foram alimentados com uma solução composta por água destilada, mel, nipagim, ácido sórbico e sacarose acrescidos de 25 % de cerveja (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 1985) e mantidos em gaiolas de vidro de 45 cm x 33 cm x 35 cm com aberturas recobertas por telas de nailón para ventilação. Utilizou-se como substrato para oviposição placas de acrílico introduzidas internamente, junto às quatro paredes laterais da gaiola, as quais foram retiradas diariamente para a remoção dos ovos aderidos às paredes de acrílico e coletados em bandeja com água.

### 6.2.2 Criação de *Mythimna sequax*

A criação de *M. sequax* foi mantida a  $20 \pm 1$  °C,  $70 \pm 10$  % RH e 12: 12 h de fotofase. Na fase larval, *M. sequax* foi criada em tubos de vidro, com 2,0 cm x 8,0 cm, contendo dieta artificial (MARCHIORO e FOERSTER, 2012). Os adultos foram alimentados com mel diluído em água a 10%, mantidos em gaiolas de madeira com 40 cm x 30 cm x 27 cm e laterais cobertas com tela de náilon e acrílico. Os ovos foram depositados em substrato de oviposição elaborado com papel de seda, dobrado em forma de sanfona em sua extensão.

### 6.2.3 Criação de *Trichogramma*

Os parasitoides foram criados em tubos de vidro com 1,0 cm x 10 cm, em temperatura de  $20 \pm 1$  °C,  $70 \pm 10$  % RH e 12 h de fotofase. Os parasitoides *T. atopovirilia* e *T. pretiosum* foram selecionados por estarem associados ao parasitismo de várias espécies de noctuídeos (PARRA e ZUCCHI, 2004). Os adultos foram alimentados com filetes de mel no interior de cada tubo. As fêmeas receberam cerca de 100 ovos de *M. sequax* a cada dois dias para a manutenção das espécies de *Trichogramma* em laboratório.

#### 6.2.4 Parasitismo de ovos de *A. gemmatalis* e *M. sequax* por *T. pretiosum*

Aproximadamente 400 ovos de *M. sequax* e *A. gemmatalis* com até 24 horas de idade foram transferidos para criotubos com capacidade para 2 mL (Corning®). Os ovos de *M. sequax* foram colocados em pequenas posturas aderidas a papel de seda e os ovos de *A. gemmatalis* foram colocados soltos nos criotubos. Em seguida, os criotubos foram mantidos em nitrogênio líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 dias. Após esse período, os ovos foram descongelados em banho-maria a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Em seguida, os ovos das duas espécies estocados em nitrogênio líquido e não estocados foram transferidos para tubos de vidro (1,0 x 10 cm) e expostos ao parasitismo por fêmeas de *T. pretiosum* durante 24 horas. Essa espécie de *Trichogramma* foi selecionada por ser a mais utilizada em programas de controle biológico no mundo (PARRA e ZUCCHI, 2004). Os ovos de *A. gemmatalis* por serem ovipositados individualmente, foram fixados com água em cartelas de cartolina azul com 0.5 cm x 2 cm utilizando um pincel de pêlo fino e os ovos de *M. sequax* por serem colocados em massa, foram mantidos em papel de seda. As fêmeas foram alimentadas com filetes de mel no interior dos tubos. O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e 20 repetições. Cada repetição foi composta por 20 ovos/tubo e proporção de 1♀ de *T. pretiosum*/10 ovos, mantidas em temperatura de  $20\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $70\pm 10\%$  RH e 12 h de fotofase. Avaliou-se a porcentagem de parasitismo e a emergência dos adultos.

#### 6.2.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear - RMN

As extrações dos metabólitos presentes nos ovos foram realizadas utilizando-se 400 ovos (não estocados) de *M. sequax* e *A. gemmatalis*, os quais foram transferidos para tubos de vidro com capacidade de 10 mL e macerados em 5 mL de água destilada. Em seguida as amostras foram agitadas por um minuto em agitador do tipo vortex mixer (marca Vixar). Após a decantação, toda a solução foi retirada, restando apenas o macerado. Esse processo foi realizado duas vezes e as soluções obtidas das duas extrações foram transferidas para recipientes de vidro denominados vials com capacidade de 10 mL pesados previamente. Posteriormente as amostras foram aquecidas a  $46,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  no equipamento Thermo Scientific (modelo Reacti Therm I #18822) até a evaporação de toda a água das amostras. Após esse processo os vials contendo as amostras foram pesados para obtenção da quantidade de cada amostra. Em seguida, as amostras foram dissolvidas em 600  $\mu\text{L}$  de óxido deuterado ou água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) e foram transferidas para tubos eppendorf (2 mL) para centrifugação durante

10 minutos a 8.000 rpm em centrífuga de eppendorf modelo miniSpin. Após a centrifugação, as soluções receberam adição de 20  $\mu$ L de TMSP-d<sub>4</sub> (2,2,3,3-tetradeuterium-3-trimethylsilylpropionate) e transferidas para tubo de RMN de 178 mm x 5 mm de diâmetro.

Os espectros foram adquiridos a 303 K contendo 58 nmol de TMSP-d<sub>4</sub> (2,2,3,3-tetradeuterium-3-trimethylsilylpropionate) como padrão ( $\delta = 0$ ). Todos os espectros foram obtidos utilizando-se um espectrômetro de RMN Bruker AVANCE III 600 MHz com uma sonda de gradiente inverso 5 mm (QXI). Foram realizados 1D <sup>1</sup>H-RMN utilizando após 90° (p1) de calibração de pulso (p1 9.50-10.2 us) para obter o espectro com uma largura de 25000 Hz, utilizando 64 varrimentos para o Sinal/Noise (S/N) de pelo menos 400/1. A pré-saturação residual HDO foi realizada com o programa noesygppr1d.2, incluindo pré-saturação durante o atraso de relaxamento (10 ms) e gradiente spoil (90° de pulso, relaxamento de atraso= 10.0 s, número de pontos no domínio do tempo = 65536 e tempo de aquisição = 5.45259 s). A integração das áreas foi realizada sem a rotação do tubo e respeitando a metade da largura da linha média do TMSP de 0.8-1.0 Hz.

#### 6.2.6 Parasitismo em ovos de *M. sequax* estocados por diferentes períodos

Ovos de *M. sequax* com até 24 horas de idade foram transferidos para criotubos com capacidade para 2 mL (Corning®) e armazenados em nitrogênio líquido a -196 °C por um, três, seis, nove e 12 meses. Após a retirada dos ovos do nitrogênio líquido, estes foram descongelados em banho-maria a 37 °C durante 5 minutos. Em seguida, foram transferidos para tubos de vidro (1,0 x 10 cm) e expostos ao parasitismo por fêmeas de *T. atopovirilia* e *T. pretiosum* durante 24 horas. O parasitismo destes ovos foi comparado com o parasitismo de ovos de *M. sequax* não estocados (zero dias de estocagem). As fêmeas de *Trichogramma* foram alimentadas com filetes de mel no interior de cada tubo. O delineamento foi inteiramente casualizado com 12 tratamentos (seis períodos de armazenamento x duas espécies de *Trichogramma*) e 20 repetições. Cada repetição foi composta por 40 ovos/tubo e proporção de 1 ♀/10 ovos, mantidas em temperatura de 20± 1 °C, 70± 10 % RH e 12 h de fotofase. Avaliou-se a porcentagem de parasitismo, a emergência de adultos, a razão sexual e o tempo de desenvolvimento (ovo-adulto).



### 6.2.7 Capacidade de parasitismo e longevidade de progênies obtidas de ovos estocados por nove e 12 meses

Este experimento foi realizado para comparar as progênies originadas de ovos estocados por nove e 12 meses com as progênies oriundas de ovos não estocados, por ser os maiores períodos de estocagem dos ovos. Após a emergência de adultos de *T. atopovirilia* e *T. pretiosum* originados de ovos não estocados e estocados por nove e 12 meses, foram avaliadas a capacidade de parasitismo e a longevidade das progênies. Os indivíduos foram mantidos em tubos de vidro (1,0 cm de diâmetro x 10 cm de comprimento) e alimentados com mel. Após 24 h da emergência dos parasitoides, 20 fêmeas de cada espécie foram individualizadas, as quais receberam 20 ovos de *M. sequax* diariamente, durante quatro dias consecutivos. Os ovos permaneceram expostos ao parasitismo durante 24 h. Avaliou-se o número total de ovos parasitados durante quatro dias consecutivos.

Para a avaliação da longevidade foram selecionados 20 casais de cada espécie provenientes de ovos não estocados e estocados por nove e 12 meses. As observações foram realizadas diariamente até a morte de todos os indivíduos.

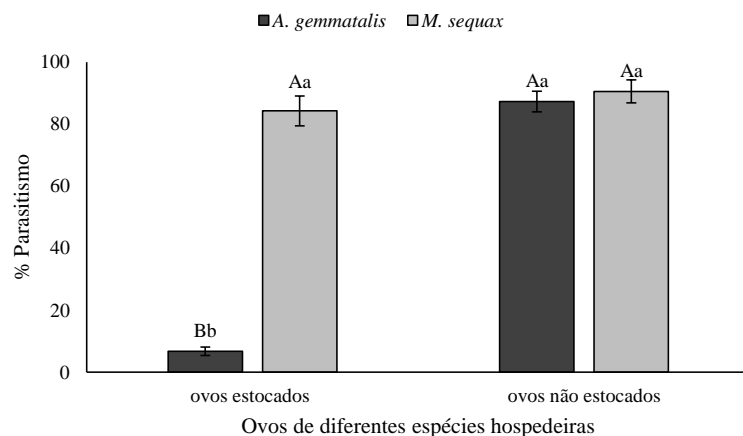
### 6.2.8 Análise estatística

Os dados que apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk e homogênea pelo teste de Levene, foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e a comparação de médias de teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), enquanto que os dados cujas variâncias não seguiram esses predispostos foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ). A comparação entre ovos estocados e não estocados para cada espécie de *Trichogramma* foi feita através do teste  $t$  - Student e Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ). A razão sexual foi calculada pelo número de fêmeas/ (número de machos + número de fêmeas) e analisada pelo teste de Qui-quadrado ( $X^2$ ) ( $P < 0,05$ ), tendo como valor esperado a razão sexual de parasitoides originados de ovos de *M. sequax* não estocados. As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Statistica v. 8.0 (Statsoft Inc 2008).

### 6.3 RESULTADOS

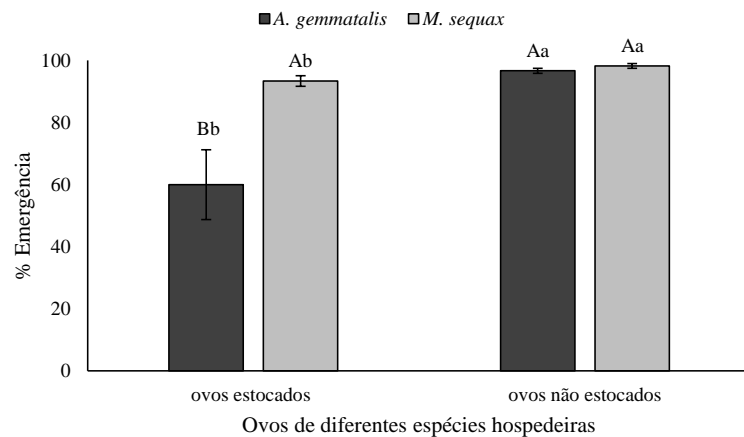
#### 6.3.1 Parasitismo em ovos criopreservados de *A. gemmatalis* e *M. sequax* por *T. pretiosum*

A porcentagem de parasitismo por *T. pretiosum* em ovos de *M. sequax* estocados em nitrogênio líquido por 30 dias foi superior (84,2 %) ao parasitismo em ovos de *A. gemmatalis* (6,7 %) ( $U= 2,50$ ;  $p< 0,001$ ) (Fig. 1). Enquanto que o parasitismo em ovos não estocados dos dois hospedeiros não diferiu estatisticamente ( $t= 0,650$ ;  $p= 0,521$ ), sendo 87,2 % em ovos de *A. gemmatalis* e 90,5 % em ovos de *M. sequax*. Ovos de *A. gemmatalis* estocados apresentaram uma taxa de parasitismo inferior aos ovos não estocados ( $t= 22,446$ ;  $p< 0,001$ ) (Fig. 1), enquanto que os ovos de *M. sequax* não diferiram no parasitismo entre ovos estocados e não estocados ( $t= 1,012$ ;  $p= 0,318$ ).



**Figura 1.** Médias ( $\pm$  EP) da porcentagem de parasitismo por *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Anticarsia gemmatalis* e *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido por 30 dias e não estocados. ( $n= 80$ ). Letras maiúsculas comparam as espécies e minúsculas representam a significância no parasitismo de ovos estocados e não estocados por espécie pelo teste  $t$  – Student e Mann-Whitney ( $P< 0,05$ ).

A emergência de parasitoides originados de ovos de *M. sequax* estocados foi superior (93,4 %) à emergência em ovos de *A. gemmatalis* (60 %) ( $T= 2, 938$ ;  $p= 0,005$ ) (Fig. 2). Em ovos não estocados a porcentagem de emergência não diferiu entre as espécies hospedeiras ( $T= 1,399$ ;  $p= 0,170$ ) (Fig. 2).



**Figura 2.** Médias ( $\pm$  EP) da porcentagem de adultos emergidos de *Trichogramma pretiosum* a partir de ovos de *Anticarsia gemmatalis* e *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido por 30 dias e não estocados. ( $n= 80$ ). Letras maiúsculas representam a significância entre os hospedeiros e minúsculas comparam a emergência em ovos estocados e não estocados por espécie pelo teste  $t$  – Student ( $P < 0,05$ ).

### 6.3.2 Espectroscopia de RMN

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostrou a presença de maltodextrina situado na região com sinal de referência de 5.430 ppm, trealose situado na região com sinal de referência 5.200 ppm e fosfocolina com localização na região 4.140 ppm (Tabela 1).

**Tabela 1.** Comparação do acúmulo de metabólitos em ovos de *Anticarsia gemmatalis* e *Mythimna sequax* obtidos de larvas criadas em dieta artificial. Os desvios químicos estão relacionados ao TMSP (2,2,3,3- tetradeuterium-3-trimethylsilylpropionate) ( $\delta = 0$  ppm) e os valores expressos em nmol.

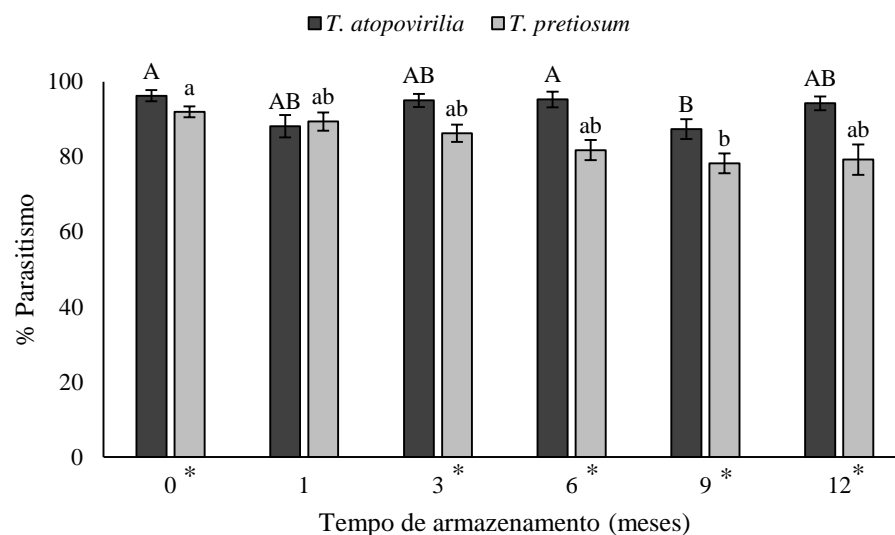
Metabólitos	$^1\text{H}$ Ref. Signal (ppm)*	Espécies hospedeiras	
		<i>Anticarsia gemmatalis</i>	<i>Mythimna sequax</i>
Maltodextrina	5.430	46,5	197,0
Trealose	5.200	10,5	75,0
Fosfocolina	4.140	84,8	81,5

\*Sinal de referência onde a molécula se encontra no espectro de RMN.

Constatou-se um maior acúmulo de maltodextrina e trealose em ovos de *M. sequax*, cujos valores foram 4,2 vezes (maltodextrina) e 7,0 vezes (trealose) maiores do que em ovos de *A. gemmatalis*. Enquanto que o acúmulo de fosfocolina foi menor em ovos de *M. sequax* do que em ovos de *A. gemmatalis* (Tabela 1).

### 6.3.3 Parasitismo de ovos de *Mythimna sequax* estocados por diferentes períodos

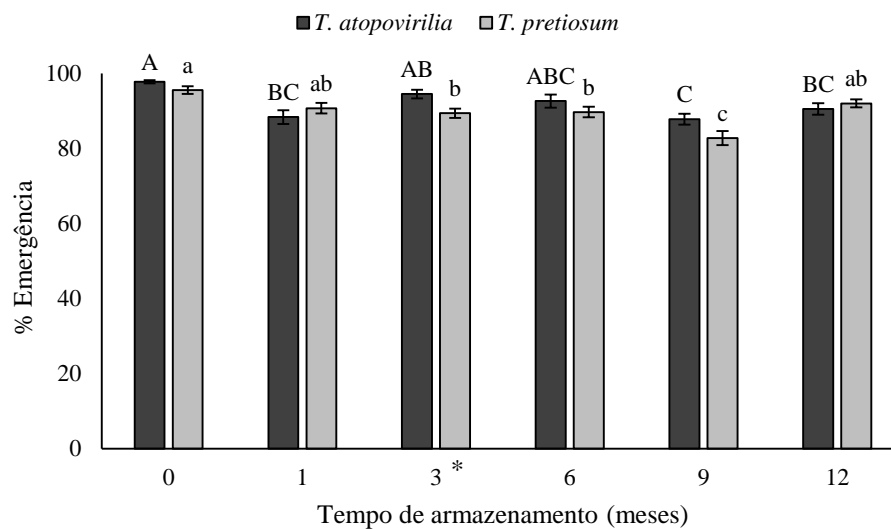
As maiores porcentagens de parasitismo por *T. atopovirilia* foram registradas nos períodos de três (95 %), seis (95,2 %) e 12 meses de estocagem (94,2 %), as quais ficaram próximas da média de parasitismo verificada nos ovos não estocados (96,2 %). A diferença estatística ocorreu apenas entre os tratamentos zero (ovos não estocados) e nove meses de estocagem ( $H= 20,264$ ;  $p < 0,001$ ) (Fig. 3). O parasitismo por *T. pretiosum* foi superior a 80 % nos ovos de *M. sequax* estocados por até seis meses. Aos 12 meses de estocagem, houve redução de 1 % em relação aos seis meses. As porcentagens de parasitismo por *T. pretiosum* nos períodos de um (89,4 %), três (86,2 %), seis (81,7 %) e 12 meses de estocagem (79,2 %) foram estatisticamente iguais no parasitismo de ovos não estocados (92 %).



**Figura 3.** Médias ( $\pm$  EP) das porcentagens de parasitismo de *Trichogramma atopovirilia* e *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido em ovos não estocados e por um, três, seis, nove e 12 meses. ( $n= 240$ ). Letras maiúsculas comparam o parasitismo por *T. atopovirilia* e letras minúsculas por *T. pretiosum* pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ). Os asteriscos indicam significância entre as espécies em cada período de armazenamento dos ovos.

A diferença ocorreu apenas entre zero dia (ovos não estocados) e nove meses de estocagem ( $H= 17,454$ ;  $p= 0,004$ ) (Fig. 3). Em todos os períodos de estocagem, exceto aos 30 dias, o parasitismo de ovos de *M. sequax* por *T. atopovirilia* foi superior a *T. pretiosum*, de acordo com o teste de Mann-Whitney: zero dias ( $U= 115,00$ ;  $p= 0,021$ ), um ( $U= 192,00$ ;  $p= 0,829$ ), três ( $U= 107,50$ ;  $p= 0,012$ ), seis ( $U= 68,00$ ;  $p< 0,001$ ), nove ( $U= 115,00$ ;  $p= 0,021$ ) e 12 meses de estocagem ( $U= 99,00$ ;  $p= 0,006$ ).

O índice de emergência de adultos de *T. atopovirilia* foi superior a 87 % em todos os períodos de armazenamento dos ovos. As maiores médias foram observadas nos períodos de três (94,5 %), seis (92,6 %) e 12 meses de estocagem (90,5 %), ficando próximas da testemunha (zero dias) (97,8%). Os períodos de um e nove meses de estocagem apresentaram uma redução em torno de 10 % em comparação ao controle (0 dias) ( $H= 39,692$ ;  $p< 0,001$ ) (Fig. 4).



**Figura 4.** Médias ( $\pm$  EP) da porcentagem de emergência de *Trichogramma atopovirilia* e *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido em ovos não estocados e por um, três, seis, nove e 12 meses. ( $n= 240$ ). Letras maiúsculas comparam a emergência de *T. atopovirilia* e letras minúsculas de *T. pretiosum* pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P< 0,05$ ). Os asteriscos indicam significância entre as espécies em cada período de armazenamento dos ovos.

Para *T. pretiosum*, o índice de emergência de adultos originados de ovos estocados por um (90,7 %) e 12 meses (91,9 %) foram semelhantes aos ovos não estocados (zero dias) (95,5 %). Os demais períodos diferiram da testemunha, onde a emergência aos três e seis meses foram de 89 % e aos nove meses 82,7 % ( $H= 33,193$ ;  $p< 0,001$ ) (Fig. 4). O percentual de

emergência de parasitoides foi superior para *T. atopovirilia* em relação à *T. pretiosum* apenas nos ovos estocados por três meses ( $U= 85,00$ ;  $p= 0,002$ ) (Fig. 4). Nos demais períodos, as diferenças não foram significativas entre as espécies.

A diferença no tempo de desenvolvimento de *T. atopovirilia* em ovos estocados por seis, nove e 12 meses foi de um dia a mais em relação aos ovos não estocados ( $H= 75,591$ ;  $p< 0,001$ ) enquanto que nos demais períodos a diferença foi entre 0,5 e 0,6 dias. Em *T. pretiosum* a diferença variou entre 2,2 e 2,7 dias a mais quando comparados com ovos não estocados em todos os períodos de avaliação ( $H= 87,132$ ;  $p< 0,001$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Médias ( $\pm$  EP) do tempo de desenvolvimento (ovo-adulto) e razão sexual de *Trichogramma atopovirilia* e *Trichogramma pretiosum* originados de ovos de *Mythimna sequax* estocados em nitrogênio líquido por zero, um, três, seis, nove e 12 meses ( $n= 240$ ). ( $20\pm 1^\circ\text{C}$  T;  $70\pm 10\%$  RH; 12L: 12D fotoperíodo).

Tempo de estocagem (meses)	Tempo de desenvolvimento (dias)	RazãoSexual <sup>ns</sup>		
		Valores	Teste $X^2$	$p$ (valor)
<i>Trichogramma atopovirilia</i>				
0	15,25 $\pm$ 0,10 c	0,64 $\pm$ 0,02	-	-
1	15,85 $\pm$ 0,08 bc	0,78 $\pm$ 0,01	1,075	>0,05
3	15,75 $\pm$ 0,10 bc	0,75 $\pm$ 0,01	0,640	>0,05
6	16,60 $\pm$ 0,11 a	0,71 $\pm$ 0,02	0,473	>0,05
9	16,05 $\pm$ 0,05 b	0,73 $\pm$ 0,02	0,627	>0,05
12	16,80 $\pm$ 0,09 ab	0,74 $\pm$ 0,03	0,934	>0,05
<i>Trichogramma pretiosum</i>				
0	13,60 $\pm$ 0,11 b	0,71 $\pm$ 0,02	-	-
1	15,90 $\pm$ 0,07 a	0,84 $\pm$ 0,01	0,922	>0,05
3	15,80 $\pm$ 0,90 a	0,80 $\pm$ 0,02	0,828	>0,05
6	16,35 $\pm$ 0,13 a	0,75 $\pm$ 0,02	0,697	>0,05
9	16,20 $\pm$ 0,09 a	0,76 $\pm$ 0,02	0,669	>0,05
12	16,85 $\pm$ 0,08 a	0,77 $\pm$ 0,03	0,683	>0,05

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Kruskal- Wallis ( $P< 0,05$ ) para o parâmetro tempo de desenvolvimento. A razão sexual foi comparada pelo teste de Qui-quadrado ( $X^2$ ) ( $P< 0,05$ ), utilizando como valores esperados os obtidos de ovos não estocados (zero dias). NS= Não significativo.

A razão sexual das progênes de *T. atopovirilia* e *T. pretiosum* originadas de ovos estocados por um, três, seis, nove e 12 meses não diferiu das progênes originadas de ovos não estocados (Tabela 2).

#### 6.3.4 Capacidade de parasitismo e longevidade das progênes

A avaliação desses parâmetros teve o intuito de comparar as progênes originadas de ovos estocados por nove e 12 meses com as progênes originadas de ovos não estocados. As maiores médias de parasitismo das progênes de *T. atopovirilia* e *T. pretiosum* originadas de ovos estocados por nove e 12 meses foram observadas no primeiro dia de parasitismo, quando *T. atopovirilia* parasitou mais de 96 % dos ovos e *T. pretiosum* 92 %. O índice de parasitismo acumulado das progênes de *T. atopovirilia* provenientes de ovos estocados por nove meses foi 10 % maior quando comparado com as progênes originadas de ovos estocados por 12 meses, não diferindo da testemunha ( $F= 3,492$ ;  $p= 0,037$ ). Enquanto que em *T. pretiosum* não houve diferença no parasitismo acumulado das progênes ( $F= 1,084$ ;  $p= 0,345$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Média ( $\pm$  EP) da longevidade e porcentagem parasitismo acumulado de progênes de *Trichogramma atopovirilia* e *Trichogramma pretiosum* originados de ovos estocados em nitrogênio líquido por nove e 12 meses comparadas com ovos não estocados. ( $20\pm 1^\circ\text{C}$  T;  $70\pm 10\%$  RH; 12L: 12D fotoperíodo).

Origem das progênes	Parasitismo acumulado	Longevidade (dias)	
		♂	♀
<i>Trichogramma atopovirilia</i>			
Ovos não estocados	61,56 $\pm$ 2,51 AB	13,05 $\pm$ 1,04 bB	17,60 $\pm$ 1,16 aB
Ovos estocados por 9 meses	68,81 $\pm$ 2,78 A	16,35 $\pm$ 1,14 bAB	20,40 $\pm$ 0,82 aAB
Ovos estocados por 12 meses	59,13 $\pm$ 2,79 B	16,65 $\pm$ 0,84 bA	20,95 $\pm$ 0,73 aA
<i>Trichogramma pretiosum</i>			
Ovos não estocados	60,63 $\pm$ 3,04 A	15,65 $\pm$ 0,98 aA	18,75 $\pm$ 1,72 aA
Ovos estocados por 9 meses	61,00 $\pm$ 2,11 A	17,85 $\pm$ 0,91 bA	23,05 $\pm$ 1,67 aA
Ovos estocados por 12 meses	56,44 $\pm$ 2,02 A	18,20 $\pm$ 0,87 bA	21,05 $\pm$ 1,07 aA

Médias seguidas de mesma letra maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste  $t$  - Student ( $P < 0,05$ ).

A longevidade das fêmeas de *T. atopovirilia* originadas de ovos estocados por nove e 12 meses foi entre 20-21 dias, cujas médias foram superiores as fêmeas originadas de ovos não

estocados ( $F= 3,791$ ;  $p= 0,023$ ). A longevidade das fêmeas de *T. pretiosum* ( $F= 2,021$ ;  $p= 0,142$ ) provenientes de ovos armazenados por nove e 12 meses foi semelhante à fêmeas oriundas de ovos não estocados (Tabela 3). A longevidade média dos machos originados de ovos estocados por nove e 12 meses foi superior aos machos originados de ovos não estocados para *T. atopovirilia* ( $F= 3,861$ ;  $p= 0,027$ ) e não significativa para *T. pretiosum* ( $F= 2,236$ ;  $p= 0,116$ ) (Tabela 3).

#### 6.4 DISCUSSÃO

A viabilidade dos ovos de *A. gemmatalis* foi afetada pela estocagem em nitrogênio líquido, com uma porcentagem de parasitismo por *T. pretiosum* menor que 7 %, devido ao ressecamento da maioria dos ovos logo após o parasitismo. Em contrapartida, os ovos de *M. sequax* demonstraram ser viáveis para a estocagem, com 84 % dos ovos parasitados por *T. pretiosum* e 93 % de emergência de adultos. Os índices de parasitismo e emergência de *T. pretiosum*, utilizando como hospedeiros ovos de *M. sequax*, foram os mais altos já verificados em estudos com estocagem de ovos em nitrogênio líquido visando à produção de *Trichogramma*. Utilizando como hospedeiros ovos de *S. cerealella*, Greco e Stilinovic (1998) obtiveram índices de parasitismo por *T. pretiosum* de 32, 41 e 43 % em ovos estocados por 20, 30 e 130 dias, respectivamente. Lohman *et al.* (2007) estocaram ovos de *A. kuehniella* por nove meses e não obtiveram parasitismo por *T. pretiosum* devido à deterioração dos ovos.

Uma das hipóteses para a ampla diferença no parasitismo de *T. pretiosum* entre essas espécies pode ser explicada pelo maior acúmulo de trealose e maltodextrina presente nos ovos de *M. sequax*. A análise de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  indicou uma quantidade sete vezes maior de trealose e quatro vezes maior de maltodextrina nos ovos de *M. sequax* em comparação com ovos de *A. gemmatalis*. A trealose é um dissacarídeo sintetizado por insetos, plantas e microorganismos, cuja função é proteger as proteínas, membranas lipídicas e células da dessecação, desidratação e congelamento (KANDROR *et al.*, 2002; ZHENG *et al.*, 2015). Enquanto que a maltodextrina é um polissacarídeo, rapidamente absorvido no organismo e responsável pelo acúmulo de energia dos seres vivos (BOOS e SHUMAN, 1998). O acúmulo de fosfocolina foi determinado para indicar que o metabolismo das duas espécies estava ativo, por isso que a quantidade desse metabólito não variou nos ovos dos dois hospedeiros.

Inúmeros estudos indicam a ação crioprotetora da trealose, a qual é responsável por proporcionar uma maior tolerância a baixas temperaturas nos insetos (ZACHARIASSEN, 1985; BLOCK, 1991; FIELDS *et al.* 1998; ROZSYPAL, 2015). Fields *et al.* (1998)



compararam o acúmulo de trealose entre as espécies de insetos-praga de grãos armazenados *Sitophilus granarius* L. (Coleoptera: Curculionidae) e *Cryptolestes ferrugineus* Stephens (Coleoptera: Cucujidae) aclimatadas em baixas temperaturas (5, 10 e 15 °C) e não aclimatadas, e observaram uma quantidade de trealose superior nas espécies que foram aclimatadas em baixas temperaturas. Em relação a maltodextrina, até o presente momento, não se têm relatos da associação desse polissacarídeo com a tolerância de insetos em baixas temperaturas. Estudos realizados por Reddy *et al.* (2009) demonstraram que a utilização da maltodextrina como agente crioprotetor manteve a viabilidade e as propriedades funcionais de bactérias lácticas probióticas como *Pediococcus acidilactici* Lindner, *Lactobacillus plantarum* Orla-Jensen e *Lactobacillus salivarius* Rogosa pertencentes à família Lactobacillaceae armazenadas em baixa temperatura (4 °C) durante 60 dias.

As maiores taxas de trealose e maltodextrina em ovos de *M. sequax* provavelmente se explica por se tratar de um inseto ativo no inverno e em laboratório essa espécie tolera temperaturas de até 10 °C (dados não publicados), embora neste experimento essa espécie tenha sido criada a 20 °C. Enquanto que *A. gemmatalis* é um inseto-praga de ocorrência no verão, cuja criação em laboratório é realizada a 25 °C.

O índice de parasitismo para *T. atopovirilia* foi de 94 % e emergência de 90 % aos 12 meses de estocagem, enquanto que em *T. pretiosum* o índice de parasitismo foi de 79 % e emergência de 92 %. Não há registros na literatura de resultados tão promissores quanto os apresentados neste trabalho para esses períodos de estocagem de ovos de lepidópteros. Krechemer (2010) estocou ovos de *M. sequax* por até três meses e obteve índices de parasitismo de 58 % para *T. atopovirilia* e 52 % para *T. pretiosum*. Entretanto, neste estudo utilizou-se a proporção de uma fêmea para 20 ovos, enquanto que no presente trabalho foi utilizado a proporção de uma fêmea para 10 ovos. O aumento no número de fêmeas contribuiu para aumentar o parasitismo dos ovos de *M. sequax*. Greco e Stilinovic (1998) registraram 43 % de parasitismo por *T. pretiosum* em ovos de *S. cerealella* estocados por até cinco meses. O presente estudo demonstrou que a técnica de estocagem empregando ovos de *M. sequax* é viável para a produção de *T. atopovirilia* e *T. pretiosum* utilizando-se ovos estocados por 12 meses. Cabe ressaltar que estocagem de ovos de lepidópteros por períodos em torno de um ano não foram relatados na literatura. Os resultados indicam que maiores períodos de estocagem podem ser obtidos, uma vez que não foram verificadas diferenças entre 12 meses de estocagem e a testemunha.

Até o presente momento, apenas a estocagem de ovos de percevejos para a produção de parasitoides apresentaram bons resultados por longos períodos de estocagem. Côrrea-Ferreira

e Oliveira (1998) conseguiram índices de emergência de *T. basalis* superiores a 92 % em ovos de *Nezara viridula* L. (Heteroptera: Pentatomidae) estocados em nitrogênio líquido por 12 meses. Doetzer e Foerster (2013) relataram emergência de 87 % de *T. basalis* em ovos de *N. viridula* estocados por seis meses. Favetti *et al.* (2014) relataram índices de emergência de 93 % de *T. podisi* em ovos de *Euschistus heros* Fabricius (Heteroptera: Pentatomidae) estocados por seis meses. Peverieri *et al.* (2015) obtiveram 52 % de parasitismo por *G. pennsylvanicum* em ovos de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) estocados por um ano.

Outros autores conseguiram bons índices de emergência de várias espécies de *Trichogramma* em ovos de microlepidópteros parasitados e estocados em baixas temperaturas, mas somente por períodos curtos de estocagem. Dentre eles, Jalali e Singh (1992) obtiveram índices de emergência de várias espécies de *Trichogramma* spp. superiores a 63 % em ovos de *C. cephalonica* estocados por 21 dias a 10 °C. Rundle *et al.* (2004) verificaram 50 % de emergência de adultos de *T. carverae* em ovos de *S. cereallela* armazenados a 10 °C por 30 dias. Rodrigues e Sampaio (2011) relataram índices de emergência superiores a 90 % de *T. pretiosum* em ovos de *S. cereallela* mantidos por 20 dias a 5 e 8 °C. Yilmaz *et al.* (2007) relataram 85 % de emergência de *T. evanescens* em ovos de *E. kuehniella* estocados por 30 dias a 10 °C. Resultados semelhantes foram obtidos por Ayvaz *et al.* (2008) quando estocaram ovos de *E. kuehniella* parasitados por *T. evanescens* 21 dias a 4° C.

A razão sexual das espécies de *Trichogramma* originadas de ovos estocados não diferiu das progênes originadas de ovos não estocados, resultando na predominância de fêmeas, o que é um indicativo da boa qualidade nutricional do hospedeiro, pois as fêmeas necessitam de maior disponibilidade de reservas nutricionais do que os machos (VINSON, 2010). Segundo Navarro (1998) a maior predominância de fêmeas é um dos fatores para o sucesso de uma criação massal de *Trichogramma*. O tempo de desenvolvimento dos parasitoides em ovos estocados foi de um a 2.75 dias a mais do que os parasitoides desenvolvidos em ovos não estocados. Esses resultados corroboram com os obtidos por Krechemer (2010) que observou maior tempo de desenvolvimento dos parasitoides obtidos de ovos estocados em comparação aos ovos não estocados.

A estocagem dos ovos de *M. sequax* por nove e 12 meses não afetou a capacidade de parasitismo das progênes de *T. atopovirilia* e *T. pretiosum* quando comparadas com as progênes originadas de ovos não estocados. Esses resultados contrastam com os obtidos por Özder (2004) que observou um decréscimo na fecundidade de progênes de *Trichogramma cacoceae* a medida que aumentou o tempo de armazenamento dos ovos em refrigerador. No

primeiro dia de oferta de ovos de *M. sequax*, o parasitismo por *T. atopovirilia* foi superior à 96 % dos ovos enquanto que em *T. pretiosum* o índice foi superior à 92 % não diferindo das progênes originadas de ovos não estocados. Entretanto, a partir do segundo dia de parasitismo foi observado uma redução na porcentagem de parasitismo para ambas as espécies provenientes de ovos estocados por nove e 12 meses e ovos não estocados. Esse decréscimo na fecundidade de *T. atopovirilia* e *T. pretiosum* a partir do segundo dia de parasitismo também foi relatado por Molina *et al.* (2005) quando avaliaram o parasitismo em ovos de *A. kuehniella* e por Pratisoli *et al.* (2008) quando avaliaram o parasitismo de *T. pretiosum* e *T. acacioi* em ovos de *S. cerealella*. O resultado obtido no presente trabalho é mais uma evidência de que a estocagem rápida a -196 °C não alterou as propriedades dos ovos de *M. sequax*.

A longevidade das fêmeas originadas de ovos de *M. sequax* estocados por nove e 12 meses foi em torno de 21 dias tanto para *T. atopovirilia* quanto para *T. pretiosum*, enquanto que os machos de *T. atopovirilia* viveram entre 16 – 17 dias e *T. pretiosum* 18 dias. Esses resultados contrastam com os obtidos por Rundle *et al.* (2004) que relataram longevidade de no máximo 10 dias de *T. carverae* em ovos de *S. cerealella* armazenados a 10 °C por 30 dias, mesmo sendo alimentados com mel durante a condução do experimento. Özder (2004) verificou uma longevidade média de 12 dias para *T. cacoeciae* originados de ovos de *E. kuehniella* estocados a 0 °C por 30 dias. Ayvaz *et al.* (2008) relataram 5,7 dias de longevidade de adultos de *T. evanescens* em ovos de *E. kuehniella* estocados por 21 dias a 4° C.

## 6.5 CONCLUSÕES

Conclui-se que ovos de *A. gemmatalis* não são viáveis para estocagem em nitrogênio líquido visando a produção de *Trichogramma*. Em contrapartida, ovos de *M. sequax* são viáveis provavelmente porque apresentam um maior acúmulo de trealose e maltodextrina quando comparado com ovos de *A. gemmatalis*, o que explica a sua maior tolerância à estocagem em nitrogênio líquido. *M. sequax* pode ter seus ovos estocados por até 12 meses sem afetar o desempenho de *T. atopovirilia* e *T. pretiosum*, uma vez que as características desses parasitoides são mantidas em relação aos parasitoides originados de ovos não estocados. A estocagem por 12 meses favorece o incremento e a sincronização da produção de parasitoides com o aumento da demanda para liberação em períodos críticos de ocorrência de lepidópteros-pragas em culturas anuais como soja e milho.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes pela concessão da bolsa ao primeiro autor. À equipe do laboratório de Química de Carboidratos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

## REFERÊNCIAS

- AVANCI, M. R. F.; FOERSTER, L. A.; CAÑETE, C. L. Natural parasitism in eggs of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) by *Trichogramma* spp. (Hymenoptera, Trichogrammatidae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 49, p. 148-151, 2005.
- AYVAZ, A.; KARASU, E.; KARABÖRKLÜ, S.; TUNÇBILEK, A. S. Effects of cold storage, rearing temperature, parasitoid age and irradiation on the performance of *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 44, p. 232-240, 2008.
- BECKER, A; SCHLÖDER, P; STEELE, J.E; WEGENER, G. Regulation of trehalose metabolism in insects. **Experimentia**, v. 52, n. 5, p. 433-439, 1996.
- BERTELS, A. Pragas do trigo no campo e seu combate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 5, p. 81-89, 1970.
- BLOCK W. To freeze or not to freeze? Invertebrate survival of sub-zero temperatures. **Functional Ecology**, v. 5, n. 2, p. 284-290, 1991.
- BOOS, W.; SHUMAN, H. Maltose/Maltodextrin System of *Escherichia coli*: Transport, Metabolism, and Regulation. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 62, p. 204–229, 1998.
- CAÑETE, C. L.; FOERSTER, L. A. Incidência natural e biologia de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 47, p. 201-204, 2003.

CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, M. C. N. Viability of *Nezara viridula* (Linnaeus) eggs for parasitism by *Trissolcus basalis* (Woll.), under different storage techniques in liquid nitrogen. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, p. 101–107, 1998.

DASS, R.; RAM, A. Effect of frozen eggs of *Corcyra cephalonica* Stainton (Pyralidae: Lepidoptera) on parasitism by *Trichogramma exiguum* (Pinto and Platner) (Trichogrammatidae: Hymenoptera). **Indian Journal of Entomology**, v. 45, n. 4, p. 345-347, 1983.

DOETZER, A. K., FOERSTER, L. A. Storage of pentatomid eggs in liquid nitrogen and dormancy of *Trissolcus basalis* (Wollaston) and *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae) adults as a method of mass production. **Neotropical Entomology**, v. 42, p. 534–538, 2013.

FAVETTI, B. M., BUTNARIU, A. R.; DOETZER, A. K. Storage of *Euschistus heros* eggs (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) in liquid nitrogen for parasitization by *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae). **Neotropical Entomology**, v. 43, p. 291–293, 2014.

FIELDS, P. G.; FLEURAT-LESSARD, F.; LAVENSEAU, L.; FEBVAY, G.; PEYPELUT, L.; BONNOT, G. The effect of cold acclimation and deacclimation on cold tolerance, trehalose and free amino acid levels in *Sitophilus granarius* and *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera). **Journal of Insect Physiology**, v. 44, p. 955–965, 1998.

FOERSTER, M. R.; MARCHIORO, C. A.; FOERSTER, L. A. How *Trichogramma* survives during soybean off-season in Southern Brazil and the implications for its success as a biocontrol agent. **BioControl**, v. 60, p. 1-11, 2015.

GRECO, C. F.; STILINOVIC, D. Parasitization performance of *Trichogramma* spp. (Hym., Trichogrammatidae) reared on eggs of *Sitotroga cerealella* Oliver (Lep., Gelechiidae), stored at freezing and subfreezing conditions. **Journal of Applied Entomology**, v. 122, p. 311-314, 1998.

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n. 4, p. 488-497, 1976.

HOFFMANN-CAMPO, C. B., OLIVEIRA, E. B., MOSCARDI, F. **Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*)**. Londrina: EMBRAPA CNPSo. 1985. 23p. (EMBRAPA CNPSo. Documentos, 10).

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L.J.; SOSA-GOMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: EMBRAPA Soja. 2000. 70p. (Circular Técnica, 30).

JALALI, S. K.; SINGH, S. P. Differential response of four *Trichogramma* species to low temperatures for short term storage. **Entomophaga**, v. 37, n. 1, p. 159-165, 1992.

KANDROR, O.; DELEON A.; GOLDBERG, A. L. Trealose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 99, n. 15, p. 9727–9732, 2002.

KRECHEMER, F. da S. ***Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae): Biologia em ovos de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) e estocagem em baixas temperaturas de ovos de *Mythimna sequax* (Lepidoptera: Noctuidae)**. 65p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

LEOPOLD, R. A.; ROJAS, R. R.; ATKINSON, P. W. Post pupariation cold storage of three species of flies: increasing chilling tolerance by acclimation and recurrent recovery. **Cryobiology**, v. 36, p. 213-224, 1998.

LOHMANN, T.; MARTINAZZO, T.; PIETROWSKI, V.; GIBBERT, F.; KRAEMER, B. Viabilidade do armazenamento de ovos de *Anagasta kuehniella*, Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) em nitrogênio líquido para a produção de *Trichogramma pretiosum*, Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). In: Resumos do V CBA. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, p. 1551-1555, 2007.

MARCHIORO, C. A; FOERSTER, L. A. Performance of the wheat armyworm, *Mythimna sequax* Franclemont, on natural and artificial diets. **Neotropical Entomology**, v. 41, p. 288-295, 2012.

MOLINA, R. M. S.; FRONZA, V.; PARRA, J. R. P. Seleção de *Trichogramma* spp., para o controle de *Ecdytolopha aurantiana*, com base na biologia e exigências térmicas. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 49, n. 1, p. 152-158, 2005.

NAVARRO, M. A. ***Trichogramma* spp. Producción, uso y manejo en Colombia**. Guadalajara de Buga, Imprectec. 1998. 176p.

ÖZDER, N. Effect of different cold storage periods on parasitization performance of *Trichogramma cacoeciae* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) on eggs of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 14, n. 5, p. 441-447, 2004.

PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. *Trichogramma* in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. **Neotropical of Entomology**, v. 33, p. 271-281, 2004.

PEVERIERI, G. S.; FURLAN, P.; BENASSAI, D.; STRONG, W. B.; ROVERSI, P. F. Long-term storage of eggs of *Leptoglossus occidentalis* for the mass-rearing of its parasitoid *Gryon pennsylvanicum*. **BioControl**, v. 60, p. 293-306, 2015.

PITCHER, S. A. HOFFMANN, M. P.; GARDNER, J.; WRIGHT, M. G.; KUCHAR, T. P. Cold storage of *Trichogramma ostrinae* reared on *Sitotroga cerealella* eggs. **Biocontrol**, v. 47, p. 25-535, 2002.

PRATISSOLI, D.; ZANUNCIO, J. C.; VIANNA, U. R.; ANDRADE, J. S.; ZINGER, F. D.; ALENCAR, J. R. C. C.; LEITE, G. L. D. Parasitism capacity of *Trichogramma pretiosum* and *Trichogramma acacioi* (Hym.: Trichogrammatidae) on eggs of *Sitotroga cerealella* (Lep.: Gelechiidae). **Brazilian archives of biology and technology**, v. 51, n.6, p.1249-1254, 2008.

REDDY, K. B. P. K.; AWASTHI, S. P.; MADHU, A. N.; PRAPULLA, S. G. Role of cryoprotectants on the viability and functional properties of probiotic lactic acid bacteria during freeze drying. **Food Biotechnology**, v. 23, p. 243–265, 2009.

RODRIGUES, S. M. M.; SAMPAIO, M. V. Armazenamento de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em baixas temperaturas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 1, p. 45-51, 2011.

ROZSYPAL, J. The role of water, ice nucleators, and inoculation in insect cold survival. **Insect Physiology**, v. 5, p. 21–30, 2015.

RUNDLE, B. J.; THOMSON, L. J.; HOFFMANN, A. A. Effects of cold storage on field and laboratory performance of *Trichogramma carverae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and the response of three *Trichogramma* spp. (*T. carverae*, *T. nr. brassicae*, and *T. funiculatum*) to cold. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 2, p. 213-21, 2004.

THOMPSON, S. N. NMR spectroscopy: Its basis, biological application and use in studies of insect's metabolism. **Insect Biochemistry**, v. 20, n. 3, p. 223-237, 1990.

VINSON, S. B. Nutritional ecology of insect egg parasitoids. In: CÔNSOLI, F. L.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, A. (Eds). **Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma***. New York: Springer, 2010. cap. 2, p. 25 – 55.

YILMAZ, S.; KARABÖRKLÜ, S.; AYVAZ, ABDURRAHMAN. Effect of cold temperature durations on the performance of the adult *Trichogramma evanescens* (Westwood, 1833) (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Türkiye Entomoloji Dergisi**, v. 31, n. 4, p. 269-278, 2007.

WANG, Z. Y.; HE, K. L.; ZHANG, F.; LU, X.; Babendreier, D. Mass rearing and release of *Trichogramma* for biological control of insect pests of corn in China. **Biological Control**, v. 68, p. 136-144, 2014.

ZACHARIASSEN, E. K. Physiology of cold tolerance in insects. **Physiology Review**, v. 65, n. 4, p. 799-832, 1985.

ZHENG, Z.; XU, Y.; SUN, Y.; MEI, W.; OUYANG, J. Biocatalytic Production of Trealose from Maltose by Using Whole Cells of Permeabilized Recombinant *Escherichia coli*. **Plos One**, v. 10, n. 10, p. e0140477, 2015.

ZUCCHI, R. A.; QUERINO, R. B.; MONTEIRO, R. C. Diversity and hosts of *Trichogramma* in the new world, with emphasis in South America. In: CÔNSOLI, F. L.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. (Eds). **Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma***. New York: Springer, 2010. cap. 8, p. 219 – 236.



## 7 CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo demonstrou que a técnica de estocagem de ovos de *Mythimna sequax* em nitrogênio líquido é viável para a produção massal de *Trichogramma*. Esse hospedeiro pode ser estocado por pelo menos 12 meses e proporcionar altos índices de parasitismo e emergência de *T. atopovirilia* e *T. pretiosum*.

A produção de *Trichogramma* a partir de ovos de *M. sequax* torna-se uma alternativa para o controle de lepidópteros-pragas que atacam grandes culturas, como os noctuídeos, cujos ovos são volumosos, uma vez que esse hospedeiro proporciona adultos robustos e longevos além de originar mais de um parasitoide por ovo. O período de 12 meses de estocagem dos ovos é suficiente para atender a alta demanda de produção de parasitoides para liberações em culturas anuais, como soja, milho e algodão.

Quanto as recomendações para o parasitismo de ovos estocados em nitrogênio líquido, sugere-se que seja utilizada uma fêmea de *Trichogramma* para cada 10 ovos, sem a necessidade de manter uma linhagem de parasitoides a partir de ovos estocados.

Os agentes crioprotetores avaliados não promoveram aumento no parasitismo de ovos de *M. sequax* armazenados em nitrogênio líquido, sendo que os maiores índices de parasitismo e emergência de *Trichogramma* foram obtidos a partir de ovos sem adição de crioprotetores. Esse resultado é um ponto positivo, pois diminui o custo e mão-de-obra para a estocagem dos ovos em nitrogênio líquido, uma vez que a maior parte dos crioprotetores testados possuem custo elevado.

O armazenamento dos ovos de *M. sequax* não afetou o parasitismo e o desenvolvimento de *T. atopovirilia*, *T. pretiosum*, *T. exiguum* e *T. galloi*, sendo que as duas primeiras espécies mencionadas estão associadas a um maior número de hospedeiros, principalmente os que apresentam ovos de maior volume, como os noctuídeos.

A estocagem de ovos de *M. sequax* em nitrogênio líquido por pelo menos 12 meses e sua viabilidade para a produção de *Trichogramma* deve-se ao fato destes possuírem uma maior quantidade de trealose e maltodextrina quando comparado com ovos de *A. gemmatalis*, os quais após estocados não proporcionaram bons índices de parasitismo. Esses metabólitos possuem ação crioprotetora, portanto, os resultados obtidos sugerem que insetos de ocorrência em baixas temperaturas, como *M. sequax* apresentam ovos mais tolerantes ao frio do que insetos que ocorrem em culturas de verão como é o caso de *A. gemmatalis*.

Sendo assim, o armazenamento de ovos de *M. sequax* em nitrogênio líquido é uma alternativa promissora para a produção de *Trichogramma*, entretanto, são necessários estudos futuros para determinar o número de indivíduos a serem liberados e a dispersão desses parasitoides em campo, além de testar recipientes que possam armazenar maiores quantidades de ovos. Ainda é interessante a elaboração de uma análise de custo de produção de *Trichogramma* a partir de ovos de *M. sequax* estocados. Embora, o custo de produção a partir desse hospedeiro provavelmente seja maior do que a produção a partir de ovos de traças, o custo será compensado pela obtenção de parasitoides de qualidade, robustos e longevos que serão eficientes no controle de lepidópteros-pragas que apresentam ovos mais volumosos.

## REFERÊNCIAS

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. P. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145-173, 1987.

ANDRADE, G. S.; PRATISSOLI, D.; DALVI, L. P.; DESNEUX, N.; SANTOS JUNIOR, H. J. G. Performance of four *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) as biocontrol agents of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) under various temperature regimes. **Journal of Pest Science**, v. 84, p. 313-320, 2011.

AVANCI, M. R. F. **Espécies de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) que ocorrem em ovos de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) no sudeste do Paraná: parasitismo natural, bioecologia, exigências térmicas e estocagem em baixas temperaturas.** 116p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

AVANCI, M. R. F.; FOERSTER, L. A.; CAÑETE, C. L. Natural parasitism in eggs of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) by *Trichogramma* spp. (Hymenoptera, Trichogrammatidae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 49, p. 148-151, 2005.

AYVAZ, A.; KARASU, E.; KARABÖRKLÜ, S.; TUNÇBILEK, A. S. Effects of cold storage, rearing temperature, parasitoid age and irradiation on the performance of *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 44, p. 232-240, 2008.

BAI, B.; LUCK, R. F.; FORSTER, L.; STEPHENS, B.; JANSSEN, J. A. M. The effect of host size on quality attributes of the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 64, p. 37-48, 1992.

BANNO, Y.; NAGASAKI, K.; TSUKADA, M.; MINOHARA, Y.; BANNO, J.; NISHIKAWA, K.; YAMAMOTO, K.; TAMURA, K.; FUJII, T. Development of a method for long-term preservation of *Bombyx mori* silkworm strains using frozen ovaries. **Cryobiology**, v. 66, p. 283-287, 2013.

BAYRAM, A.; OZCAN, H.; KORNOSOR, S. Effect of cold storage on the performance of *Telenomus busseolae* Gaha (Hymenoptera: Scelionidae), an egg parasitoid of *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v. 35, p. 68-77, 2005.

BERTELS, A. Pragas do trigo no campo e seu combate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 5, p. 81-89, 1970.

BLOCK W. To freeze or not to freeze? Invertebrate survival of sub-zero temperatures. **Functional Ecology**, v. 5, n. 2, p. 284-290, 1991.

BOLDT, P. E.; MARSTON, N. Eggs of the greater wax moth as a host for *Trichogramma*. **Environmental Entomology**, v. 3, p. 545-548, 1974.

BOIVIN, G. Reproduction and immature development of egg parasitoids. In: CÔNSOLI, F. L.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, A. (Eds). **Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma***. New York: Springer, 2010. cap. 1, p. 1 – 23.

BUENO, R. C. O. F.; PARRA, J. R. P.; BUENO, A.F. *Trichogramma pretiosum* parasitism of *Pseudoplusia includens* and *Anticarsia gemmatalis* eggs at different temperatures. **Biological Control**, v. 60, p. 154–162, 2012.

CABEZAS, F. G.; MELO, M.; GARCIA, M. S.; DIEZ-RODRIGUES, G. L.; NAVA, D. E. Parasitism of *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) on *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae) at different temperatures. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 39, n. 2, p. 216-220, 2013.

CAÑETE, C. L.; FOERSTER, L. A. Incidência natural e biologia de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 47, p. 201-204, 2003.

CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 957, 2011.

CHAILLEUX, A.; BIONDI, A.; HAN, P.; TABONE, E.; DESNEUX, N. Suitability of the pest - plant system *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) - tomato for *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) parasitoids and insights for biological control. **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 6, p. 2310-2321, 2013.

CHAPMAN, A. V.; KUHAR, T. P.; SCHULTZ, P. B.; BREWSTER, C. C. Dispersal of *Trichogramma ostrinae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in potato fields. **Environmental Entomology**, v. 38, n. 3, p. 677-685, 2009.

CHEN, C. P., DENLINGER, D. L., AND LEE, R. E. Cold-shock injury and rapid cold hardening in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. **Physiological Zoology**, v. 60, p. 297–304, 1987.

CÔNSOLI, F. L.; KITAJIMA, E. W.; PARRA, J. R. P. Ultrastructure of the natural and factitious host eggs of *Trichogramma galloi* Zucchi and *Trichogramma pretiosum* Riley (Hym., Trichogrammatidae). **Journal of Insect Morphology Embryology**, v. 28, p. 211-229, 1999.

CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, M. C. N. Viability of *Nezara viridula* (Linnaeus) eggs for parasitism by *Trissolcus basalis* (Woll.), under different storage techniques in liquid nitrogen. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, p. 101–107, 1998.

DASS, R.; RAM, A. Effect of frozen eggs of *Corcyra cephalonica* Stainton (Pyralidae: Lepidoptera) on parasitism by *Trichogramma exiguum* (Pinto and Platner) (Trichogrammatidae: Hymenoptera). **Indian Journal of Entomology**, v. 45, n. 4, p. 345-347, 1983.

DÍAZ, M. F.; RAMÍREZ, A.; POVEDA, K. Efficiency of different egg parasitoids and increased floral diversity for the biological control of noctuid pests. **Biological Control**, v. 60, p. 182-191, 2012.

DOETZER, A. K.; FOERSTER, L.A. Efeito do parasitismo por *Glyptapanteles muesebecki* (Blanchard) no consumo e utilização do alimento por *Mythimna sequax* Franclemont. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 27, p. 255-264, 1998.

DOETZER, A. K., FOERSTER, L. A. Storage of pentatomid eggs in liquid nitrogen and dormancy of *Trissolcus basalis* (Wollaston) and *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygastriidae) adults as a method of mass production. **Neotropical Entomology**, v. 42, p. 534–538, 2013.

EL-WAKEIL, N. E. Evaluation of efficiency of *Trichogramma evanescens* reared on different factitious hosts to control *Helicoverpa armigera*. **Journal of Pest Science**, v. 80, p. 29-34, 2007.

EL-WAKEIL, N. E.; FARGHALY, H. T.; RAGAB, Z. A. Efficacy of inundative releases of *Trichogramma evanescens* in controlling *Lobesia botrana* in vineyards in Egypt. **Journal of Pest Science**, v. 81, p. 49-55, 2008.

FAVETTI, B. M, BUTNARIU, A. R.; DOETZER, A.K. Storage of *Euschistus heros* eggs (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) in liquid nitrogen for parasitization by *Telenomus*

*podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae). **Neotropical Entomology**, v. 43, p. 291–293, 2014.

FOERSTER, L. A. Efeito da temperatura no desenvolvimento das fases imaturas de *Mythimna sequax* Franclemont (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, p. 27-32, 1996.

FOERSTER, L. A.; DOETZER, A. K.; AVANCI, M. R. F. Capacidade reprodutiva e longevidade de *Glyptapanteles muesebecki* (Blanchard) (Hymenoptera: Braconidae) parasitando lagartas de *Mythimna sequax* Franclemont (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 28, p. 485-490, 1999.

FOERSTER, L. A.; DOETZER, A. K. Biology of *Microplitis mediator* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) parasitizing the wheat armyworm *Mythimna (Pseudaletia) sequax* Franclemont (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, p. 81-84, 2003.

FOERSTER, M. R.; MARCHIORO, C. A.; FOERSTER, L. A. Temperature-dependent parasitism, survival, and longevity of five species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) associated with *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 43, p. 176-182, 2014.

FOERSTER, M. R.; MARCHIORO, C. A.; FOERSTER, L. A. How *Trichogramma* survives during soybean offseason in Southern Brazil and the implications for its success as a biocontrol agent. **BioControl**, v. 60, p. 1-11, 2015.

GARDNER, J.; HOFFMANN, M. P.; PITCHER, S. A.; NYROP, J. P. Recurrent warming to improve cold storage of Trichogrammatids (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 3, p. 261-270, 2012.

GEREMIAS, D. L.; PARRA, J. R. P.; Dispersal of *Trichogramma galloi* in corn for the control of *Diatraea saccharalis*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 7, p. 751-762, 2014.

GRECO, C. F.; STILINOVIC, D. Parasitization performance of *Trichogramma* spp. (Hym., Trichogrammatidae) reared on eggs of *Sitotroga cerealella* Oliver (Lep., Gelechiidae), stored at freezing and subfreezing conditions. **Journal of Applied Entomology**, v. 122, p. 311-314, 1998.

GREENBERG, S. M.; NORDLUND, D. A.; KING, E. G. A review of production of factitious hosts for the use in mass rearing of *Trichogramma* spp. in the former Soviet Union, the United States, western Europe, and China. **Journal of Entomological Science**, v. 33, p. 15-32, 1998.

GREENBERG, S. M.; NORDLUND, D. A.; WU, Z. Influence of rearing host on adult size and ovipositional behavior of mass produced female *Trichogramma minutum* Riley and *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Biological Control**, v. 11, p. 43-48, 1998.

GUANG-HONG, L.; YI, P.; QI-JIN, C.; ZHI-JIAN, S. Cryopreservation of the beet armyworm eggs. **Entomologia Sinica**, v. 8, p. 124-130, 2001.

GUNDANNAVAR, K. P.; GIRADDI, R. S. Studies on the tritrophic interactions involving popular chilli genotypes, *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Trichogramma* species. **Journal of Experimental Zoology India**, v. 17, n. 1, p. 261-264, 2014.

HASSAN, A. S. Massenproduktion und anwendung von *Trichogramma* 1. Produktion des wirtes *Sitotroga cerealella*. **Entomophaga**, v. 26, p. 339-348, 1981.

HOFFMANN, M. P. O. P. R.; WALKER, D. L.; GARDNER, J.; NOUHUYS, S.; SHELTON, A. M. Performance of *Trichogramma ostriniae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) reared on factitious hosts, including the target host, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Biological Control**, v. 21, p. 1-10, 2001.

JALALI, S. K.; SINGH, S. P. Differential response of four *Trichogramma* species to low temperatures for short term storage. **Entomophaga**, v. 37, n. 1, p. 159-165, 1992.

JAIN, K. J.; PAULSON, R. J. Oocyte cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 3, p. 1037-1046, 2006.

JAGDALE, G. B., PARWINDER, S. G., AND SALMNEN, S. O. Both heat-shock and cold-shock influence trehalose metabolism in an entomopathogenic nematode. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 988-994, 2005.

KING, E. G.; COLEMAN, R. J. Potential for biological control of *Heliothis* species. **Annual Review of Entomology**, v. 34, p. 53-75, 1989.

KRAZMER, D. J.; LUCK, R. F. Field tests of size-fitness hypothesis in the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum*. **Ecology**, v. 76, p. 412-425, 1995.

KRECHEMER, F. da S. *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae): **Biologia em ovos de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) e estocagem em baixas temperaturas de ovos de *Mythimna sequax* (Lepidoptera: Noctuidae)**. 65p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

KRECHEMER, F. S.; FOERSTER, L. A. Temperature effects on the development and reproduction of three *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species reared on *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs. **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 1 - 6, 2015.

LESSARD, E.; BOIVIN, G. Effect of low temperature on emergence, fecundity, longevity and host-feeding by *Trichogramma brassicae*. **BioControl**, v. 58, p. 319–329, 2013.

LEOPOLD, R. A.; ROJAS, R. R.; ATKINSON, P. W. Post pupariation cold storage of three species of flies: increasing chilling tolerance by acclimation and recurrent recovery. **Cryobiology**, v. 36, p. 213-224, 1998.

LEOPOLD, R. A.; RAJAMOCHAN, A.; SHELLY, T. E.; ALFRED, M. H. Quality Testing of Three Species of Tephritid Fruit Flies After Embryo Cryopreservation. **Annals of the Entomological Society America**, v. 103, n. 2, p. 264-272, 2010.

LOHMANN, T.; MARTINAZZO, T.; PIETROWSKI, V.; GIBBERT, F.; KRAEMER, B. Viabilidade do armazenamento de ovos de *Anagasta kuehniella*, Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) em nitrogênio líquido para a produção de *Trichogramma pretiosum*, Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). In: Resumos do V CBA. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, p. 1551-1555, 2007.

LÓPEZ, S. N.; BOTTO, E. Effect of cold storage on some biological parameters of *Eretmocerus corni* and *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae). **Biological Control**, v. 33, p. 123-130, 2005.

LUO, L.; PANG, Y.; CHEN, Q.; LI, G. Cryopreservation of the late stage embryos of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **CryoLetters**, v. 27, n. 6, p. 341-352, 2006.

MACFADYEN, S.; DAVIES, A. P.; ZALUCKI, M. P. Assessing the impact of arthropod natural enemies on crop pests at the field scale. **Insect Science**, v. 22, n. 1, p. 20-34, 2015.

MANANDHAR, R.; WRIGHT, M. G. Enhancing biological control of corn earworm, *Helicoverpa zea* and thrips through habitat management and inundative release of *Trichogramma pretiosum* in corn cropping systems. **Biological Control**, v. 89, p. 84–90, 2015.

MARCHIORO, C. A.; FOERSTER, L. A. Performance of the wheat armyworm, *Mythimna sequax* Franclemont, on natural and artificial diets. **Neotropical Entomology**, v. 41, n. 4, p. 288-295, 2012.



MILWARD-DE-AZEVEDO, E. M. V.; SERAFIN, I.; PIRANDA, E. M.; GULIAS-GOMES, C. C. Desempenho reprodutivo de *Nasonia vitripennis* Walker (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas crioconservadas de *Chrysomya megacephala* Fabricius (Diptera: Calliphoridae): avaliação preliminar. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 207-211, 2004.

NURINDAH, G. G.; CRIBB, B. W.; GORDH, G. Influence of rearing host size acceptance by *Trichogramma australicum*. **BioControl**, v. 44, p. 129-141, 1999.

OVERGAARD, J., MALMENDAL, A., SORENSON, J. G., BUNDY, J. G., LOESCHCKE, V., NIELSEN, N. C., AND HOLMSTRUP, M. Metabolomic profiling of rapid cold hardening and cold shock in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, p. 1218–1232, 2007.

ÖZDER, N. Effect of different cold storage periods on parasitization performance of *Trichogramma cacoeciae* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) on eggs of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 14, n. 5, p. 441-447, 2004.

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

PARRA, J. R. P. Biological Control in Brazil: An overview. **Scientia Agricola**, v. 71, n.5, p. 345-355, 2014.

PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; COELHO JR., A.; GEREMIAS, L. D.; CÔNSOLI, F. L. *Trichogramma* as a tool for IPM in Brazil. In: VISON, B. **Trichogramma in augmentative biological control: A worldwide view of the past, presente and future**. In press. 2015.

PEGG D. E. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Methods**. In: Molecular Biology. 2nd edn. Totowa: Humana Press Inc., 348p, 2007.

PEREIRA F. F.; BARROS, R.; PRATISSOLI, D.; PARRA, J. R. P. Biologia e exigências térmicas de *Trichogramma pretiosum* Riley e *T. exiguum* Pinto & Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae) criados em ovos de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 231-236, 2004.

PEVERIERI, G. S.; FURLAN, P.; BENASSAI, D.; STRONG, W. B.; ROVERSI, P. F. Long-term storage of eggs of *Leptoglossus occidentalis* for the mass-rearing of its parasitoid *Gryon pennsylvanicum*. **BioControl**, v. 60, p. 293-306, 2015.

PINTO, J. D. A review of the New World genera of Trichogrammatidae (Hymenoptera). **Journal of Hymenoptera Research**, v. 15, n. 38–163, 2006.

PITCHER, S. A. HOFFMANN, M. P.; GARDNER, J.; WRIGHT, M. G.; KUHAR, T. P. Cold storage of *Trichogramma ostriniae* reared on *Sitotroga cerealella* eggs. **Biocontrol**, v. 47, p. 25-535, 2002.

PIZZOL, J.; PINTUREAU, B.; KHOUALDIA, O.; DESNEUX, N. Temperature-dependent differences in biological traits between two strains of *Trichogramma cacoeciae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Journal of Pest Science**, v. 83, p. 447-452, 2010.

PIZZOL, J.; DESNEUX, N.; WAJNBERG, E.; THIÉRY, D. Parasitoid and host egg ages have independent impact on various biological traits in a *Trichogramma* species. **Journal of Pest Science**, v. 85, p. 489–496, 2012.

RAJAMOHAN, A. RINEHART, J. P.; FOSTER, S. P.; LEOPOLD, R. A. Permeability barriers to embryo cryopreservation of *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 2, p. 855-861, 2013.

RODRIGUES, S. M. M.; SAMPAIO, M. V. Armazenamento de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em baixas temperaturas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 1, p. 45-51, 2011.

ROITBERG, B. D.; BOIVIN, G.; VET, L. E. M. Fitness, parasitoids, and biological control: an opinion. **The Canadian Entomologist**, v. 133, p. 429-438, 2001.

ROVERSI, P. F.; COSI, E.; IRDANI, T. Chill sensitivity and cryopreservation of eggs of the greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Cryobiology**, v. 56, p. 1-7, 2008.

ROZSYPAL, J. The role of water, ice nucleators, and inoculation in insect cold survival. **Insect Physiology**, v. 5, p. 21–30, 2015.

RUNDLE, B. J.; THOMSON, L. J.; HOFFMANN, A. A. Effects of cold storage on field and laboratory performance of *Trichogramma carverae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and the response of three *Trichogramma* spp. (*T. carverae*, *T. nr. brassicae*, and *T. funiculatum*) to cold. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 2, p. 213-21, 2004.

SALT, G. The effects of hosts upon their insect parasites. **Biological Reviews**, v. 16, p. 239-263, 1941.

SALVADORI J. R.; PARRA, J. R. P. Desempenho de *Pseudaletia sequax* (Lep.: Noctuidae) em dietas naturais e artificiais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 25, n. 12, p. 1679-1686, 1990.

SIQUEIRA, J. R.; BUENO, R. C. O. F.; BUENO, A. F.; VIEIRA, S. S. Preferência hospedeira do parasitoide de ovos *Trichogramma pretiosum*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.1, p. 1-5, 2012.

SHAW, J. M.; COX, S. L.; TROUNSON, A. O.; JENKIN, G. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 161, p. 103-110, 2000.

SMITH, S. M. Biological control with *Trichogramma*: advances, successes, and potential of their use. **Annual Review of Entomology**, v. 41, p. 375-406, 1996.

SOUTHARD, S. G.; HOUSEWEART, M. W.; JENNINGS, D. T.; HALTEMAN, W. A. Size differences of laboratory reared and wild populations of *Trichogramma minutum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **The Canadian Entomology**, v. 114, p. 693-698, 1982.

TEZZE, A. A.; BOTTO, E. N. Effect of cold storage on the quality of *Trichogramma nerudai* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Biological Control**, v. 30, p. 11-16, 2004.

URBANEJA, A.; GONZALEZ-CABRERA, J.; ARNÓ, J.; GABARRA, R. Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. **Pest Management Science**, v. 68, n. 9, p. 1215-1222, 2012.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M.; VANDERZWALMEN, P. **Disadvantages and benefits of vitrification**. In: Vitrification in assisted reproduction. A user's manual and troubleshooting guide. London: Informa UK, p. 33-44, 2007.

VAN LENTEREN, J. C.; BUENO, V. H. P. Augmentative biological control of arthropods in Latin America. **BioControl**, v. 48, p. 123-139, 2003.

VINSON, S. B. Nutritional ecology of insect egg parasitoids. In: CÔNSOLI, F. L.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, A. (Eds). **Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma***. New York: Springer, 2010. cap. 2, p. 25 – 55.

YILMAZ, S.; KARABÖRKLÜ, S.; AYVAZ, ABDURRAHMAN. Effect of cold temperature durations on the performance of the adult *Trichogramma evanescens* (Westwood, 1833) (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Türkiye Entomoloji Dergisi**, v. 31, n. 4, p. 269-278, 2007.

WANG, W. B.; LEOPOLD, R. A.; NELSON, D. R.; FREEMAN, T. P. Cryopreservation of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) embryos. **Cryobiology**, v. 41, p. 153–166, 2000.

WANG, Z. Y.; HE, K. L.; ZHANG, F.; LU, X.; BABENDREIER, D. Mass rearing and release of *Trichogramma* for biological control of insect pests of corn in China. **Biological Control**, v. 68, p. 136-144, 2014.

ZACHARIASSEN, E. K. Physiology of cold tolerance in insects. **Physiology Review**, v. 65, n. 4, p. 799-832, 1985.

ZAMONER, M. **Efeito do volume de ovos hospedeiros sobre o desenvolvimento, capacidade de parasitismo e longevidade de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae)**. 2005. 44f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Curso de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná.

ZHENG, L.; SONG, K.; ZHENG, S. H. Mass production of *Trichogramma brassicae* on eggs of *Sitotroga cerealella* (Olivier). **Journal of Hebei Agricultural Sciences**, v. 7, p. 9-32, 2003.

ZUCCHI, R.A.; MONTEIRO, R.C. O gênero *Trichogramma* na América do Sul. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). ***Trichogramma e o controle biológico aplicado***. Piracicaba: FEALQ, 1997. Cap .2, p. 41-66.

ZUCCHI, R. A.; QUERINO, R. B.; MONTEIRO, R. C. Diversity and hosts of *Trichogramma* in the new world, with emphasis in South America. In: CÔNSOLI, F. L.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. (Eds). ***Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma****. New York: Springer, 2010. cap. 8, p. 219 – 236.