

TÉCNICAS DE ARMAZENAMENTO DE OVOS DE INSETOS PARA PROGRAMAS DE CONTROLE BIOLÓGICO

Luciano Pacelli Medeiros Macedo

Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Entomologia. Caixa Postal 09 – 13418-900, Piracicaba, SP. E-mail: lupacelli@yahoo.com.br

Patrício Borges Maracajá

Prof. Dr. Departamento de Ciências Vegetais da UFERSA - 59600-970, Mossoró-RN, patricio@ufersa.edu.br

Carlos Eduardo Souza Bezerra

Departamento de Ciências Vegetais da UFERSA - 59600-970, Mossoró-RN. Carlos.esb@gmail.com

RESUMO - É de grande importância a utilização de técnicas de armazenamento de ovos de insetos para garantir a continuidade do desenvolvimento de populações, pois o conhecimento de determinadas exigências, como temperatura, fotoperíodo e outros, determinam o sucesso de qualquer programa de controle biológico de insetos.

Palavras Chaves: insetos e controle biológico

STORAGE TECHNIQUES OF INSECTS EGGS FOR BIOLOGICAL CONTROL PROGRAMS

ABSTRACT - It's of great importance the use of storage techniques of insects eggs to guarantee the continuity of the populations development, because the knowledge of some exigencies, like temperature, photoperiod and others, determinates the success of any program of biological control of insects.

Key Words: insects and biological control

1. INTRODUÇÃO

Para a obtenção de sucesso em uma criação massal de insetos é de relevância imprescindível que esta tenha continuidade durante todo o ano, pois se houver interrupção da mesma não se conseguirá, em curto prazo de tempo, retornar aos níveis de uma produção massal. Assim sendo, como as liberações de inimigos naturais são realizadas apenas em determinadas épocas do ano, é importante dispor de técnicas para o armazenamento de ovos, visando a continuidade da criação em períodos críticos, como por exemplo na

entressafra, quando os insetos não estão disponíveis no campo (PARRA, 2001).

Existem algumas técnicas que visam o armazenamento de ovos de insetos-praga para criação de agentes efetivos de controle biológico, mantendo a qualidade de seus nutrientes ou a fim de preservar a vida de parasitóides neles contidos.

Segundo Parra (2001), uma das grandes limitações de um entomologista é dispor de um inseto durante todo o ano para a realização de estudos básicos sobre o mesmo, a fim de conhecer sua biologia e tornar possível seu controle. E, uma solução para tal problema seria armazenar os insetos em condições de temperatura que paralisassem temporariamente seu

desenvolvimento. Este armazenamento também seria útil para impedir a eclosão ou a emergência de insetos durante o transporte, caso haja um intercâmbio de insetos entre laboratórios de regiões distintas.

De acordo com Flanders (1938), em trabalhos de controle biológico, baixas temperaturas são utilizadas para facilitar o transporte de parasitóides a longas distâncias e para regular o tempo de liberação dos mesmos. Essas baixas temperaturas, geralmente, estão acima da temperatura base do metabolismo do parasitóide. Este autor relatou, ainda, que a temperatura adequada para o armazenamento de insetos, situa-se logo abaixo do seu limiar inferior de desenvolvimento.

O armazenamento, a baixas temperaturas, oferece benefícios para o controle biológico por permitir maior flexibilidade e eficiência na produção massal, reunindo, em determinado período, grande quantidade de insetos para suprir a demanda por ovos ou larvas jovens. No entanto, existem outras técnicas que mantêm a viabilidade dos embriões por algum tempo, como o armazenamento em nitrogênio líquido, a indução da diapausa, etc. Algumas vezes, torna-se incontestável a inviabilização dos ovos, como em casos onde o hospedeiro é canibal e, após a eclosão, ataca o ovo, prejudicando o parasitóide que está se desenvolvendo no mesmo.

Considerando o exposto, o presente trabalho procurou aludir algumas técnicas de armazenamento de ovos de insetos, tentando, à medida do possível, inseri-las dentro do contexto do controle biológico.

2. Técnicas utilizadas para o armazenamento de ovos de insetos

2.1. Determinação das exigências térmicas e uso de baixas temperaturas

A temperatura do ar é um fator ambiental ecológica e biologicamente importante sobre a vida dos insetos, afetando diretamente o desenvolvimento, metamorfose, reprodução e comportamento, e indiretamente sua alimentação (ANDREWARTHA & BIRCH, 1954; CAMMELL & KNIGHT, 1992). Os seus efeitos sobre os insetos têm sido comprovados em inúmeras pesquisas conduzidas sob condições artificiais, havendo muitos trabalhos demonstrando sua influência sobre a duração e velocidade de desenvolvimento de diversas espécies.

Segundo Silveira Neto *et al.* (1976), os insetos são considerados animais de sangue frio, ou simplesmente, **poiquilotérmicos**, pois possuem a capacidade de manter a temperatura corpórea próxima a do meio ambiente, ao contrário dos mamíferos, que são **homeotérmicos**. Para o ajustamento da temperatura do corpo em relação ao ambiente, os insetos são classificados em **ciclotérmicos**, quando a temperatura do corpo acompanha a do ambiente dentro da faixa de 10 - 30 °C, sendo ligeiramente diferenciada no momento em que esta faixa for extrapolada; **heliotérmicos**, quando aproveitam os raios solares para elevar a temperatura do corpo e, **quimiotérmicos**, aumentando a temperatura do corpo através de uma atividade muscular. Ainda de acordo com estes autores, prevalecem em sua maioria os insetos ciclotérmicos.

O uso de baixas temperaturas, como forma de diminuir a taxa de metabolismo e desenvolvimento, tem sido a principal estratégia empregada em muitos experimentos com armazenamento de insetos. Uma das formas de se iniciar o armazenamento de determinada fase de desenvolvimento do inseto é através da determinação da temperatura base (T_b), também conhecida como limiar térmico inferior de desenvolvimento. Nesta condição, o metabolismo é reduzido sem que ocorra a morte do inseto, podendo ser utilizada tal temperatura para o

armazenamento do estágio, do inseto, desejado (PARRA, 2001).

De acordo com Parra (1997, 2001), conhecendo-se as exigências térmicas, é possível fazer-se uma previsão ou mesmo controlar a produção do inseto em laboratório. Isso porque as necessidades térmicas dos insetos são avaliadas pela constante térmica (K), a qual desde há muitos anos é utilizada em previsão de crescimento de plantas. Esta hipótese parte do princípio de que a duração do desenvolvimento pela temperatura é uma constante, sendo o somatório da temperatura computado a partir do limiar térmico inferior.

A constante térmica é expressa pela fórmula:

$$K = D (T - T_b), \text{ onde:}$$

K = constante térmica, expressa em graus-dias;

D = duração do desenvolvimento, em dias;

T = temperatura ambiente, em °C;

T_b = temperatura base, em °C.

Uma vez determinado o limiar térmico inferior é possível estimar o ciclo do inseto em uma sala cuja temperatura seja registrada ou controlada (PARRA, 1992). O valor da temperatura base de desenvolvimento da fase de ovo é muito importante para o armazenamento de ovos que não foram utilizados, em épocas em que não há liberações, para o parasitismo com espécies do gênero *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae), por exemplo (PARRA, 1997).

A temperatura ótima para a maioria dos insetos situa-se ao redor de 25 °C, o que corresponde ao ponto de desenvolvimento mais rápido e com maior número de descendentes. A 38 °C tem-se a temperatura limiar máxima, enquanto a

15 °C, a temperatura limiar mínima. Dentro dessa faixa (15 - 38 °C) concentra-se a faixa ótima de desenvolvimento e atividade dos insetos. Entre 38 e 48 °C, os insetos entram em estivação temporária, ou seja, podem readquirir atividade normal quando se a temperatura diminuir. De 48 - 52 °C os insetos entram em estivação permanente, constituído por um quadro irreversível, atingindo a morte na temperatura máxima fatal, ou seja, 52 °C. Do mesmo modo, em temperatura inferior a 15 °C, os insetos entram em hibernação temporária até uma temperatura crítica, abaixo de 0 °C, onde ocorre o congelamento dos mesmos. Neste caso, o inseto vive em estado anabiótico até atingir a temperatura mínima fatal de -20 °C (SILVEIRA NETO *et al.*, 1976; GALLO *et al.*, 1988).

Neste tópico da revisão, serão mencionadas algumas técnicas relacionadas com as exigências térmicas e o uso de baixas temperaturas, utilizadas para o armazenamento de ovos de insetos, assim como os resultados alcançados por algumas pesquisas neste âmbito.

Chiang & Sisson (1968) e Wilde (1971) determinaram que a temperatura base para as espécies *Diabrotica longicornis* (Say) e *Diabrotica virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) era próxima de 10 °C, sendo a constante térmica de 368 a 396 graus-dia para o completo desenvolvimento embrionário da espécie *D. longicornis*. A partir destes resultados, Palmer *et al.* (1977), trabalhando com a espécie *D. virgifera*, relataram que a viabilidade dos ovos foi mantida, por um período de 30 dias, armazenando-os à 10 °C em meio aquoso contendo ágar (0,125%).

Branson (1978) verificou que os ovos de *D. virgifera* podem ser armazenados a 10 °C por 52 semanas, sem perda de viabilidade com relação à testemunha (25 °C).

Segundo Jackson (1985), ovos de *Diabrotica* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae) são convenientemente armazenados em solos argilosos, com partículas menores que 0,18 mm, à temperatura de 8 °C, por um período superior a 150 dias. Schaafsma *et al.* (1991) desenvolveram um modelo para previsão de eclosão de larvas de

D. virgifera, em condições de campo, baseando-se nas exigências térmicas da fase de ovo pós-diapausa, e concluíram que o desenvolvimento era linear, na faixa de temperatura de 16 a 28 °C, sendo 10,5 °C a temperatura base, resultando em uma constante térmica de 258 graus-dia. Levine *et al.* (1992), trabalhando com a espécie *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae), no Estado de Illinois, EUA, determinaram que a temperatura base e a constante térmica foram de 12,7 °C e 209,7 graus-dia, respectivamente. Os valores encontrados diferem daqueles obtidos por Wilde (1971), que trabalhou com uma população de *D. v. virgifera* no Estado de Minnesota, também nos EUA, sugerindo que existe uma significativa diferença fisiológica entre as populações estudadas, nas diferentes áreas geográficas.

Stein (1985) e Stein & Parra (1987) determinaram as exigências térmicas para a fase de ovo de *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Para este estudo, foram usados tubos de vidro contendo em seu interior um pedaço de papel de filtro umedecido. Os tratamentos foram representados pelas temperaturas de 18, 20, 22, 25, 30 e 32 °C, utilizando-se câmaras climatizadas, do tipo BOD. Os autores encontraram uma temperatura base de 10,30 °C e uma constante térmica de 80,06 graus-dia, para a fase de ovo de *A. kuehniella* e constataram, em função das exigências térmicas do inseto, que se pode obter em condições laboratoriais durante um ano, um total de seis a sete gerações desta praga.

Milanez (1995) estudou o efeito da temperatura no desenvolvimento embrionário de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae). A pesquisa foi conduzida em seis câmaras climatizadas, do tipo BOD, reguladas a 18, 20, 22, 25, 30 e 32 °C, umidade relativa de

60 ± 10% e fotofase de 14 horas. Foram utilizados 100 ovos, divididos em cinco grupos de vinte, e colocados em caixas plásticas (6,0 cm de diâmetro x 2,0 cm de altura). Cada caixa plástica foi forrada com papel filtro mantido úmido e vedada com fita adesiva. Os ovos receberam tratamento para desinfecção superficial, através da imersão em solução de hipoclorito de sódio, na concentração de 0,05%, por dois minutos. Após o quinto dia, as caixas foram abertas diariamente para contagem das larvinhas eclodidas. A partir dos resultados obtidos, constatou-se que a menor viabilidade ocorreu nas temperaturas extremas, ou seja, 18 e 32 °C. Contudo, os resultados não diferiram estatisticamente das demais temperaturas. O limite térmico inferior de desenvolvimento da fase de ovo foi de 11,1 °C e a constante térmica, de 119,1 graus-dia. O autor ainda concluiu que há possibilidade de armazenar os ovos de *D. speciosa* nesta temperatura base pelo período de 56 dias, o que poderá contribuir para a manutenção contínua da criação em laboratório.

De acordo com Fisher *et al.* (1994), ovos de *Diabrotica barberi* Smith & Lawrence (Coleoptera: Chrysomelidae) podem ser armazenados por um período de 180 dias em temperaturas variando entre 9 - 12 °C, com viabilidade de 60%.

Nava (2000) determinou as exigências térmicas em laboratório, para a fase de ovo de *Cerotoma arcuatus* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae), utilizando sete câmaras climatizadas, do tipo BOD, reguladas a 18, 20, 22, 25, 28, 30 e 32 °C, umidade relativa de 70 ± 10% e 14 horas de luz. Os ovos foram distribuídos em placas de acrílico, com 6 cm de diâmetro x 2 cm de altura. Em seguida, as placas foram desinfestadas com álcool e forradas com papel de filtro umedecido, tratado com uma solução de CuSO₄ a 1%, por dez minutos. As placas, contendo os ovos, foram fechadas com parafilme[®] e levadas às câmaras nas temperaturas anteriormente referidas, verificando-se, diariamente, a presença de lagartas eclodidas e tendo o cuidado de se manter a umidade adequada, adicionando-se água. Através dos resultados

obtidos, o autor comprovou que a duração do período embrionário foi influenciada pela temperatura. Este período variou de 22,15 a 5,97 dias, entre 18 e 32 °C, respectivamente, sendo decrescente nesta faixa, embora não tenha ocorrido diferença estatística entre os valores obtidos a 28, 30 e 32 °C. Quanto a viabilidade dos ovos, esta variou de 68,64 a 81,02%, na faixa térmica estudada, não sendo registrada diferença estatística entre as temperaturas. Porém, os resultados não mostraram relação constante com a variação da temperatura, haja vista que a 25 e 30 °C a viabilidade foi de 82,22 e 81,02%, respectivamente. Ainda de acordo com este autor, a temperatura base e a constante térmica foram de 13,64 °C e 106,65 graus-dia, respectivamente, com um alto coeficiente de determinação (R^2), o qual foi de 98,61%.

Chernaki & Almeida (2001), estudando o efeito de quatro temperaturas constantes (22, 35, 28 e 31 °C) sobre as fases imaturas de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), constataram que a temperatura base para a fase de ovo foi de 17,8 °C e a constante térmica igual a 40,09 graus-dia. Com base nos resultados obtidos, os autores concluíram que o controle de *A. diaperinus* em épocas de temperaturas mais baixas, ou seja, inferiores a 16,5 °C, pode contribuir de maneira eficiente para eliminar um número maior de insetos, em seus diferentes estádios, já que nesta faixa não ocorreu desenvolvimento de imaturos e a quantidades de insetos foi menor.

Ashamo & Odeyemi (2001) armazenaram ovos de *Euzopherodes vapidella* Mann (Lepidoptera: Pyralidae) em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, utilizando quatro temperaturas (20, 24, 29 e 33 °C), umidade relativa superior a 75% e escotofase de 24 horas, e observaram o completo desenvolvimento dos mesmos. A

temperatura base foi de 16,8 °C. Na temperatura de 20 °C, os autores constataram que os ovos podem ser armazenados durante 12,1 dias, diminuindo com a elevação da temperatura. Entretanto, nesta temperatura, foi comprovada a menor viabilidade (25,0%).

Voute (1935)¹, citado por Davison (1944), utilizando temperaturas variáveis de 13 a 33 °C, obteve para ovos de *A. kuehniella* períodos de incubação inversamente proporcionais às temperaturas, sendo 3,1 e 21 dias para as temperaturas de 32 e 15 °C, respectivamente. A viabilidade foi maior a 15,5 °C, e a partir desta temperatura, diminuiu à medida que a temperatura decrescia ou aumentava.

Jacob & Cox (1977) mantiveram ovos de *A. kuehniella* armazenados às temperaturas de 12, 18, 25 e 31 °C e obtiveram, respectivamente, os seguintes períodos de incubação: 28, 9, 5 e 3 dias. Os autores observaram também, que a viabilidade dos ovos *A. kuehniella* armazenados por um período de 15 dias a 7,5 e 10 °C, variou de 20-30% e 89-90%, respectivamente.

Ovos de um dia, de *A. kuehniella*, foram previamente inviabilizados em luz ultravioleta e acondicionados em "pailletes", refrigerados por 30 minutos a 3 °C e, em seguida, armazenados em "freezer" do tipo horizontal, à temperatura de -18 °C. Neste experimento, constatou-se que os ovos armazenados por apenas três dias mostraram-se totalmente inviabilizados pela baixa temperatura, concluindo que o armazenamento de ovos de *A. kuehniella* à temperatura em estudo é inviável (Schmidt, 1991). Várias espécies do gênero *Trichogramma* foram capazes de se desenvolver em ovos de *A. kuehniella*, armazenados durante 90 dias à temperaturas de congelamento ou entre 1 - 6 °C (Daumal & Boinel, 1994).

Segundo Curl & Burbutis (1977), ovos de *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) parasitados por *Trichogramma nubilalis*

¹ VOUTE, A.D. The egg development of flour moth, *Ephestia kuehniella* Zell., at constant temperatures. **Z. Angew. Ent.**, v.22, p.1-25, 1935.

Ertle & Davis (Hymenoptera: Trichogrammatidae) podem ser armazenados a 1,7 °C.

Heinrichs & Matheny (1969) concluíram que é possível armazenar ovos de *Pediasia trisecta* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae) a 4 °C por 30 dias e, em seguida, incubá-los, durante sete a oito dias a 25 °C, sem que ocorra um decréscimo na viabilidade.

Voegelé *et al.* (1974) verificaram que ovos de *A. kuehniella* irradiados sob luz ultravioleta por 45 minutos, quando conservados entre -1 e 4 °C, possuem qualidade igual ou ligeiramente superior a de ovos recém colocados, não alterando a taxa de multiplicação de *Trichogramma evanescens* Westwood e de *Trichogramma brasiliensis* Ashmead (Hymenoptera: Trichogrammatidae) criados, com esses ovos, por até seis gerações. O tempo de armazenamento nestas condições, pode ser estendido até 60 dias sem que haja prejuízo na taxa de multiplicação dos parasitóides. Esta taxa só diminui significativamente na Segunda geração, criada em ovos armazenados por 60 dias. A volta da taxa a níveis normais requer a criação dos parasitóides novamente em ovos frescos.

De acordo com Drooz & Solomon (1980), os ovos do hospedeiro facultativo, *Clostera inclusa* (Hübner) (Lepidoptera: Notodontidae), podem ser armazenados a -10 °C durante 30 dias, podendo, posteriormente, serem utilizados, para o desenvolvimento de *Ooencyrtus ennomophagus* Yoshimoto (Hymenoptera: Encyrtidae). Alguns testes comprovaram que esses ovos podem ser armazenados por mais de um ano. Entretanto, segundo Drooz (1981), ovos de *Lambdina pellucidaria* (Grote & Robinson) (Lepidoptera: Geometridae), um outro hospedeiro de *O. ennomophagus* não obtiveram sucesso, quando submetidos a temperatura de -10 °C, supondo-se que

esta temperatura tenha ocasionado alguma mudança fisiológica, a qual foi prejudicial ao desenvolvimento do parasitóide sobre o ovo, pois constatou-se que apenas 19,8% dos parasitóides emergiram.

Keller (1986), utilizando ovos de mariposas selvagens como hospedeiro do parasitóide de ovos *Trichogramma exiguum* Pinto & Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae), verificou que quando os ovos do hospedeiro foram submetidos à temperatura de 9 °C, o parasitóide demorou de 56 a 127 dias para se desenvolver, enquanto que a 25 °C o parasitóide desenvolveu-se em 10 dias.

Salmeron *et al.* (1986) armazenaram ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) nas temperaturas de 5 e 9 °C e concluíram que 5 °C foi a temperatura mais indicada, permitindo armazenar por até seis dias, com uma viabilidade de 77,27%.

Kuznetsova (1970)², citado por Bichão (1989), armazenou ovos de *Chrysoperla carnea* Stephens (Neuroptera: Chrysopidae) a 8 °C, durante 15 dias e constatou uma porcentagem de sobrevivência de 47-50%, para ovos com um dia, e 34 - 42%, para ovos com dois dias. O mesmo autor indica como desaconselhável, a conservação de ovos por períodos de 21 dias, pois reduz a sobrevivência à apenas 40%. Bichão (1989), submetendo ovos de *C. carnea* com idades entre 0 e 24 horas, à temperaturas de 6 e 10 °C, durante períodos de 3, 8, 10 e 15 dias, constatou que a temperatura de 10 °C é mais adequada que 6 °C, para este tipo de armazenamento, pois a diminuição da viabilidade dos ovos é menos pronunciada. A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que a conservação pelo frio, até 10 dias, é possível a 10 °C, implicando em uma redução da eclosão de cerca de 19%. Esta conservação é desaconselhável por períodos de 15

² KUZNETSOVA, Y.I. A study of the possibility of storage of the eggs of *Chrysopa carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). **Zool. Zhurn.**, v.49, p.1505-1514, 1970.

dias, ou mais, por originar grandes reduções na viabilidade dos ovos (cerca de 32%).

Aun (1986) verificou que ovos de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) podem ser armazenados, sem aumentar a taxa de mortalidade dos embriões, na temperatura de 10 °C por até 15 dias. De acordo com esta autora, os embriões dos crisopídeos são sensíveis à baixas temperaturas, de modo que a taxa de mortalidade aumenta para 40% quando os ovos são armazenados na temperatura de 8 °C por um período de 21 dias.

Huai-Yi (1988) obteve bons resultados no congelamento de ovos de *Antheraea pernyi* (Guérin) (Lepidoptera: Saturniidae), em temperaturas extremas, congelando diretamente os ovos contidos em bolsas de gase e descongelando-os em água a 30 °C. Após nove meses, os ovos apresentaram poucos danos e quando oferecidos a *Trichogramma dendrolimi* Walker (Hymenoptera: Trichogrammatidae), apresentaram taxas de parasitismo e emergência da ordem de 64,6 e 48,9%, respectivamente.

Callejas & Azpiazu (s.d.)³, citados por Schmidt (1991), armazenaram a 3 °C, ovos frescos de *Corcyra cephalonica* (Stainton) (Lepidoptera: Pyralidae) por diversos períodos entre 2 e 30 dias, e após cada período, os ovos foram parasitados por *Trichogramma oatmani* Torre (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Após 10 dias de armazenamento não houve diferença significativa na fecundidade média; porém, a partir de 15 dias,

ocorreram flutuações significativas no parasitismo, motivadas pela perda das características normais dos ovos.

Para a produção de *Pyrilla perpusilla* Walker (Hemiptera: Lophopidae) em ovos do hospedeiro *Epiricania melanoleuca* Fletcher (Lepidoptera: Epipyropidae), Madan & Chaudhary (1993) testaram as temperaturas de 5; 7,5; 10; 12,5 e 15 °C no armazenamento desses ovos, concluindo que as temperaturas de 12,5 e 15 °C foram as mais adequadas, observando-se uma taxa de viabilidade dos ovos, mantidos nessas temperaturas, superior a 50% por um período de 20 dias de armazenamento.

De acordo com Jensen *et al.* (1994), ovos de *Anopheles quadrimaculatus* Say (Diptera: Culicidae) possuem alta viabilidade após um período de armazenamento de 28 dias, sobre papel filtro. Hunt & Tabachnick (1995) observaram que ovos de *Culicoides variipennis sonorensis* Wirth & Jones (Diptera: Ceratopogonidae) podem ser armazenados à temperatura de 5 °C por 28 dias, sem que ocorra perda de viabilidade.

Srinivasababu *et al.* (1996) trataram ovos das raças bivoltinas NB4D2 e NB18 de *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae) em água quente a temperatura de 48 °C, durante dez segundos, armazenando-os, após este tratamento, por 183 dias em temperaturas baixas. Os ovos da raças NB4D2 e NB18 apresentaram uma viabilidade de 89,12 e 88,10%, respectivamente, enquanto os ovos destas raças não tratados tiveram uma viabilidade de 67,75 e 74,13%, respectivamente. A eclosão dos ovos tratados foi uniforme, com uma duração de um dia, ao passo que a dos ovos não tratados foi desuniforme, prolongando-se por dois dias.

Kamble (1998) observou que ovos híbridos de *B. mori* podem ser armazenados a 2,5 °C, durante 40 dias, quando ainda encontram-se nos primeiros estádios embriônicos (ovos de 24 horas), enquanto ovos de 48 e 72 horas de idade suportam as temperaturas de 2,5 e 5 °C, durante 30 e 20 dias, respectivamente. Quando ovos bivoltinos são expostos a um tratamento ácido, aqueles de 24 horas podem ser armazenados por 30 dias a 5 °C e

³ CALLEJAS, S.L.T.; AZPIAZU, M.D. Índice de parasitación del *Trichogramma oatmani* Torre, com huevos refrigerados. In: UNIVERSIDAD DE La HABANA, *Trichogramma*; estudio sobre la parasitación. Habana, Direccion de Información Científica Técnica, p.15-20, s.d.

os de 48 e 72 horas, por apenas 20 dias, não comprometendo a viabilidade.

2.1.1. Resistência de insetos à baixas temperaturas

Quanto à resistência ao congelamento, Asahima (1969) classificou como **resistentes** os insetos que conseguem evitar o congelamento do corpo através do “super-resfriamento” (redução drástica do ponto de congelamento) e como **tolerantes** aqueles que suportam as injúrias resultantes da formação de gelo em seus corpos. Essa resistência e tolerância, variam com o estágio de desenvolvimento do inseto, sendo menor durante os períodos de crescimento e reprodução.

Segundo Salt (1958), o baixo ponto de “super-resfriamento” (-47 °C), atingido por larvas de *Bracon cephi* (Gahan) (Hymenoptera: Braconidae), não pode ser creditado somente ao aumento da concentração de glicerol no corpo deste inseto, mas na interação do glicerol com outros solutos, tais como açúcares, sais e aminoácidos. Esta interação acontece pela aglutinação do glicerol com porções de água do inseto, elevando conseqüentemente a concentração dos demais solutos e abaixando o ponto de congelamento.

O modo mais fácil de se iniciar o congelamento de um inseto é através da penetração via cutícula, de cristais de gelo formados a partir da umidade da superfície do corpo do inseto (SALT, 1936⁴, CITADO POR ASAHIMA, 1961).

A probabilidade de formação de gelo intracelular depende de fatores que controlam a taxa de remoção de água das células, no início do processo de congelamento extracelular, envolvendo:

⁴ SALT, R.W. Studies on the freezing process in insects. **Tech. Minn. Agric. Exp. Stn.**, v.116, p.41, 1936.

taxa de resfriamento, proporção superfície/volume, permeabilidade da membrana à água e do coeficiente de temperatura da constante de permeabilidade (ASAHIMA, 1961).

Pelo congelamento lento (0,4 °C/minuto), a formação de cristais de gelo externo é favorecida, ao contrário do congelamento rápido (32,7 °C/minuto), que favorece a formação de gelo intracelular que destrói os tecidos (Friedler *et al.* 1988). As células destruídas desta forma apresentam-se inchadas ou vacuolizadas (Asahima, 1969). Este autor sugeriu que a desidratação que ocorre nas células do inseto durante o congelamento, provoca modificações na estrutura das proteínas contidas no protoplasma celular, ocorrendo, então, uma interação desfavorável entre essas proteínas modificadas e a água que mantém o protoplasma organizado.

Estudando a sobrevivência de insetos sob temperaturas extremamente baixas (-196 °C), Asahima (1959) constatou que o pré-congelamento a -30 °C aumentou a capacidade de sobrevivência dos mesmos. Esse aumento, segundo este autor é devido ao fato de que este tratamento prévio provocaria um congelamento extracelular suficiente para impedir a formação de cristais de gelo intracelular indesejáveis.

Adler (1960) expôs ovos de *Sitotroga cerealella* (Olivier) (Lepidoptera: Gelechiidae) e *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae), traças de farinhas, às temperaturas de 3,9 e -16,6 °C, por períodos de uma a oito horas e uma a cinco horas, respectivamente. Na temperatura mais alta o autor observou uma inviabilização total dos ovos de ambas as traças, para os respectivos períodos máximos de exposição, porém, com apenas uma hora de exposição, as viabilidades foram de 10 e 65%, respectivamente para *S. cerealella* e *P. interpunctella*. Por outro lado, na temperatura mais baixa os ovos foram inviabilizados após quatro horas; nesta temperatura, com apenas uma hora de exposição, as viabilidades foram de 65% para *S. cerealella* e de 32% para *P. interpunctella*.

Heinrichs & Matheny (1969) submeteram ovos de *Chrysoteuchia topiarie* (Zeller)

(Lepidoptera: Pyralidae), *Crambus pascuellus floridus* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae) e *P. trisecta* à temperaturas entre -10 e 25 °C e observaram que após 30 dias, a 10 °C, não ocorreram eclosões de nenhuma espécie, quando estes foram mantidos posteriormente a 25 °C. Entretanto, após este mesmo período, a 4 °C, ocorreram eclosões para *P. trisecta*.

Cox *et al.* (1981) submetem, às temperaturas de 10 e 15 °C, ovos de *C. cephalonica* em períodos de desenvolvimento embrionário variáveis (0, 48 e 72 horas) a 25 °C e 65% de umidade relativa. Após sete dias de exposição a 10 °C os ovos tornaram-se totalmente inviáveis, e as larvas que eclodiram de ovos expostos por cinco dias morreram ainda nesta fase. A temperatura de 15 °C mostrou-se mais favorável à manutenção da viabilidade dos ovos de *C. cephalonica* por um período de até sete dias, quando se observou também, que a resistência de ovos à baixas temperaturas decresceu com o desenvolvimento embrionário.

Wysoki & Renneh (1985) armazenaram ovos de *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) em “freezer” à temperatura de -20 °C por 60 dias. Após este período, os ovos foram descongelados a 4 °C por duas horas e, em seguida, submetidos ao parasitismo por *Trichogramma platneri* Nagarkatti (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Esses ovos foram incubados a 27 °C e 65% de umidade relativa e apresentaram uma taxa de parasitismo de 68,5%, enquanto que na testemunha registrou-se um parasitismo de 70,3%.

Takemura *et al.* (2000) reportaram que ovos de *B. mori* podem ser armazenados em “freezer” em temperatura variando entre 5 e -65 °C/minuto, mantendo uma elevada viabilidade dos embriões, os quais são utilizados,

posteriormente, no processo de inseminação artificial.

2.2. Armazenamento de ovos em nitrogênio líquido

Esta técnica vem sendo utilizada em programas de controle biológico como forma de armazenamento de ovos de diversas espécies de insetos.

Beglyarov *et al.* (1982) armazenaram ovos de *C. cephalonica*, os quais foram acondicionados em tubos plásticos em contato direto com o nitrogênio líquido. Os ovos armazenados em contato com o nitrogênio líquido foram descongelados, por imersão direta em água aquecida a 35-37 °C. Para evitar a formação indesejável de massa de ovos aderidos, os autores adicionaram talco à água. Esses ovos foram aceitos como alimento por *C. carnea*, porém houve uma redução de 25% na viabilidade larval.

Morrison (1988) armazenou ovos de *S. cerealella* em recipientes de vidro, tendo os ovos recebido um pré-congelamento a 10 °C, por 24 horas, antes de serem imersos em nitrogênio líquido, onde permaneceram por 21 dias. Após este período, os ovos foram retirados e colocados para serem parasitados por *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae); a emergência variou de 68,1 a 92,0%.

Cheng-Lung *et al.* (1988) constataram que a conservação de ovos em nitrogênio líquido durante 2,5 anos é viável. Foram usados sacos duplos de plástico para congelar e armazenar os ovos de *A. pernyi*, evitando-se assim a “rachadura” dos mesmos durante o congelamento e descongelamento. Análises feitas com os ovos armazenados ao longo e após 2,5 anos demonstraram que a qualidade e quantidade de aminoácidos não diferiram daquelas dos ovos recém colocados.

Zhenwey & Qiyao (1988) testaram o congelamento de ovos em nitrogênio líquido e em forma de gás, e concluíram que para ovos de *C. cephalonica*, o melhor método é o gás. Quanto ao

invólucro para congelamento de ovos, o que propiciou a melhor taxa de parasitismo foi o tubo fino de plástico. Constataram, ainda, que os melhores resultados para *C. cephalonica* foram obtidos com armazenamento de ovos de um dia. Os ovos da traça-do-arroz foram previamente resfriados a 4 °C por 30 minutos e em seguida congelados e armazenados em nitrogênio líquido por oito meses. Após a retirada do material, a melhor forma de descongelamento foi a imersão dos ovos em água a 60 °C. A porcentagem de parasitismo dos ovos após o descongelamento chegou a 65,63%, com uma emergência de 89,4%. As características biológicas dos indivíduos não foram alteradas.

O parasitóide *Trichogramma* spp. foi criado com sucesso em ovos do hospedeiro *S. cerealella* armazenados em nitrogênio líquido, a -196 °C, durante 30 e 130 dias (GRECO & STILINOVIC, 1998).

Schmidt (1991) inviabilizou, previamente, ovos de *A. kuehniella* sob luz ultravioleta e os acondicionou em “pailletes” (tubos de plásticos finos de 13 x 0,3 cm) utilizados no congelamento e armazenamento de sêmen e de embriões bovinos, resfriados à temperatura de 3 °C por 30 minutos (ZHENWEY & QIYAO, 1988) e armazenados por 8 e 37 dias em nitrogênio líquido, a uma temperatura de -196 °C, por dois diferentes métodos de congelamento. O primeiro processo de congelamento foi obtido colocando-se o “canister” (tubo metálico utilizado para submergir as “pailletes” no nitrogênio líquido) no interior de um “freezer” horizontal, até que a temperatura no interior do “canister” atingisse -15 °C, decrescendo na razão de 2,5 °C/minuto. Em seguida, o “canister” foi transferido rapidamente do “freezer” para o recipiente de armazenamento, ficando suspenso a uma distância de 5 cm da superfície do

nitrogênio líquido, até atingir a temperatura de -45 °C, quando então o “canister” foi imerso definitivamente em nitrogênio líquido. As temperaturas, no interior do “canister” foram medidas através de um termistor com registro digital de temperatura. No segundo processo, as “pailletes” foram previamente resfriadas em câmara climatizada à temperatura de 3 °C durante 30 minutos e em seguida o “canister” foi imerso em nitrogênio líquido. Utilizando-se somente este processo, foram também armazenados, por cinco dias, ovos de *A. kuehniella* de 24 e 48 horas de idade, com desenvolvimento de embrião ocorrido a 25 °C, umidade relativa de 60% e fotofase de 14 horas. Para ambos os processos de armazenamento, utilizou-se um recipiente com capacidade de 10 litros de nitrogênio líquido e espaço para seis “canisters”. Ao final de cada período de armazenamento, o descongelamento dos ovos foi realizado, retirando-se as “pailletes” do nitrogênio líquido e submergindo-as imediatamente em água, por 15 segundos a 70 °C. Como conclusões, este autor relatou que os ovos de *A. kuehniella* são parasitados por *T. pretiosum* após o armazenamento em nitrogênio líquido, porém não permitem o desenvolvimento do parasitóide; o nitrogênio líquido provocou alterações nos ovos de *A. kuehniella*, mantendo-os por mais tempo em condições de serem parasitados.

A técnica de congelamento de ovos em nitrogênio líquido permitiu, em 1984, que os camponeses das províncias de Feng Cheng Village e Harlum County, na China, suprissem 4.667 hectares com *Trichogramma* criados em ovos armazenados (HUAI-YI, 1988).

2.3. Inviabilização de embriões

De acordo com Parra (1997), a inviabilização do embrião muitas vezes é necessária para o armazenamento de ovos atacados por parasitóides.

Entre os vários processos utilizados para a obtenção de ovos inviáveis, está o uso da radiação ultravioleta (UV). Bournier & Peyrelongue (1973)

a fim de evitar eclosão de lagartas de *A. kuehniella*, as quais poderiam se alimentar, por serem canibais, de outros ovos, inclusive parasitados, submeteram os ovos deste piralídeo à radiação ultravioleta por um período de 15 a 18 minutos. Para isso, usaram uma lâmpada de 15 watts de potência, instalada a uma distância de 15 cm dos ovos. Posteriormente, estes ovos foram levados para um refrigerador à 5-6 °C, permitindo a sua conservação por até 20 dias.

A técnica utilizada por Voegelé *et al.* (1974) para matar embriões de *A. kuehniella* consistiu também na exposição de ovos à radiação ultravioleta (lâmpada de 15 watts) a uma distância de 65 cm por intervalos de tempo constantes. Os autores verificaram que os ovos são mais sensíveis a radiação ultravioleta quando apresentam idades inferiores a 24 horas e superiores a 48 horas. Esta diferença na resistência foi em decorrência do baixo poder de penetração dos raios ultravioleta, pois esta radiação apresenta ação periférica. Com menos de 24 horas o ovo foi considerado sensível, pois as células que se multiplicam estão na sua periferia (blástula), sendo atingidos pela radiação. Por outro lado, no intervalo de 24 a 48 horas (estágio resistente), estaria ocorrendo a gastrulação e conseqüentemente a banda germinativa estaria fora de alcance da radiação. A volta a sensibilidade a partir de 48 horas, seria decorrência da fase de formação dos apêndices embrionários, que tendem a se aproximar da periferia do ovo (córion). Assim, segundo estes autores, em alguns casos os embriões não morrem devido a posição que eles permanecem durante o tratamento, pois a luz ultravioleta não os atinge diretamente.

Stein (1985) e Stein & Parra (1987) também submeteram ovos de *A. kuehniella* à radiação ultravioleta, com a finalidade de determinar o tempo de exposição e a

distância ideal para matar os embriões e evitar assim, as eclosões das lagartas e conseqüentemente o canibalismo, que pode prejudicar programas de controle biológico, pois as lagartas recém-eclodidas destroem indistintamente ovos não parasitados e parasitados. A metodologia utilizada foi a proposta por Bournier & Peyrelongue (1973). Estes autores concluíram que ovos de *A. kuehniella*, nas condições estudadas, são esterilizados a partir de 45 minutos de exposição.

De acordo com Schmidt (1991), ovos de *A. kuehniella* e *C. cephalonica*, destinados ao parasitismo por *T. pretiosum*, foram inviabilizados em luz ultravioleta, fornecida por uma lâmpada germicida. Os embriões foram inviabilizados, colocando-os a 15 cm da fonte por 30 minutos, adotando-se a metodologia de Bournier & Peyrelongue (1973) e Stein & Parra (1987), antes de serem armazenados na condição térmica correspondente à temperatura base, em câmaras climatizadas, do tipo BOD. Após cinco dias de desenvolvimento, já enegrecidos, os ovos foram contados e separados dos demais. O autor concluiu que o armazenamento de ovos das traças, *A. kuehniella* e *C. cephalonica*, nas respectivas temperaturas bases, ou seja, 10,4 e 13,2 °C, determinou um baixo parasitismo por *T. pretiosum*, sendo estas inadequadas para o armazenamento de ambas as traças.

De acordo com Parra (1997), o tempo de exposição a tal radiação e a distância entre a fonte e os ovos devem ser adequados para que não seja alterada a característica do ovo ao parasitismo. Tal inviabilização é fundamental, pois mesmo que haja um grande porcentual de ovos parasitados, sobrarão alguns não-parasitados, e as lagartas eclodidas desses ovos destruirão, indistintamente, os parasitados e os não-parasitados.

2.4. Indução da diapausa

Compreender a sazonalidade e os fatores controladores da diapausa pode ser de grande importância para prever o comportamento dos insetos no campo e em laboratório, permitindo

uma adequada manipulação dos mesmos. Por exemplo, a simulação de condições capazes de induzir diapausa pode abrir novos horizontes no campo da conservação e armazenamento de material biológico em condições ótimas, por períodos prolongados (BICHÃO, 1989; MACEDO, 2001).

Inicialmente, o termo diapausa foi utilizado por Wheeler, 1893⁵, citado por Schmidt (1991), para denominar o estado de “anatrepsia” na embriogênese do ortóptero *Xiphidium ensiferum*. Desde então, o significado da diapausa tem sido enfocado diferentemente por inúmeros autores.

A diapausa foi definida como um estado fisiológico de desenvolvimento e reprodução retardados, muitas vezes essencial para sincronizar o desenvolvimento entre hospedeiros e parasitóides, principalmente se o primeiro for univoltino (DOUTT, 1959).

Para Mansingh (1971), a diapausa é o sistema de dormência mais evoluído, com o qual os insetos superam as condições ambientais extremas, longas e cíclicas. Esta dormência, por sua vez, é induzida bem antes das adversidades climáticas e mantida por algum tempo, independente das condições do ambiente.

De acordo com Tauber & Tauber (1973; 1976), a diapausa caracteriza-se por um conjunto de respostas ecofisiológicas, as quais constituem uma estratégia de adaptação dos insetos às condições bióticas e físicas sazonalmente variáveis.

Chapman (1975; 1998) descreveu a diapausa como uma adaptação que possibilita aos insetos sobreviverem em estado de dormência, em condições adversas. O controle desta adaptação é

realizado por hormônios, que regulam a morfogênese, retardando o desenvolvimento do inseto.

Silveira Neto *et al.* (1976) utilizaram o termo diapausa de uma maneira mais simples, englobando todos os casos de supressão de desenvolvimento que permitam aos insetos, mesmo em meio e condições desfavoráveis, atingirem o estágio adulto.

Segundo Parra (1979), a diapausa é um atraso no desenvolvimento dos insetos para facilitar a sobrevivência em períodos desfavoráveis, mas não é estritamente relacionada com condições climáticas adversas. É, portanto, um fenômeno adaptativo.

Beck (1980) definiu a diapausa como sendo um estado de supressão do desenvolvimento, determinado geneticamente, e a sua expressão pode ser controlada por fatores ambientais, constituindo-se em um importante mecanismo adaptativo de dormência, durante períodos de condições ambientais desfavoráveis, tais como temperaturas extremas, estiagem e falta de alimento adequado.

A diapausa é um estado neuro-hormonal dinâmico, intermediário, de baixa atividade metabólica, associado a fatores ambientais extremos, e uma alterada ou reduzida atividade comportamental. O fenômeno da diapausa ocorre durante um estágio de metamorfose determinado geneticamente, que é expressa no modo de desenvolvimento da espécie, normalmente em resposta a um número de estímulos que precedem uma condição desfavorável. Uma vez iniciada, a atividade metabólica é suprimida até que as condições favoráveis de desenvolvimento prevaleçam (TAUBER *ET AL.*, 1986).

De acordo com Nechols *et al.* (1987), embora a diapausa seja uma característica determinada geneticamente, algumas condições ambientais induzem as alterações endocrinológicas que controlam o seu início, manutenção e término. Entre os principais fatores ambientais estão as mudanças ocasionadas pelo fotoperíodo, temperatura e alimento, existindo, contudo, uma

⁵ WHEELER, W.M. A contribution to insect embryology. *Journ. of Morph.*, t. iv, p.68, 1893.

grande variabilidade inter e intraespecífica no tipo de resposta dos insetos a esses fatores.

O caráter de antecipação, a definição de um estágio de ocorrência, a periodicidade e a duração da diapausa, permitem distingui-la de um outro tipo de dormência, ou seja, a **quiescência**, definida por Mansingh (1971) como uma resposta do inseto a fatores ambientais de caráter temporário, aos quais os insetos não se antecipam com modificações fisiológicas e que normalmente são de curta duração, podendo ocorrer em qualquer fase de sua vida, envolvendo a paralisação de crescimento ou da reprodução.

De acordo com Parra (1979), a diapausa em regiões temperadas é relacionada com a sobrevivência durante o inverno, quando o crescimento normal não é possível; nos trópicos ela facilita a sobrevivência durante a estação seca, que se caracteriza pela escassez de umidade e alimento.

A **diapausa obrigatória**, segundo Beck (1980), é aquela sofrida por todos indivíduos de cada geração, como parte de sua vida, indiferente às condições de ambiente que prevaleçam durante o seu desenvolvimento, e é característica de insetos univoltinos. A **diapausa facultativa**, para o mesmo autor, é do tipo que pode ou não manifestar-se, dependendo das condições ambientais prevalentes durante um certo estágio crítico do desenvolvimento do inseto; ela é característica de espécies multivoltinas.

Os insetos em diapausa apresentam as seguintes características: ausência ou baixo nível de alimentação, diminuição do metabolismo, decréscimo dos níveis de enzimas oxidativas e do controle de água do corpo, aumento das reservas gordurosas e resistência à baixas temperaturas (PARRA, 1979), além disso, em alguns insetos a diapausa pode ser caracterizada

por mudanças na coloração do tegumento (SISSOKO, 1987).

Asahima (1969) observou nos tecidos de insetos em diapausa, uma mudança na estrutura do protoplasma, com a qual as células se modificam quanto ao tamanho, aumentam a permeabilidade à água, assim como a resistência à desidratação provocada por congelamento extracelular. Essa mudança pode permitir que uma substância de reserva como o glicerol, possa ser convertida em algumas substâncias de moléculas menores, aumentando a ação de proteção ao congelamento.

2.4.1. Principais fatores determinantes da diapausa

A incidência, manutenção e término da dormência, dependem da sensibilidade do inseto à qualidade espectral da luz, fotoperíodo, temperatura (constante ou variável), substâncias químicas naturais, idade materna, alimento, estação do ano e interação destes fatores (MANSINGH, 1971; SILVEIRA NETO *et al.*, 1976).

Será abordada apenas a influência da temperatura e do fotoperíodo sobre o armazenamento de ovos, em virtude de uma maior concentração de pesquisas nesta área, principalmente em condições de laboratório.

2.4.1.1. Temperatura

É um dos fatores mais importantes. Em insetos sensíveis às baixas temperaturas, a diapausa induzida por elas denomina-se **hibernação**. Já os insetos de clima tropical são sensíveis às altas temperaturas e a diapausa, neste caso, chama-se **estivação**. Como exemplo, pode-se citar o bicho-da-seda, *B. mori*, que coloca ovos normais quando as fêmeas se desenvolvem em temperaturas abaixo de 25 °C e ovos em diapausa quando estas desenvolvem-se em temperaturas superiores a 25 °C (SILVEIRA NETO *et al.*, 1976).

Curl & Burbutis (1977) submeteram ovos de *O. nubilalis*, parasitados por *T. nubilalis*, à

temperatura de 25,6 °C, por períodos que variaram de um a nove dias, e sob as condições de dia longo (nove horas de escotofase) e dia curto (doze horas de escotofase), antes de serem armazenados a 1,7 °C por 40 dias, na ausência de luz. Os autores observaram que a fase de ovo não conseguiu resistir às baixas temperaturas; apenas a fase de pupa, no seu estágio inicial, foi mais adequada para resistir às baixas temperaturas.

2.4.1.2. Fotoperíodo

Segundo Beck (1980), o fotoperíodo é um componente abiótico que pode afetar a fisiologia, biologia e comportamento de insetos. Apesar da diferença existente entre o fotoperiodismo natural e o artificial, o estudo da sua influência em condições artificiais é de suma importância para criações de laboratório, pois independe de regiões e variações climáticas para que se obtenha inseto de melhor qualidade e leva em consideração o papel relevante de muitas espécies de insetos em programas de controle biológico (PARRA *et al.*, 1983).

De acordo com Silveira Neto *et al.* (1976), os ovos de *B. mori* podem ser normais, quando as fêmeas são criadas sob fotoperíodo curto, ou de diapausa, quando são criadas sob fotoperíodo longo.

Macedo (2001), em uma sala climatizada, com temperatura constante de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 60 ± 10% e intensidade luminosa superior a 1.500 lux, avaliou a influência de diferentes fotofases (8, 10, 12, 14 e 16 horas) sobre a biologia das fases imaturas de *C. externa*. O experimento foi realizado em prateleiras divididas em seções, separadas lateralmente com isopor recoberto por cartolina preta e com luminosidade controlada. Em cada prateleira utilizou-se uma fotofase, onde foram mantidos os ovos

de *C. externa*, os quais foram individualizados em tubos de vidro de 2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura. Para cada fotofase avaliada destinaram-se 20 repetições, cada uma representada por cinco ovos do predador. Como resultados, o autor constatou que os embriões completaram normalmente o seu desenvolvimento e que as variações na fotofase não afetaram a duração da fase embrionária de *C. externa*, a qual foi de 5,0 dias para todas as condições estudadas. O mesmo foi verificado para a viabilidade dos ovos, que foi de 100%, independentemente do regime de luz.

3. Considerações Finais

Todas as técnicas expostas, para o armazenamento de ovos, são de fundamental importância para o sucesso de qualquer programa de controle biológico, e, poderão permitir um avanço dantesco nesta área, de forma a possibilitar, além do aumento de áreas a serem tratadas em liberações inundativas, o intercâmbio de ovos entre laboratórios que atuam na área.

4. Referências Bibliográficas

ADLER, V.E. Effects of low temperatures on the eggs of the angoumois grain moth, the Indian-meal moth, and the confused flour beetle. **Journal of Economic Entomology**, v.53, n.5, p.973-974, 1960.

ANDREWARTHA, H.G.; BIRCH, L.C. **The distribution and abundance of animals**. Chicago: The University of Chicago Press, 1954. 782p.

ASAHIMA, E. Prefreezing as a method enabling animals to survive freezing at an extremely low temperature. **Nature**, v.184, n.4961, p.1003-1004, 1959.

ASAHIMA, E. Intracellular freezing and frost resistance in egg-cells of the sea urchin. **Nature**, v.191, n.4795, p.1263-1265, 1961.

- ASAHIMA, E. Frost resistance in insects. In: BEAMENT, J.W.L.; TREHERNE, J.E.; WIGGLESWORTH, V.B. **Advances in insect physiology**. London: Academic Press, 1969, v.6, p.1-49.
- ASHAMO, M.O.; ODEYEMI, O.O. Effect of rearing temperature on the fecundity and development of *Euzopherodes vapidella* Mann (Lepidoptera: Pyralidae), a pest of stored yam. **Journal of Stored Products Research**, v.37, p.253-261, 2001.
- AUN, V. **Aspectos da biologia de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae)**. Piracicaba: ESALQ, 1986. 65p. (Dissertação - Mestrado em Ciências).
- BECK, S.D. **Insect photoperiodism**. 2.ed. London: Academic Press, 1980. 387p.
- BEGLYAROV, G.A.; GENNADIEV, V.; PONOMAREVA, I.A.; KHLISTOVSKII, E.D. Cryopreserved eggs of the grain moth. **Zashchita Rastenii**, v.31, n.5, 1981. Apud Review Applied Entomology, v.70, n.4, p.239, 1982. (Resumo).
- BICHÃO, M.H.C.F. **Biotechnologia de produção de *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) e sua aplicação em controle biológico**. Évora: Universidade de Évora, 1989. 145 p. (Relatório de estágio de licenciatura em Recursos Faunísticos e Ambiente).
- BOURNIER, J.P.; PEYRELONGUE, J.Y. Introduction élevage et lachers de *Trichogramma brasiliensis* Ashm. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) en vue de lutter contre *Heliothis armigera* Hbn. (Lepidoptera: Noctuidae) a Madagascar. **Cotton et Fibres Tropicales**, v.28, n.2, p.231-237, 1973.
- BRANSON, T.F. Optimum temperature for long-term storage of eggs of *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.24, n.2, p.199-200, 1978.
- CAMMELL, M.E.; KNIGHT, J.D. Effects of climatic change on the population dynamics of crop pests. In: BEGON, M.; FITTER, A.H.; MACFADYEN, A. (eds). **Advances in ecological research**. London: Academic Press, 1992.
- CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function**. 4.ed. New York: American Elsevier, 1975. 819p.
- CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function**. 4.ed. Cambridge: University Press, 1998. 770p.
- CHENG-LUNG, W.; HUI-XIAN, W.; HONG, L.; CHENG-MING, G.; ZHENG-TAI, J.; GI-MING, C.; DE-JUN, C. Studies on technique of long-term keeping host eggs for *Trichogramma* under ultralow temperature. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *TRICHOGRAMMA* AND OTHER PARASITES, 2., Guanzhou, 1986. Paris: INRA, 1988. p.399-401. (Les colloques de l'INRA, 43).
- CHERNAKI, A.M.; ALMEIDA, L.M. Exigências térmicas, período de desenvolvimento e de sobrevivência de imaturos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.3, p.365-368, 2001.

- CHIANG, H.C.; SISSON, V. Temperature relationship of the development of northern corn rootworm eggs. **Journal of Economic Entomology**, v.61, n.5, p.1406-1410, 1968.
- COX, P.D.; CRAWFORD, L.A.; GJESTRUD, G.; BELL, C.H.; BOWLEY, C.R. The influence of temperature and humidity on the life-cycle of *Corcyra cephalonica* (Stainton) (Lepidoptera: Pyralidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.71, p.171-181, 1981.
- CURL, G.D.; BURBUTIS, P.P. The mode of overwintering of *Trichogramma nubilalis* Ertle and Davis. **Environmental Entomology**, v.6, n.5, p.629-632, 1977.
- DAUMAL, J.; BOINEL, H. Trophic quality of eggs of *Ephestia kuehniella* Zell. After freezing treatment for the rearing of *Trichogramma* species. **Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft**, v.67, n.3-4, p.373-383, 1994.
- DAVISON, J. On the relationships between temperature and rate of development of insect at constant temperature. **Journal of Animal Ecology**, v.13, p.26-38, 1944.
- DOUTT, R.L. The biology of parasitic Hymenoptera. **Annual Review Entomological**, v.1, p.160-183, 1959.
- DROOZ, A.T. Subfreezing eggs of *Lambdina pellucidaria* (Lepidoptera: Geometridae) alters status as factitious host for *Ooencyrtus ennomophagus* (Hymenoptera: Encyrtidae). **The Canadian Entomologist**, v.113, n.8, p.775-776, 1981.
- DROOZ, A.T.; SOLOMON, J.D. Rearing the egg parasite *Ooencyrtus ennomophagus* (Hymenoptera: Encyrtidae) on eggs of *Closteria inclusa* (Lepidoptera: Notodontidae) kept below freezing. **The Canadian Entomologist**, v.112, n.7, p.739-740, 1980.
- FISHER, J.R.; JACKSON, J.J.; LEW, A.C. Temperature and diapause development in the egg of *Diabrotica barberi* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Environmental Entomology**, v.23, n.2, p.166-171, 1994.
- FLANDERS, S.F. The effect of cold storage on the reproduction of parasitic Hymenoptera. **Journal of Economic Entomology**, v.31, n.5, p.633-634, 1938.
- FRIEDLER, S.; GIUDICE, L.C.; LAMB, E.J. Cryopreservation of embryos and ova. **Fertility and Sterility**, v.49, n.5, p.743-763, 1988.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D. **Manual de Entomologia Agrícola**. 2.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1988. 649p.
- GRECO, C.F.; STILINOVIC, D. Parasitization performance of *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) reared on eggs of *Sitotroga cerealella* Olivier (Lepidoptera: Gelechiidae), stored at freezing and subfreezing conditions. **Journal of Applied Entomology**, v.122, n.6, p.311-314, 1998.
- HEINRICHS, E.A.; MATHENY, E.L. Hatching of sod webworm eggs in relation to low temperature.

- Journal of Economic Entomology**, v.62, n.6, p.1344-1347, 1969.
- HUAI-YI, M. Studies on long term storage of hosts for propagating *Trichogramma*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *TRICHOGRAMMA* AND OTHER PARASITES, 2., Guanzhou, 1986. Paris: INRA, 1988. p.368-371. (Les colloques de l'INRA, 43).
- HUNT, G.J.; TABACHNICK, W.J. Cold storage effects on egg hatch in laboratory-reared *Culicoides variipennis sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.11, n.3, p.335-338, 1995.
- JACKSON, J.J. *Diabrotica*. In: SINGH, P.; MOORE, R.F. (eds). **Handbook of insect rearing**. Amstterdan: Elsevier Science, 1985. p.237-254.
- JACOB, T.A.; COX, P.D. The influence of temperature and humidity on the life-cycle on *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Products Research**, v.13, p.107-118, 1977.
- JENSEN, T.; KAISER, P.E.; BARNARD, D.R. Adaptation to intermittently flooded swamps by *Anopheles quadrimaculatus* species C1 (Diptera: Culicidae). **Environmental Entomology**, v.23, n.5, p.1150-1154, 1994.
- KAMBLE, C.K. Effect of cold storage on hatchability of cross breed and acid treated bivoltine eggs of silkworm, *Bombyx mori* L. **Uttar Pradesh Journal of Zoology**, v.18, n.1, p.37-43, 1998.
- KELLER, M.A. Overwintering by *Trichogramma exiguum* in North Carolina. **Environmental Entomology**, v.15, n.3, p.659-661, 1986.
- LEVINE, E.; OLOUMI-SADEGHI, H.; ELLIS, C.R. Thermal requeriments, hatching patterns, and prolonged diapause in western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) eggs. **Journal of Economic Entomology**, v.85, n.6, p.2425-2432, 1992.
- MACEDO, L.P.M. **Desenvolvimento, reprodução e comportamento de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) em diferentes condições ambientais**. Lavras: UFLA, 2001. 78p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia).
- MADAN, Y.P.; CHAUDHARY, J.P. Effect of low temperature on the hatchability and efficiency of the larvae of *Epiricania melanoleuca* Fletcher in parasitizing *Pyrilla perplusia* Walker. **Indian Sugar**, v.43, n.7, p.481-486, 1993.
- MANSINGH, A. Physiological classification of dormancies in insects. **The Canadian Entomologist**, v.103, p.983-1009, 1971.
- MILANEZ, J.M. **Técnicas de criação e bioecologia de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae)**. Piracicaba: ESALQ, 1995. 102p. (Tese - Doutorado em Ciências).
- MORRISON, R.K. Methods for the long term storage and utilization of eggs of *Sitotroga*

- cerealella* (Olivier) for production of *Trichogramma pretiosum* Riley. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TRICHOGRAMMA AND OTHER PARASITES, 2., Guanzhou, 1986. Paris: INRA, 1988. p.373-377. (Les colloques de l'INRA, 43).
- NAVA, D.E. **Bioecologia de *Cerotoma arcuatus* Olivier, 1791 (Coleoptera: Chrysomelidae) e comprovação, em campo, do modelo de exigências térmicas obtido em laboratório.** Piracicaba: ESALQ, 2000. 72p. (Dissertação - Mestrado em Ciências).
- NECHOLS, J.R.; TAUBER, M.J.; TAUBER, C.A. Geographical variability in ecophysiological traits controlling dormancy in *Chrysopa oculata* (Neuroptera: Chrysopidae). **Journal of Insect Physiology**, v.33, n.9, p.627-633, 1987.
- PALMER, D.F.; WINDELS, M.B.; CHIANG, H.C. Artificial infestation of corn with western corn rootworm eggs in agar-water. **Journal of Economic Entomology**, v.70, n.3, p.277-278, 1977.
- PARRA, J.R.P. **Biologia dos insetos.** Piracicaba: ESALQ, 1979. 383p.
- PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação de *Anagasta kuehniella*, hospedeiro alternativo para produção de *Trichogramma*.** In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (eds). *Trichogramma* e o controle biológico aplicado. Piracicaba: FEALQ, 1997. 324p.
- PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico.** Piracicaba: FEALQ, 1992. 161p.
- PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico.** 6.ed. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 2001. 134p.
- PARRA, J.R.P.; MELO, A.B.P.; MAGALHÃES, B.P.; SILVEIRA NETO, S.; BOTELHO, P.S.M. Efeito do fotoperíodo no ciclo biológico de *Diatraea saccharalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.18, n.5, p.463-472, 1983.
- SALMERON, E.; WIENDL, F.M.; WALDER, J.M.M. Influência da temperatura na manutenção de ovos de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) para programas de criação massal. **Revista da Agricultura**, v.61, n.1, p.16-25, 1986.
- SALT, R.W. Role of glycerol in producing abnormally low supercooling and freezing points in an insect, *Bracon cephi* (Gahan). **Nature**, v.181, n.4618, p. 1281, 1958.
- SCHAAFSMA, A.W.; WHITFIELD, G.H.; ELLIS, C.R. A temperature dependent model of egg development of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae). **The Canadian Entomologist**, v.6, n.123, p.1184-1197, 1991.
- SCHMIDT, F.G.V. **Armazenamento, em baixas temperaturas, de ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) e de *Corcyra cephalonica* (Stainton, 1865) visando a produção de *Trichogramma* spp.** Piracicaba: ESALQ, 1991. 108p. (Dissertação - Mestrado em Ciências).

- SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O.; BARBIN, D.; VILANOVA, N.A. **Manual de ecologia dos insetos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976. 419p.
- SISSOKO, F. **Influence de la photopériode sur la fécondité et la diapause chez *Chrysoperla mediterranea* (Hölzel, 1972) (Neuroptera: Chrysopidae)**. Toulouse: Université Paul Sabatier, 1987. 71p. (These - Doctorat de 3^{ème} Cycle le Sciences).
- SRINIVASABABU, G.K.; ASTAGI, S.G.; BASAVARAJU, N.; THANGAVELU, K. Improvement of hatching of cold stored bivoltine eggs through hot water treatment. **Indian Journal of Sericulture**, v.35, n.1, p.76, 1996.
- STEIN, C.P. **Técnicas de criação de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) para estudos com *Trichogramma***. Piracicaba: ESALQ, 1985. 89p. (Dissertação - Mestrado em Ciências).
- STEIN, C.P.; PARRA, J.R.P. Uso da radiação ultravioleta para inviabilizar ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) visando estudos com *Trichogramma* spp. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.16, n.1, p.229-233, 1987.
- TAKEMURA, Y.; KANDA, T.; HORIE, Y. Artificial insemination using cryopreserved sperm in the silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Insect Physiology**, v.46, p.491-497, 2000.
- TAUBER, C.A.; TAUBER, M.J. Diversification and secondary intergradation of two *Chrysopa carnea* strains (Neuroptera: Chrysopidae). **The Canadian Entomologist**, v.105, n.9, p.1153-1167, 1973.
- TAUBER, M.J.; TAUBER, C.A. A environmental control of univoltinism and its evolution in an insect species. **Canadian Journal of Zoology**, v.54, n.2, p.260-265, 1976.
- TAUBER, M.J.; TAUBER, C.A.; MASAKI, S. **Seasonal adaptations of insects**. New York: Oxford University Press, 1986. 411p.
- VOEGELÉ, J.; DAUMAL, J.; BRUN, P.; ONILLON, J. Action du traitement au froid et aux ultraviolets de l'oeuf d' *Ephestia kuehniella* et *Trichogramma brasiliensis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Entomophaga**, v.19, n.3, p.341-352, 1974.
- WILDE, G.E. Temperature effect on development of western corn rootworm. **Journal of Kansas Entomology Society**, v.44, p.185-187, 1971.
- WYSOKI, M.; RENNEH, S. Introduction into Israel of *Trichogramma platneri* Nagarkatti, and egg parasite of Lepidoptera. **Phytoparasitica**, v.13, n.2, p.139-140, 1985.
- ZHENWEI, H.; QIYAO, X. Studies on frozen storage of eggs of rice moth and oak silkworm. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TRICHOGRAMMA AND OTHER PARASITES, 2., Guanzhou, 1986. Paris: INRA, 1988. p.325-338. (Les colloques de l'INRA, 43).