

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

MULTIPLICAÇÃO DO PARASITOIDE *Ooencyrtus submetallicus*
(HYMENOPTERA: ENCYRTIDAE) EM OVOS DE
HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS

ALEX POLATTO CARVALHO

Dourados
Mato Grosso do Sul
2019

MULTIPLICAÇÃO DO PARASITOIDE *Ooencyrtus submetallicus*
(HYMENOPTERA: ENCYRTIDAE) EM OVOS DE HOSPEDEIROS
ALTERNATIVOS

ALEX POLATTO CARVALHO

Orientador: PROF. DR. FABRÍCIO FAGUNDES PEREIRA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal da Grande Dourados, como
parte das exigências do Curso de Bacharelado em
Agronomia, para obtenção do título de Engenheiro
Agrônomo. Área de concentração: Entomologia

Dourados
Mato Grosso do Sul
2019

C331m Carvalho, Alex Polatto

Multiplicação do parasitoide *Ooencyrtus submetallicus* (Hymenoptera: Encyrtidae) em ovos de hospedeiros alternativos [recurso eletrônico] / Alex Polatto Carvalho. -- 2019.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Fabrício Fagundes Pereira.

TCC (Graduação em Agronomia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Técnica de multiplicação. 2. Criopreservação. 3. Endoparasitoide. I. Pereira, Fabrício Fagundes. II. Título.

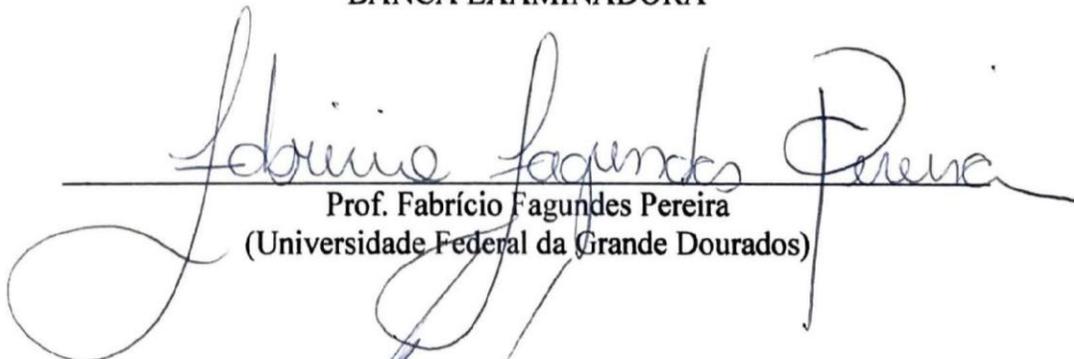
MULTIPLICAÇÃO DO PARASITOIDE *Ooencyrtus submetallicus* (HYMENOPTERA:
ENCYRTIDAE) EM OVOS DE HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS

ALEX POLATTO CARVALHO

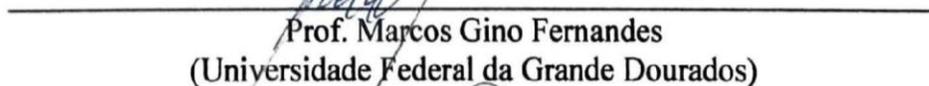
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal da Grande Dourados, como
parte das exigências do Curso de Bacharelado em
Agronomia, para obtenção do título de Engenheiro
Agrônomo. Área de concentração: Entomologia

Dourados, 22 de novembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Fabrício Fagundes Pereira
(Universidade Federal da Grande Dourados)



Prof. Marcos Gino Fernandes
(Universidade Federal da Grande Dourados)



Ivana Fernandes da Silva
(Universidade Federal da Grande Dourados/PNPD/EMBRAPA)

Agradecimentos

À Universidade Federal da Grande Dourados e à Faculdade de Ciências Agrárias pelas instalações, pelo curso e toda infraestrutura cedida para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais, pois sem o apoio deles eu não teria chegado onde cheguei;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica durante os anos de pesquisa;

Ao Prof. Dr. Fabrício Fagundes Pereira por me orientar na iniciação científica e no TCC;

Agradeço ao Flávio Fregulha e ao Júlio César por me auxiliarem no início do meu experimento com as criações dos insetos;

A todos do grupo de pesquisa do LECOBIO, por todos os ensinamentos passados durante esse tempo, pela convivência, brincadeiras e amizades;

A todos meus professores da graduação, pelos conhecimentos transmitidos;

Agradeço aos meus amigos que me acompanharam nesse período, em especial a Gabriele Bezerra e Gabriela Amorim que sempre estiveram comigo durante esse tempo;

Ao meu primo Eric Renan Zancanaro, com quem passei 3 anos morando junto, pelo companheirismo durante esse período;

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1 Multiplicação dos insetos que foram utilizados nos experimentos	12
2.1.1 Multiplicação do hospedeiro alternativo <i>Podisus nigrispinus</i> (Hemiptera Pentatomidae)	12
2.1.2 Multiplicação do parasitoide <i>Ooencyrtus submetallicus</i> (Hymenoptera Encyrtidae)	12
2.1.4 Criação de <i>Helicoverpa armigera</i> (Lepidoptera Noctuidae).....	13
2.1.5 Criação de <i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera Bombycidae).	13
2.1.6 Criação de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera Noctuidae)	14
2.2 Desenvolvimento experimental	14
2.2.1 Parasitismo em ovos de lepidópteros	14
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
3.1 Parasitismo em ovos de lepidópteros	16
3.2 Parasitismo em ovos de <i>P. nigrispinus</i> criopreservados	17
4. CONCLUSÕES	20
5. REFERÊNCIAS	21
Anexos	25

MULTIPLICAÇÃO DO PARASITOIDE *Ooencyrtus submetallicus* (HYMENOPTERA: ENCYRTIDAE) EM OVOS DE HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS

RESUMO

O uso de parasitoides em programas de controle biológico depende de estudos de sua bioecologia em hospedeiros naturais e alternativos e de sua produção em grandes quantidades para suprir as demandas devido à elevada capacidade reprodutiva dos insetos-praga. *Ooencyrtus submetallicus* (Hymenoptera: Encyrtidae) foi relatado na literatura, ocorrendo naturalmente em ovos de diversos pentatomídeos como *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii* e *Edessa mediatubunda* (Hemiptera: Heteroptera). Já se tem relato desse parasitoide ocorrendo também em ovos de lepidópteros. A criopreservação de hospedeiros tem viabilizado a utilização de parasitoides em tempo oportuno. O que nos motivou a comparar a biologia de *O. submetallicus* em ovos de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e em ovos de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) estocados em nitrogênio líquido a -196°C por diferentes períodos. O experimento foi realizado no Laboratório de Controle Biológico de Insetos (LECOBIOL) da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA). Para isso, dez ovos de cada espécie de lepidóptero oriundos das criações foram coletados e colados em cartelas de cartolina azul celeste com goma arábica a 10% e estas foram individualizadas em tubos de vidro e oferecidos a uma fêmea de *O. submetallicus* de 120 horas de idade. O parasitismo foi permitido por 24 h. Após este período, as cartelas com ovos parasitados foram mantidas em câmara climatizada a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14 h, até a emergência dos descendentes para posterior registro das características biológicas. Ovos de *H. armigera* e de *S. frugiperda* não foram parasitados por fêmeas de *O. submetallicus*. As porcentagens de parasitismo e de emergência, o número de indivíduos do parasitoide por ovo, a duração do ciclo de vida (dias), razão sexual e longevidade de fêmeas adultas (dias) de *O. submetallicus* em ovos de *B. mori* foram $90 \pm 5,53$; $26,33 \pm 8,24$; $1,56 \pm 0,21$; $18,20 \pm 0,55$ (dias); 1,0; $17,73 \pm 2,20$ dias, respectivamente, já em ovos de *P. nigrispinus* a porcentagem de parasitismo foi maior quando ovos foram armazenados por 60 dias, com $70,00 \pm 8,94\%$. A porcentagem de emergência não foi influenciada pelos períodos de armazenamento (0, 10, 20, 30 e 60 dias) com $59,51 \pm 10,15$; $42,67 \pm 7,58$; $44,67 \pm 9,50$; $66,67 \pm 8,37$ e $70,00 \pm 8,94$ respectivamente. A razão sexual foi 1 para todos os tratamentos. O número de indivíduos de *O. submetallicus* por ovo de *P. nigrispinus* foi de $1,53 \pm 0,04$; $1,39 \pm 0,04$; $1,39 \pm 0,03$; $1,22 \pm 0,01$ e $1,54 \pm 0,11$, sendo igual estatisticamente para todos os períodos de armazenamento avaliados. Ovos de *B. mori* podem ser utilizados como hospedeiro alternativo e *P. nigrispinus* podem ser estocados em nitrogênio líquido a -196°C por até 60 dias e posteriormente serem utilizados sem comprometer as principais características biológicas de *O. submetallicus*.

Palavras-chave: Técnica de multiplicação, Criopreservação, Endoparasitoide

**MULTIPLICATION OF *Ooencyrtus submetallicus* (HYMENOPTERA: ENCYRTIDAE)
PARASITOID IN EGGS OF ALTERNATIVE HOSTS**

ABSTRACT

The use of parasitoids in biological control programs depends on studies of their bioecology in natural and alternative hosts and their production in large quantities to meet the demands due to the high reproductive capacity of pest insects. *Ooencyrtus submetallicus* (Hymenoptera: Encyrtidae) has been reported in the literature, occurring naturally in eggs of several pentatomids such as *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii* and *Edessa meditabunda* (Hemiptera: Heteroptera). This parasitoid has also been reported to occur in lepidoptera eggs. The cryopreservation of hosts has enabled the use of parasitoids in a timely manner. What motivated us to compare the biology of *O. submetallicus* in eggs of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), *Spodoptera Frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and eggs of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) in liquid nitrogen at -196°C for different periods. The experiment was carried out at the Biological Insect Control Laboratory (LECOBIOL) of the Faculty of Biological and Environmental Sciences (FCBA). To this end, ten eggs of each species of lepidopteran from the farms were collected and pasted in cartons of sky blue cardboard with 10% arabic gum and these were individualized in glass tubes and offered to a 120 hours old female *O. Submetallicus* age. Parasitism was allowed for 24 h. After this period, the parasitized eggs were kept in a climate chamber at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ relative humidity and 14h photophase, until the emergence of the offspring for subsequent recording of biological characteristics. *H. armigera* and *S. frugiperda* eggs were not parasitized by *O. submetallicus* females. Parasitism and emergence percentages, number of parasitoid individuals per egg, life cycle length (days), sex ratio and longevity of adult females (days) of *O. submetallicus* in *B. mori* eggs were 90 ± 5.53 ; 26.33 ± 8.24 ; 1.56 ± 0.21 ; 18.20 ± 0.55 (days); 1.0; 17.73 ± 2.20 days, respectively, whereas in *P. nigrispinus* eggs the percentage of parasitism was higher when eggs were stored for 60 days, with $70.00 \pm 8.94\%$ respectively. Sex ratio was 1 for all treatments. The number of individuals of *O. submetallicus* per *P. nigrispinus* egg was 1.53 ± 0.04 ; 1.39 ± 0.04 ; 1.39 ± 0.03 ; 1.22 ± 0.01 and 1.54 ± 0.11 , being statistically equal for all storage periods evaluated. *B. mori* eggs can be used as an alternative host and *P. nigrispinus* can be stored in liquid nitrogen at -196°C for up to 60 days and subsequently used without compromising the main biological characteristics of *O. submetallicus*.

Key words: Multiplication technique, Cryopreservation, Endoparasitoid

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max*) tem grande importância na economia mundial e também na brasileira, onde na safra 2018/2019 atingiu uma área de plantio próxima de 35,9 milhões de hectares 2,1% superior em relação à safra anterior, com uma produção de 115 milhões de toneladas, sendo a segunda maior safra de soja alcançada no país (CONAB, 2019).

A cultura da soja é muito suscetível ao ataque de insetos desde o plantio até a colheita. No início do período vegetativo insetos como o bicudo-da-soja *Sternuchus subsignatus* (Boheman, 1836) (Coleoptera Curculionidae), lagarta elasmopálpus *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera Pyralidae), os corós *Phyllophaga cuyabana* (Moser, 1918), *Liogenis suturalis* (Blanchard 1851) (Coleoptera Scarabaeoidea) e os percevejos-castanhos-da-raiz *Scaptocoris castanea* (Perty 1830) e *Atarsocoris brachiariae* (Becker 1996) Hemiptera Cydridae provocam danos na cultura. Nas fases vegetativa e de floração os ataques são feitos por lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera Noctuidae), lagarta falsa-medideira *Chrysodeixis includes* (Walker, 1858) (Lepidoptera Noctuidae) e vários outros desfolhadores. Com o início da fase reprodutiva, surgem os percevejos sugadores de vagens e sementes *Nezara viridula* (Linnaeus 1758), *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) e *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera Pentatomidae) dentre outras espécies, que causam danos desde a formação das vagens até o final do enchimento dos grãos (Hoffmann-Campo *et al.* 2000). Entre 2011 a 2013, foram registrados surtos de lagartas *Helicoverpa armigera* (Hübner 1808) (Lepidoptera Noctuidae) em várias regiões do país, inclusive lavouras transgênicas (Bt) foram atacadas por essa lagarta (ÁVILA, VIVAN e TOMQUELSKI, 2013).

O uso de parasitoides em programas de controle biológico aplicado depende primeiramente de estudos de biologia, da capacidade de busca e de parasitismo em ovos da praga em condições de laboratório e campo e de sua produção em hospedeiros naturais e alternativos e de sua produção em grandes quantidades para suprir as demandas que são altas devido à elevada capacidade reprodutiva dos insetos-praga (Pereira *et al.* 2008; Piñeyro, 2016). Uma das dificuldades em utilizar parasitoides em ovos de pentatomídeos é justamente sua produção comercial. Já se tem relato desse parasitoide ocorrendo também em ovos de lepidópteros (SILVA *et al.* 2015).

Parasitoides apresentam interações biológicas específicas com seus hospedeiros para conseguir se desenvolver, reproduzir e gerar descendentes férteis (Godfray, 1994). A família Encyrtidae apresenta espécies que se reproduzem por partenogênese telítica, como o parasitoide *Ooencyrtus submetallicus* (Howard, 1897) (Hymenoptera: Encyrtidae) e as fêmeas podem apresentar hábito solitário ou gregário, dependendo do tamanho do hospedeiro e suas interações (KAPRANAS e TENA, 2015).

O gênero *Ooencyrtus* é bastante relatado como inimigo natural principalmente em áreas florestais e algumas pragas da agricultura (Huang e Noyes, 1994; Tunca, 2016). *O. submetallicus* foi relatado na literatura, ocorrendo naturalmente em ovos de Diversos como pentamídeos *N. viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) (Buschman e Whitcomb 1980) e *P. guildinii* (Corrêa-Ferreira e Moscardi, 1995); em *Edessa meditabunda* (Fabricius, 1794) (Golin *et al.* 2011). *O. submetallicus* também foi coletado em ovos de *E. meditabunda* em plantas de tomate, localizadas próximas a cultivos de soja, na região da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil (Piñeyro, 2016) e em ovos de *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) (CARVALHO *et al.* 2018).

A produção contínua, em massa e a baixo custo de insetos benéficos (predadores e parasitoides) é necessária para a implementação eficiente de programas de controle biológico de pragas (Bourdais *et al.* 2012; Colinet e Boivin, 2011). A maioria dos insetos utilizados em programas de controle biológico tem curto tempo de vida, por isso eles devem ser produzidos pouco antes de serem utilizados e enviados para os locais de liberação tão logo seja possível (Van Lenteren, 2000). Dessa forma, o desenvolvimento de métodos de armazenamento eficientes possibilitam o aumento da disponibilidade de parasitoides, e a redução do custo de programas de controle biológico (CHEN *et al.* 2008).

A criopreservação é um processo no qual células ou tecidos biológicos são preservados por meio do congelamento a temperaturas muito baixas, geralmente $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (o ponto de ebulição do nitrogênio líquido). A velocidade de congelamento é um dos fatores determinantes da taxa de conservação subsequente de células e tecidos. O grau de interferência varia conforme o tipo celular. Sabe-se que o congelamento ultrarrápido induz à formação de cristais de gelo menores, o que minimiza a formação de injúrias nos tecidos biológicos (Milward-de-Azevedo *et al.* 2004). O armazenamento de hospedeiros em

temperaturas baixas e/ou ultrabaixas tem viabilizado e racionalizado a criação e utilização de parasitoides em tempo oportuno (Colinet e Boivin, 2011; Rodrigues *et al.* 2011, Santacruz *et al.* 2017). Entretanto, as modificações morfofisiológicas, físicas e bioquímicas determinadas pelo processo de congelamento podem reduzir o desempenho reprodutivo de algumas espécies de parasitoides (Van Baaren *et al.* 2005).

Portanto isto nos motivou a verificar a eficiência do parasitoide em ovos de lepidópteros e um segundo trabalho foi avaliar a multiplicação do parasitoide em ovos de *P. nigrispinus* conservados em nitrogênio líquido a -196°C por diferentes períodos e posteriormente serem utilizados para otimizar a produção do parasitoide *O. submetallicus* em laboratório.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Controle Biológico de Insetos (LECOBIOL) da Faculdade de Ciências biológicas e Ambientais (FCBA), com as seguintes etapas:

2.1 Multiplicação dos insetos que foram utilizados nos experimentos

2.1.1 Multiplicação do hospedeiro alternativo *Podisus nigrispinus* (Hemiptera Pentatomidae)

Posturas do percevejo *P. nigrispinus* foram obtidas da criação massal da Empresa JB Biotecnologia, MG, na qual a criação é realizada com larvas e pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). Os insetos foram criados no LECOBIOL em sala climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 12 horas e UR de $65 \pm 10\%$). Para manutenção da criação, os ovos foram mantidos em placas de Petri (14 cm de diâmetro x 2 cm de altura) até a eclosão das ninfas. Uma pequena porção de algodão umedecido foi fixada na tampa. Como as ninfas começam a se alimentar apenas a partir do 2º estágio, nessa fase elas foram transferidas para potes plásticos transparentes de 1000 ml, onde a água foi fornecida em placas de petri com um chumaço de algodão. Ninfas e adultos foram criados nesses potes, separados por estágio e alimentados com larvas e pupas de *T. molitor* provenientes da criação estoque do LECOBIOL. Foram colocadas em média 50 ninfas de 2º estágio em cada pote, 40 de 3º estágio, 30 de 4º estágio, 20 de 5º estágio e 20 adultos (10 casais/pote). Os adultos foram acasalados após 3 dias da emergência. Os ovos foram retirados diariamente para manutenção de colônias do parasitoide e para continuidade da criação desse hospedeiro.

2.1.2 Multiplicação do parasitoide *Ooencyrtus submetallicus* (Hymenoptera Encyrtidae)

O. submetallicus já se encontra estabelecido por sucessivas gerações no LECOBIOL. Massas de ovos de *Nezara viridula* com 24 horas são colados em cartelas de cartolina azul-celeste (1,0 cm de largura e 7,0 de comprimento) com goma arábica (20%), e estes são expostos ao parasitismo por 24 horas. Adultos de *O. submetallicus* são mantidos em tubos de vidro (1,5 cm de diâmetro e 10 cm de comprimento) tampados com filme plástico e contendo uma gotícula de mel para alimentação além de dez ovos de hospedeiro foram

fixados com goma arábica a 20%. A criação foi conduzida a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas.

2.1.3 Criação de *Nezara viridula* (Hemiptera Pentatomidae)

Os percevejos foram coletados na fazenda experimental da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) por meio de batida de pano e catação manual. As ninfas e adultos de *N. viridula* foram criados em potes plásticos transparentes de 5L. Para a alimentação foram fornecidos vagem de feijão *Phaseolus vulgaris*, sementes de ligustro *Ligustrum sp.*, amendoim *Arachis hypogaea L.* e soja *Clycine max.* Foi colocado papel filtro 30cmx30cm dobrado em leque e tela voil 30cmx30cm no substrato, para a oviposição dos percevejos. Uma quantidade de ovos do percevejo *N. viridula* foi coletada e separada para a criação, colocada em placas de Petri com um chumaço de algodão úmido e vagem. O restante dos ovos foi destinado à multiplicação do parasitoide *O. submetallicus*. A criação foi conduzida e estabelecida em sala climatizada com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12h.

2.1.4 Criação de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera Noctuidae)

Para a criação de insetos de *H. armigera* no LECOBIOL, foi utilizada a dieta artificial de Greene, com algumas adaptações. Após a eclosão, as lagartas foram individualizadas em copos plásticos com capacidade para 50 ml, contendo dieta. Ficaram nos copos até virarem pupas, onde então eram retiradas e colocadas em um pote plástico maior. Após a emergência dos adultos, estes eram transferidos para uma gaiola de PVC, que consiste em um cano aberto nas duas extremidades, porém com um tecido nas pontas e forrado com papel sulfite na parte interna da gaiola para que as mariposas ovipositassem em seu interior. Parte dos ovos era destinado para a manutenção dos parasitoides e outra parte para a manutenção da criação das lagartas. A criação foi conduzida e estabelecida em sala climatizada com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12h.

2.1.5 Criação de *Bombyx mori* (Lepidoptera Bombycidae).

Pupas de *Bombyx mori* foram adquiridas de um criador local. As pupas foram levadas e mantidas no LECOBIOLOG até a emergência dos adultos em temperatura de ± 25 °C e umidade relativa do ar de $60 \pm 10\%$ UR. Cinco casais de adultos foram dispostos em uma gaiola de cano de PVC, revestido com papel sulfite A4. As fêmeas ovipositaram no papel, facilitando a retirada e o uso dos ovos para os experimentos. Os ovos de *B. mori* foram utilizados nos testes de parasitismo com o parasitoide *O. submetallicus*.

2.1.6 Criação de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera Noctuidae)

Para a criação de insetos de *S. frugiperda* no LECOBIOLOG, foi utilizada a dieta artificial de Greene, adaptada. Após a eclosão das lagartas, por apresentarem canibalismo, elas foram individualizadas em copos plásticos de 50 ml, contendo um pouco de dieta. Quando se transformavam em pupas, estas eram transferidas para potes plásticos, de 1 litro, até a emergência dos adultos, que então eram transferidos para gaiolas forradas com papel sulfite para oviposição das mariposas. Parte dos ovos era destinado para a manutenção dos parasitoides e outra parte para a manutenção da criação das lagartas. A criação foi estabelecida e conduzida em sala climatizada com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa do ar de $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12h.

2.2 Desenvolvimento experimental

2.2.1 Parasitismo em ovos de lepidópteros

Dez ovos de cada espécie de lepidóptero oriundos das criações foram coletados e colados em cartelas de cartolina azul celeste com goma arábica a 10% e estes foram individualizados em tubos de vidro (1,5 cm de diâmetro e 10 cm de comprimento) e oferecidos a uma fêmea de *O. submetallicus* de 24 horas de idade (ANEXO 1, 2 B - D e 3). O parasitismo foi permitido por 24h. Após esse período, as cartelas com ovos parasitados foram mantidas em câmaras climatizadas com condições controladas de temperaturas (25 ± 2 °C), umidade relativa ($80 \pm 10\%$) e fotofase de 14h, até a emergência dos descendentes para posterior registro das características biológicas como: número de ovos parasitados e com emergência de indivíduos do parasitoide, duração do ciclo de vida (dias), razão sexual e longevidade de adultos (dias).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e 15 repetições, sendo cada repetição constituída por uma cartela de dez ovos oferecida a uma fêmea do parasitoide. Os dados das características biológicas não foram analisados estatisticamente, pois *O. submetallicus* conseguiu parasitar e se desenvolver apenas em ovos de *B. mori*.

2.2.2 Parasitismo em ovos de *P. nigripinus* criopreservados

Ovos com 24h de idade foram armazenados em canecas mergulhadas em nitrogênio líquido a -196°C por 0, 10, 20, 30 ou 60 dias e como controle sem armazenamento (ANEXO 6 e 8). Após cada período de armazenamento, grupos de 10 ovos foram colocados sobre cartelas de cartolina azul celeste (1 x 5 cm) (ANEXO 7), fixados com goma arábica a 20% e inseridos em tubos de vidro (2,0 cm de diâmetro x 15 cm de comprimento) e oferecidos a uma fêmea de *O. submetallicus* de 120 horas de idade (ANEXO 4 e 5). O parasitismo foi permitido por 24h. Após este período, as cartelas com ovos parasitados foram mantidas em câmaras climatizadas com condições controladas de temperaturas ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($80 \pm 10\%$) e fotofase de 14h, até a emergência dos descendentes para posterior registro das características biológicas como: porcentagens de parasitismo e de emergência, número de indivíduos por ovo e razão sexual.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos e 15 repetições. Os dados das características biológicas foram submetidos à análise de regressão. A escolha da equação mais adequada foi baseada no Coeficiente de Determinação (R^2), na significância dos Coeficientes de Regressão (β_i) e da Regressão pelo Teste F (até 5% de probabilidade).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Parasitismo em ovos de lepidópteros

Ovos de *H. armigera* e de *S. frugiperda* não foram parasitados por fêmeas de *O. submetallicus*. Isto pode ser atribuído ao menor tamanho dos ovos destes hospedeiros, cerca de 0,42 mm a 0,60 mm e a largura de 0,40 mm a 0,55 mm (Ali; Choudhury, 2009), relativamente menores que ovos de seu hospedeiro natural *E. heros*. Sabe-se que o tamanho do ovo determina a quantidade de recursos disponíveis para o desenvolvimento da sua prole, assim, hospedeiros maiores possuem mais recursos disponíveis e são considerados de qualidade superior, influenciando a sua sobrevivência (GODFRAY 1994).

Parasitoides de ovos, em geral, avaliam a adequação do hospedeiro usando vários fatores que incluem o tamanho e a forma do ovo, características do córion, características químicas do interior, e fatores químicos da superfície do ovo (Klomp e Teerink, 1962, Pak e de Jong, 1987, Godfray, 1994, Pluke e Leibee 2006, Zhou *et al.* 2014). Sua avaliação fornece-lhes as informações necessárias para determinar a atividade de oviposição e alocação de ovos em espécies-alvo e não-alvo (Mansfield e Mills, 2004). O parasitismo de *O. submetallicus* em ovos do lepidóptero *Erinnyis ello* já foi registrado, e estes ovos apresentam 1,5 mm de diâmetro (Silva *et al.* 2015). São ovos de tamanho equivalente ao de seu hospedeiro *E. heros*.

As porcentagens de parasitismo e de emergência, o número de indivíduos do parasitoide por ovo, a duração do ciclo de vida (dias), razão sexual e longevidade de fêmeas adultas (dias) de *O. submetallicus* em ovos que medem aproximadamente 1 a 1,3 mm, de *B. mori* foram $90,00 \pm 5,53$; $26,33 \pm 8,24$; $1,56 \pm 0,21$; $18,20 \pm 0,55$ (dias); 1,0; $17,73 \pm 2,20$ dias, respectivamente. Estes resultados são próximos dos encontrados para *O. submetallicus* quando criado em seus hospedeiros naturais, pois de acordo com Piñeyro Ferreira (2016), parasitou 64% dos ovos de *E. heros* e 81% dos ovos de *C. pengue* e emergência deste parasitoide foi superior a 85% em ambos os hospedeiros.

A criação de *B. mori* é conhecida, tem baixo custo e uma fêmea consegue ovipositar cerca de 400 ovos, quantidade superior a de *E. heros* que é de 130 ovos (Costa *et al.* 1998). Isto nos permite sugerir ovos de *B. mori* como hospedeiro alternativo para a reprodução de *O. submetallicus* em larga escala.

3.2 Parasitismo em ovos de *P. nigripinus* criopreservados

A porcentagem de parasitismo de *O. submetallicus* em ovos de *P. nigripinus* foi influenciada pelos períodos de armazenamento em nitrogênio líquido, sendo maior na testemunha e aos sessenta dias, com $86,00 \pm 4,11$ e $70,00 \pm 8,94$ %, respectivamente (Figura 1).

O fato de *O. submetallicus* conseguir parasitar e se desenvolver em ovos submetidos a estas condições nos permite produzi-lo em grandes quantidades para posterior liberação de plantios de soja para controle biológico de pentatomídeos-praga. Isto também foi observado para *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygasteridae) ao ser multiplicado em ovos de *E. heros* armazenados a - 80 e - 196 °C por 20, 40, 50 e 70 dias, com parasitismo acima de 43% (SILVA *et al.* 2019).

A porcentagem de emergência de *O. submetallicus* em ovos de *P. nigripinus* armazenados por diferentes períodos em nitrogênio líquido foi semelhante, com média geral de 56,70 (Tabela 1). Já a porcentagem de emergência de *O. submetallicus* foi afetada pelo período de armazenamento de ovos de *E. heros*, sendo maior ($98,89 \pm 1,11$) e menor ($93,33 \pm 5,16$) nos tratamentos 0 e 180 dias, respectivamente (Sanomia, 2019). O número de indivíduos por ovo de *O. submetallicus* em ovos de *P. nigripinus* armazenados por diferentes períodos em nitrogênio líquido foi semelhante, com média geral de 1,41 (Tabela 1). Por outro lado, o número de indivíduos por ovo foi influenciado pelo período de armazenamento (sendo maior ($1,90 \pm 0,11$) e menor ($1,48 \pm 0,13$) nos tratamentos 60 e 180 dias, respectivamente (Sanomia, 2019). Isso reforça o êxito desta técnica de armazenamento de ovos, mas demonstra que existem diferenças entre hospedeiros.

A razão sexual de *O. submetallicus* foi 1, ou seja, existem apenas fêmeas nesta população de *O. submetallicus*. A predominância de fêmeas sobre machos é importante para criação em larga escala de parasitoides, pois as fêmeas são as principais responsáveis pelas gerações subsequentes em laboratório (Uçkan e Gulel, 2002) e por impedir a continuidade do ciclo do inseto-praga no campo (Fávero *et al.* 2014). A técnica de armazenamento de ovos de hospedeiros em nitrogênio líquido tem se mostrado bastante promissora para a produção de parasitoides, além disso, neste trabalho e no de Sanomia, 2019, ficou claro o grande êxito para a produção de *O. submetallicus*.

É importante ressaltar que, na ausência ou em períodos de diapausa de hospedeiros, pode-se utilizar desta técnica para produção deste parasitoide em grande escala especialmente para controle biológico de percevejos da soja.

Tabela 1. Médias (\pm erro padrão), porcentagem de emergência, número de indivíduos por ovo e razão sexual [$\Sigma \text{♀} / \Sigma (\text{♀} + \text{♂})$] dos adultos de *Ooencyrtus submetallicus* (Hymenoptera: Encyrtidae) criados em ovos de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) armazenados por diferentes períodos em nitrogênio líquido à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dourados-MS, UFGD, 2019.

Períodos (dias)	Emergência (%)	Nº de indivíduos/ovo	Razão Sexual [$\Sigma \text{♀} / \Sigma (\text{♀} + \text{♂})$]
0	59,51 \pm 10,15 ^{ns}	1,53 \pm 0,04 ^{ns}	1,00 \pm 00,00 ^{ns}
0	42,67 \pm 7,58 ^{ns}	1,39 \pm 0,04 ^{ns}	1,00 \pm 00,00 ^{ns}
20	44,67 \pm 9,50 ^{ns}	1,39 \pm 0,03 ^{ns}	1,00 \pm 00,00 ^{ns}
30	66,67 \pm 8,37 ^{ns}	1,22 \pm 0,01 ^{ns}	1,00 \pm 00,00 ^{ns}
60	70,00 \pm 8,94 ^{ns}	1,54 \pm 0,11 ^{ns}	1,00 \pm 00,00 ^{ns}
Média Geral	56,70 \pm 5,61	1,41 \pm 0,06	1,00 \pm 00,00

n.s= Não significativo ($p > 0,05$).

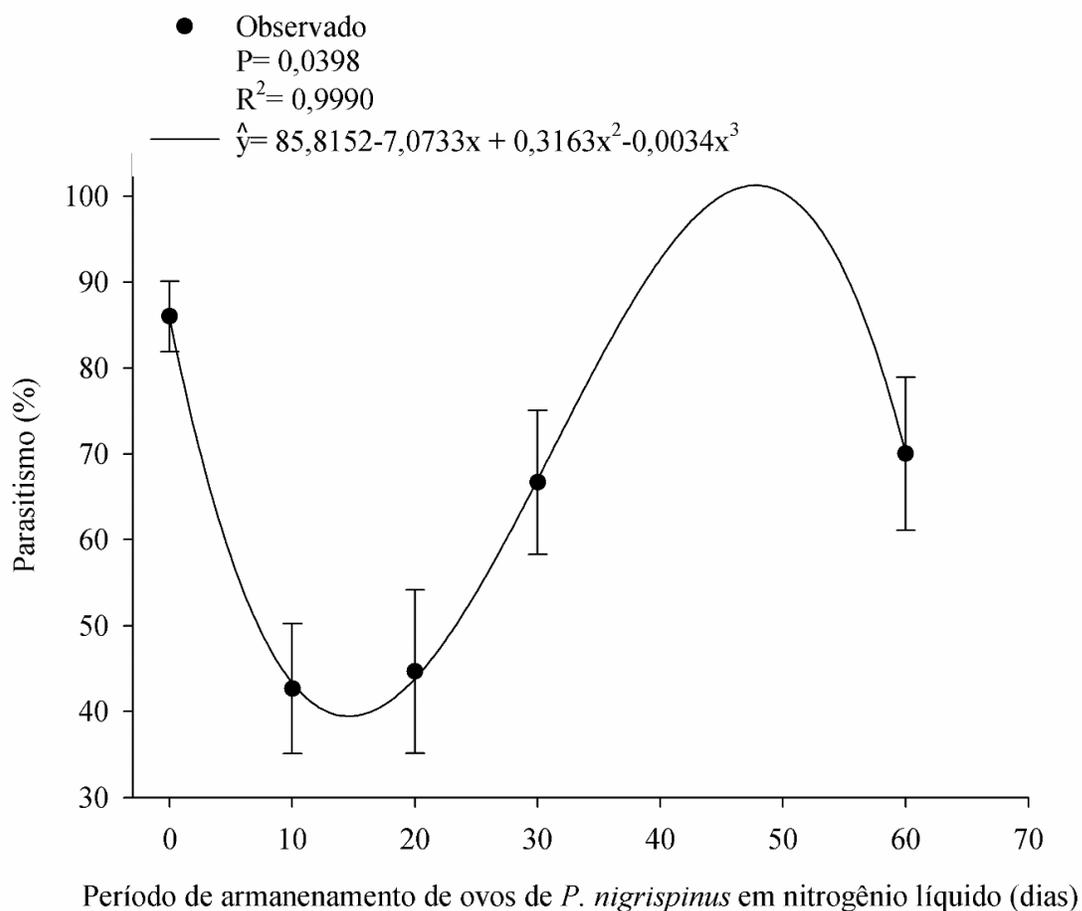


Figura 1. Parasitismo de *Ooencyrtus submetallicus* (Hymenoptera: Encyrtidae) em função do período de armazenamento de ovos de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) em nitrogênio líquido à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ e expostos por 24h ao parasitismo, a $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h. Dourados–MS, UFGD, 2019.

4. CONCLUSÕES

Fêmeas de *O. submetallicus* conseguem se reproduzir em ovos de *P. nigrispinus* armazenados em nitrogênio líquido (-196°C) por 10, 20, 30, ou 60 dias com parasitismo e emergência acima de 40%.

Ovos de *H. armigera* e de *S. frugiperda* não foram parasitados por fêmeas de *O. submetallicus*. Ovos de *B. mori* são adequados para reprodução de *O. submetallicus* e podem ser utilizados como hospedeiro alternativo para criação deste parasitoide.

5. REFERÊNCIAS

- ALI, A.; CHOUDHURY, R. A. 2009. Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. *Tunisian Journal of Plant Protection*. **4**: 99-106.
- ÁVILA, C. J.; VIVAN, M. L. TOMQUELSKI, G. V. 2013. Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. *Dourados*. **23**: 12
- BOURDAIS, D.; VERNON, P.; KRESPI, L.; VAN BAAREN J. 2012. Behavioural consequences of cold exposure on males and females of *Aphidius rhopalosiphi* de Stephani Perez (Hymenoptera: Braconidae). *BioControl* **57**: 349–360.
- BUSCHMAN, L. L.; WHITCOMB, W. H. 1980. Parasites of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) and other Hemiptera in Florida. *Florida Entomologist* **63**: 154-162.
- CARVALHO, A. P.; OLIVEIRA, F. M.; PEREIRA, F. F. 2018. Biologia comparada de *Ooencyrtus submetallicus* (Hymenoptera Encyrtidae) em ovos de Lepidoptera. *Dourados*.
- CHEN, W, L.; LEOPOLD, R.; HARRIS, M. O. 2008. Cold storage effects on maternal and progeny quality of *Gonatocerus ashmeadi* Girault (Hymenoptera: Mymaridae). *Biological Control* **46**: 122–132.
- COLINET, H.; BOIVIN, G. 2011. Insect parasitoids cold storage: A comprehensive review of factors of variability and consequences. *Biological Control* **58**: 83–95.
- CONAB. 2019. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos: Décimo Segundo Levantamento. Safra 2018/19. Brasília. **6**: 1-126. Arquivo online <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/gaos/boletim-da-safra-de-gaos> (acessado em 16/10/2019).
- CORREAFERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. 1995. Seasonal occurrence and host spectrum of egg parasitoids associated with soybean stink bugs. *Biological Control*, **5**: 196-202.
- COSTA, M. L. M.; BORGES, M.; VILELA, E. F. 1998. Biologia reprodutiva de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*, **27**: 559-568.
- FAVERO. K.; PEREIRA. F. F.; KASSAB, S. O.; COSTA, D. P.; ZANUNCIO, J.C. 2014. Life and fertility tables of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) with *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pupae. *Annals of the Entomological Society of America*. **107**: 621-626.
- GODFRAY, H.; CHARLES J. 1994. Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology. Princeton University Press.

- GOLIN, V.; LOIÁCONO, M. S.; MARGARÍA, C. B.; AQUINO, D. A. 2011. Natural Incidence of Egg Parasitoids of *Edessa mediatubunda* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) on *Crotalaria spectabilis* in Campo Novo do Parecis, MT, Brazil. *Neotropical Entomology*. **40**: 617-618.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORREA-FERREIRA, B. S.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B. 2000. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. Londrina: Embrapa-CNPSO. (Circular Técnica, 30) 70p.
- HUANG, D. W.; NOYES, J. H. 1994. A revision of the Indo-Pacific species of *Ooencyrtus* (Hymenoptera: Encyrtidae), parasitoids of the immature stages of economically important insect species (mainly Hemiptera and Lepidoptera). *Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology Series*. **63**: 1-136.
- KAPRANAS, A.; TENA, A. 2015. Encyrtid parasitoids of soft scale insects: Biology, behavior, and their use in biological control. *Annual review of entomology*. **60**: 195-211.
- KLOMP, H.; TEERINK, B. J. 1962. Host selection and number of eggs per oviposition in the egg parasites *Trichogramma embryophagum* Htg. *Nature*. **195**: 1020-1021.
- MANSFIELD, S.; MILLS, N. J. 2004. A comparison of methodologies for the assessment of host preference of the gregarious egg parasitoid *Trichogramma platneri*. *Biological Control*. **29**: 332-340.
- MILWARD-DE-AZEVEDO, E. M. V.; SERAFIN, I.; PIRANDA, E. M.; GULIAS-GOMES, C. C. 2004. Desempenho reprodutivo de *Nasonia vitripennis* Walker (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas crioconservadas de *Chrysomia megacephala* Fabricius (Diptera: Calliphoridae): Avaliação preliminar. *Ciência Rural* **34**: 207-211.
- PAK, G. A.; DE JONG E. J. 1987. Behavioural variations among strains of *Trichogramma* spp: Host recognition. *Netherlands Journal of Zoology*. **37**: 137-166.
- PEREIRA, F. F.; ZANUNCIO, T. V.; ZANUNCIO, J. C.; PRATISSOLI, D.; TAVARES, M. 2008. T. Species of Lepidoptera Defoliators of Eucalyptus as New Host for the Parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). *Brazilian Archives of Biology Technology*. **51**: 259-262.
- PIÑEYRO, N. G. 2016. *Ooencyrtus submetallicus* (HYMENOPTERA: ENCYRTIDAE): UM POTENCIAL PARASITOIDE DE *Euschistus heros* E *Chinavia pengue* (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE). Dourados, 76p.

PLUKE, R. W. H.; LEIBEE G. L. 2006. Host preferences of *Trichogramma pretiosum* and the influence of prior ovipositional experience on the parasitism of *Plutella xylostella* and *Pseudoplusia includes* eggs. *Biological Control*. **5**: 569-583.

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

SANOMIA, W. Y. 2019. Técnicas de produção de *Ooencyrtus submetallicus* (Hymenoptera: Encyrtidae) e seletividade de inseticidas. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal da Grande Dourados. 100p.

SANTACRUZ, E. N.; VENETTE, R.; DIECKHOFF, C.; HOELMER, K.; KOCH, R. L. 2017. Cold tolerance of *Trissolcus japonicus* and *T. cultratus*, potential biological control agents of *Halyomorpha halys*, the brown marmorated stink bug. *Biological Control*. **107**: 11–20.

SILVA, A. S.; PIÑEYRO, N. G. F.; PEREIRA, F. F.; COSTA, V. A. 2015. Biologia do parasitoide *Ooencyrtus submetallicus* (Hymenoptera: Encyrtidae) em ovos de *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae), praga da cultura de mandioca. In: 16º Congresso Brasileiro de Mandioca e 1º Congresso Latino-Americano e Caribenho de Mandioca, Foz do Iguaçu. Integração: Segurança Alimentar e Geração de Renda.

SILVA, G. V.; BUENO, A. F.; FAVETTI, B. M.; NEVES, P. M. O. J. 2019. Use of Low Temperature Storage to Preserve Host and Parasitoid to Improve the Rearing of *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygasteridae) on *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) Eggs. *Neotropical Entomology*. **48**: 126-135.

TUNCA, H.; BURANDINO, M.; COLOMBEL, E.; TABONE, E. 2016. Tendency and consequences of superparasitism for the parasitoid *Ooencyrtus pityocampae* (Hymenoptera: Encyrtidae) in parasitizing a new laboratory host, *Philosamia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae). *European Journal of Entomology*. **113**: 51-59.

UÇKAN, F.; GULEL. 2002. A. Age-related fecundity and sex ratio variation in *Apanteles galleriae* (Braconidae) and host effect on fecundity and sex ratio of its hyperparasitoid *Dibrachys boarmiae* (Hym., Pteromalidae). *Journal of Applied Entomology*. **126**: 534-537.

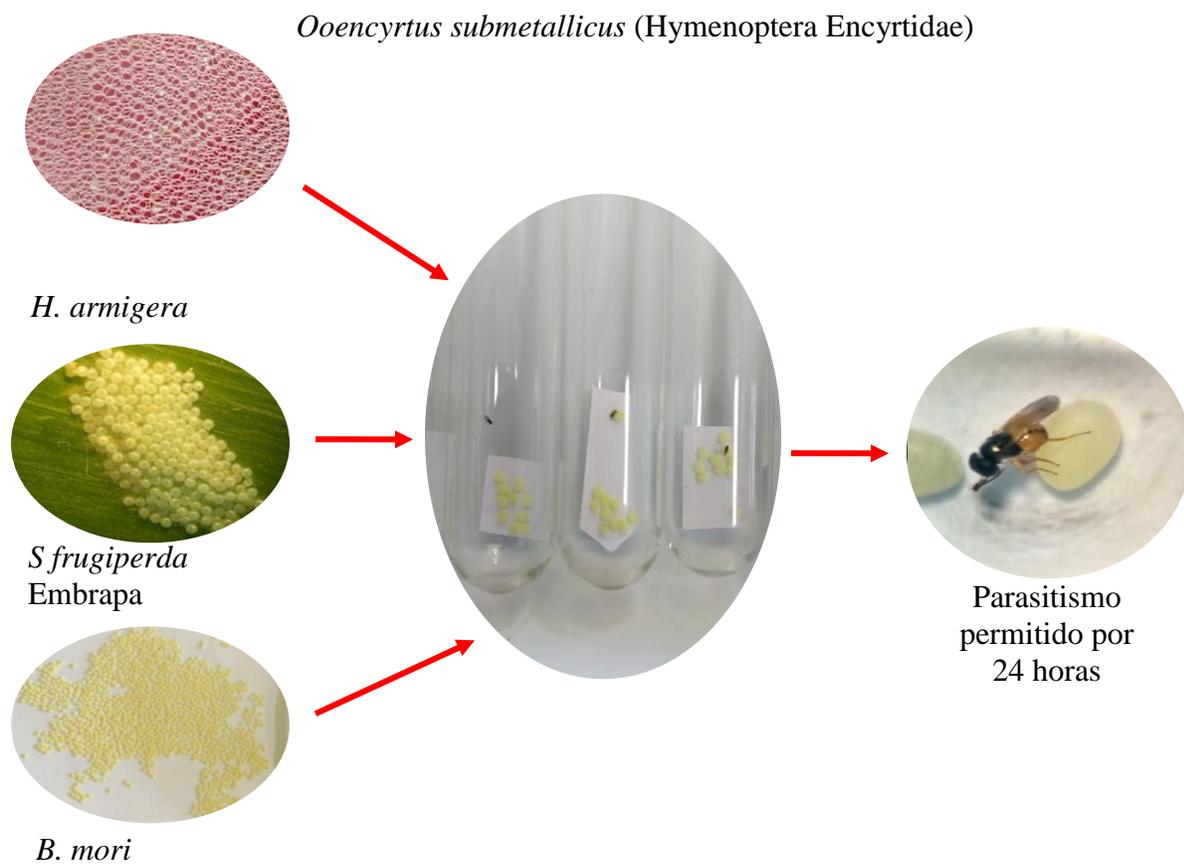
VAN BAAREN, J. OUTREMAN, Y. BOIVIN, G. 2005. Effect of low temperature exposure on oviposition behaviour and patch exploitation strategy in parasitic wasps. *Animal Behavior*. **70**: 153–163.

VAN LENTEREM, J. C. 2000. Controle de Qualidade de Agentes de Controle Biológico Produzidos Massalmente: Conhecimento, Desenvolvimento e Diretrizes. In Bueno, VHP. (Ed.). *Controle Biológico de Pragas: Produção Massal e Controle de Qualidade*. Lavras: UFLA. 21–40.

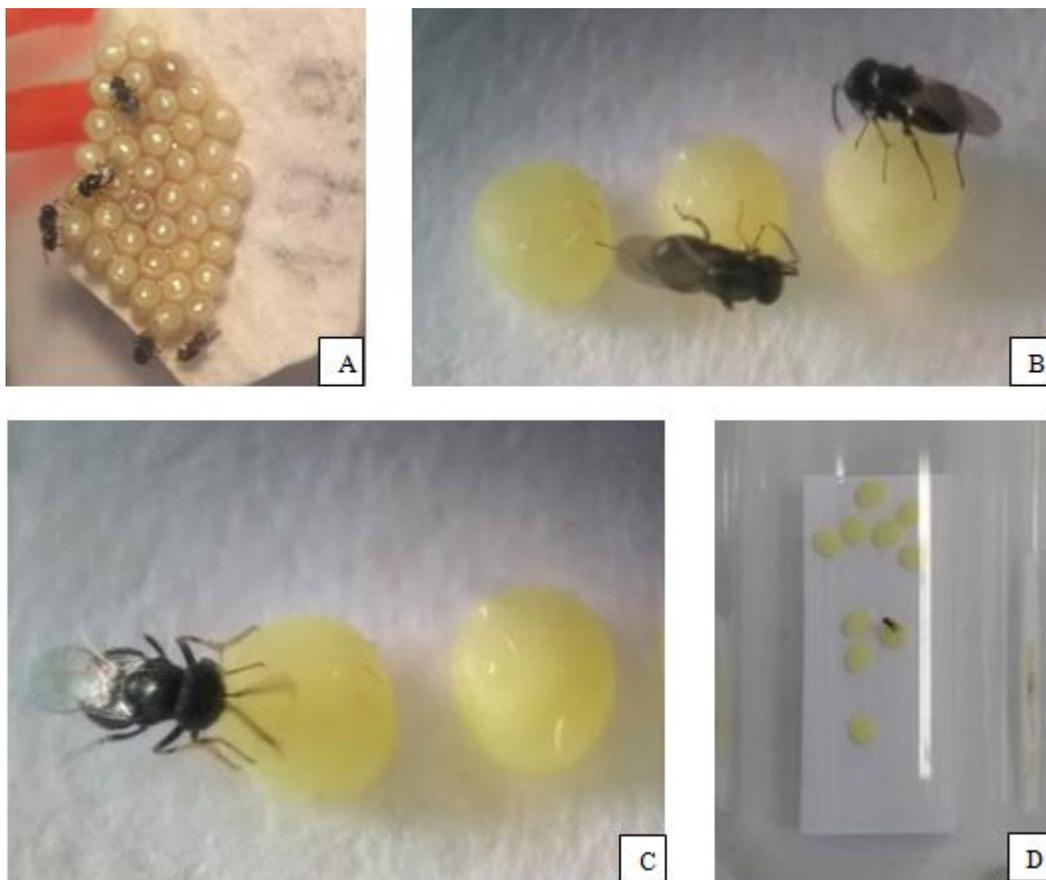
ZHOU, Y.; ABRAM, P. K.; BOIVIN, G.; BRODEUR, J. 2014. Increasing host age does not have the expected negative effects on the fitness parameters of an egg parasitoid. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*. **151**: 106-111.

Anexos

Anexo 1: Esquema de multiplicação do parasitoide

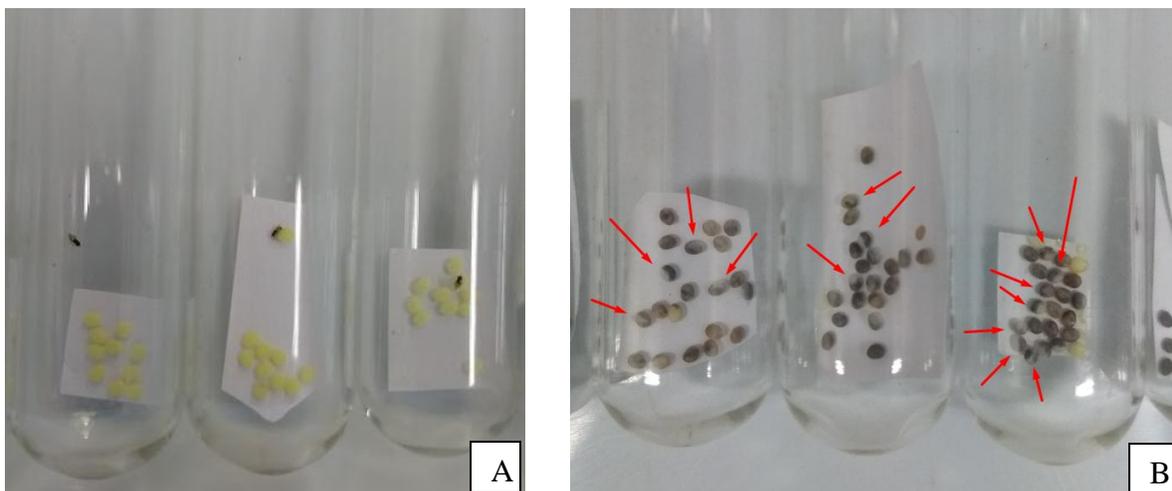


Anexo 2: Multiplicação dos parasitoides *Ooencyrtus submetallicus* (Hymenoptera: Encyrtidae)



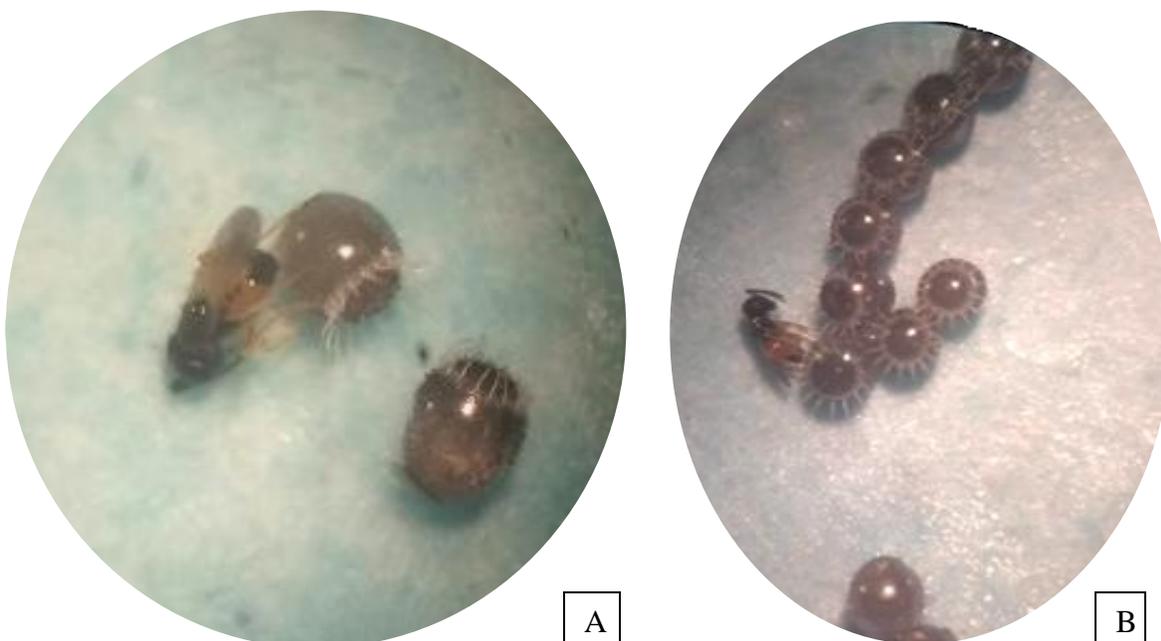
A - Multiplicação do parasitoide *Ooencyrtus submetallicus* (Hymenoptera: Encyrtidae) em hospedeiro natural *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae); **B**, **C** e **D** – Detalhe do parasitoide *O. submetallicus* em hospedeiro alternativo *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae).

Anexo 3: Ensaio em laboratório dos parasitoides *Ooencyrtus submetallicus* (Hymenoptera: Encyrtidae) parasitando ovos de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae)



A – Parasitoides *O. submetallicus* com 5 dias de idade parasitando ovos de *Bombyx mori* de 24 horas; **B** - Ovos já parasitados próximos da eclosão dos parasitoides adultos, apresentando coloração escura em metade do ovo, o que permite distinguir os ovos parasitados.

Anexo 4: Ensaio em laboratório dos parasitoides *Ooencyrtus submetallicus* (Hymenoptera: Encyrtidae) parasitando ovos de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae)



A e B - Parasitoides *O. submetallicus* com 5 dias de idade parasitando ovos de *P.nigrispinus* de 24 horas.

Anexo 5: Ensaio em laboratório dos parasitoides *Ooencyrtus submetallicus* (Hymenoptera: Encyrtidae) parasitando ovos de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae)

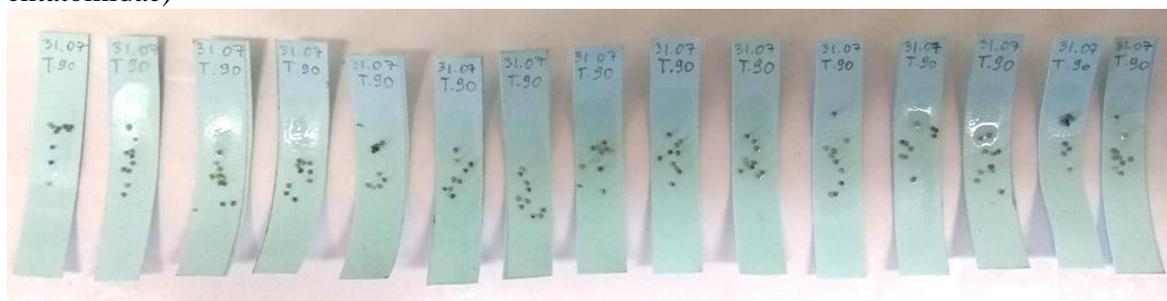


A e B – Tubos de vidro contendo cartelas com 10 ovos de *Podisus nigrispinus*; **C** – Fêmeas individualizadas nos tubos de vidro antes das cartelas serem oferecidas.

Anexo 6: Armazenamento dos ovos de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) em tubos apropriados para congelamento em baixas temperaturas



Anexo 7: Preparo das cartelas para parasitismo dos ovos de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae)



Anexo 8: Tambor de nitrogênio líquido usado para armazenamento dos ovos de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) a baixas temperaturas

