

Desempenho reprodutivo de *Nasonia vitripennis* Walker (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas criopreservadas de *Chrysomya megacephala* Fabricius (Diptera: Calliphoridae): avaliação preliminar

Reproductive performance of *Nasonia vitripennis* Walker (Hymenoptera: Pteromalidae) on *Chrysomya megacephala* Fabricius (Diptera: Calliphoridae) cryopreserved pupae: preliminary evaluation

Eliane Maria Vieira Milward-de-Azevedo¹ Ivan Serafin² Eliane Mattos Piranda³
Claudia Cristina Gulias-Gomes⁴

RESUMO

Avaliou-se o desempenho reprodutivo de *Nasonia vitripennis* Walker (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas de *Chrysomya megacephala* Fabricius (Diptera: Calliphoridae) previamente armazenadas a -20°C de temperatura, durante 77 dias, com e sem passagem prévia em nitrogênio líquido (NL) por um, três e 15 minutos. O grupo controle foi caracterizado por pupas hospedeiras frescas. Os muscóides foram expostos aos parasitóides durante 72 horas. Utilizou-se a relação de uma pupa muscóide por fêmea parasitóide. A amostra de pupas frescas permitiu a emergência de 15 parasitóides/pupa, em média, enquanto 10 parasitóides/pupa emergiram dos espécimens prévia e diretamente armazenados em freezer (-20°C). Observou-se um acentuado decréscimo do desempenho reprodutivo dos microhimenópteros que exploraram os substratos previamente submetidos ao NL durante um, três e 15 minutos (\bar{X} : 6,1; 5,5 e 5,7, respectivamente). A dissecação das pupas hospedeiras revelou um expressivo número de pteromalídeos imaturos, nas amostras que foram expostas ao NL, e de adultos faratos, em todos os tratamentos.

Palavras-chave: *Chrysomya megacephala*, controle biológico aplicado, criobiologia, criopreservação, *Nasonia vitripennis*.

ABSTRACT

The reproductive performance of *Nasonia vitripennis* Walker (Hymenoptera: Pteromalidae) was evaluated on pupae of *Chrysomya megacephala* Fabricius (Diptera: Calliphoridae) kept at -20°C, during 77 days, with and no previous passage for liquid nitrogen (NL) by one,

three and 15 minutes. Control groups were characterized for fresh pupae hosts. There was one pupa for each parasitoid. The sample of fresh pupae exhibited average of 15 emergent parasitoids / pupa while pupae stored directly at freezer (-20°C) presented an average of 10 emergent parasitoids / pupa. In the samples exposed at one, three and 15 minutes in NL, accentuated decrease was observed on emergent hymenopterans reproductive performance (\bar{X} : 6.1; 5.5 and 5.7 respectively). The dissection of pupae revealed a large number of immature pteromalid in the groups with liquid nitrogen passage and farate adults in all the groups.

Key words: Biological control, *Chrysomya megacephala*, cold storage, cryopreservation, *Nasonia vitripennis*.

INTRODUÇÃO

A utilização de microhimenópteros pteromalídeos, inimigos naturais de muscóides de interesse médico-veterinário e sanitário, é considerada uma alternativa eficiente e ecológica no manejo de vetores (PICKENS & MILLER, 1978; PETERSEN & PAWSON, 1988; CARDOSO & MILWARD-DE-AZEVEDO, 1996). Durante a implantação de programas de controle, a criação de parasitóides em larga escala caracteriza-se como uma etapa fundamental e, enquanto dietas artificiais não forem comercialmente disponibilizadas, será exigida a obtenção de um expressivo número de hospedeiros preferenciais ou

¹Médico Veterinário, Professor Adjunto aposentado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Endereço para correspondência: Rua dos Ipês, 54 Gleba XIII Comary, 25958-770, Teresópolis, RJ, Brasil. E-mail: emilward@ufrj.br. Autor para correspondência.

²Departamento de Parasitologia Animal, UFRRJ

³Bolsista de Iniciação Científica, CNPq, UFRRJ

⁴Médico Veterinário, Doutorando do Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Parasitologia Veterinária, UFRRJ, Bolsista Capes.

alternativos num reduzido intervalo de tempo. O armazenamento de hospedeiros em temperaturas baixas e/ou ultrabaixas tem viabilizado e racionalizado a criação e utilização de biocontroladores em tempo oportuno (PICKENS & MILLER, 1978; PETERSEN & PAWSON, 1988). A criopreservação inclui, também, o benefício de inviabilizar o hospedeiro, eliminando o risco da evasão de vetores biológicos potencialmente viáveis, durante sua manipulação (PICKENS & MILLER, 1978; PETERSEN, 1986; MILWARD-DE-AZEVEDO & CARDOSO, 1996 e 1998). Entretanto, as modificações morfofisiológicas, físicas e bioquímicas determinadas pelo processo de congelamento reduzem o desempenho reprodutivo de algumas espécies de pteromalídeos (ROTH et al., 1991; MILWARD-DE-AZEVEDO & CARDOSO, 1996).

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 ultrarápido induz à formação de cristais de gelo menores, o que minimiza a formação de injúrias. Hipoteticamente, a exposição de pupas muscoides em nitrogênio líquido (NL) seria capaz de proporcionar uma velocidade de congelamento adequada ao substrato que, posteriormente, seria disponibilizado às vespas matrizes; no entanto, a sua utilização potencial como local de estoque, em produções em larga escala, elevaria os custos operacionais. Ponderando sobre esta limitação, decidiu-se testar a performance reprodutiva de *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) previamente submetidas ao congelamento em NL, durante reduzidos intervalos de tempo, antes do armazenamento em freezer regulado a -20°C .

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e métodos empregados durante o estabelecimento e a manutenção dos estoques e o manuseio das amostras experimentais de *C. megacephala* e de *N. vitripennis* foram descritos por SANTOS et al. (1998) e CARDOSO & MILWARD-DE-AZEVEDO (1996), respectivamente. Visando a manutenção ininterrupta do estoque de *N. vitripennis*, durante o ano, pupas muscoides previamente armazenadas em freezer (-20°C) também foram utilizadas como substrato de criação do parasitóide.

A massa corporal média das pupas hospedeiras com cerca de 24 horas de idade, e

pertencentes à 6^a-8^a geração, foi registrada em lotes (9 pupas/ lote). Os valores obtidos, para esta variável, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey-Kramer, ao nível de 5% de significância.

Logo após o registro da massa corporal, as amostras foram acondicionadas em recipientes (criogenic vials®) com capacidade de 5 ml, expostas ao nitrogênio líquido (NL) - fase líquida - durante 1, 3 e 15 minutos e, sucessivamente, transferidas para um freezer regulado a -20°C , onde foram armazenadas por 77 dias. Paralelamente, lotes de pupas hospedeiras foram diretamente transferidos para o freezer sem prévia exposição ao NL. O tratamento controle foi constituído por pupas muscoides não congeladas (frescas), oriundas do mesmo estoque.

A exposição sincrônica de pupas frescas e pupas previamente criopreservadas ao parasitoidismo foi realizada, sob condições de laboratório, durante 72 horas, assumindo-se a relação de uma pupa: fêmea parasitóide, disponibilizadas em recipientes de vidro transparente com 600ml de capacidade. Utilizaram-se 9 muscoides por lote e 3 lotes por tratamento. As fêmeas matrizes de *N. vitripennis*, com até 24 horas de idade, pertenciam a 36^a geração. O material foi mantido em condições de laboratório. A emergência de microhimenópteros foi monitorada até 20 dias após a emergência do primeiro espécimen. As observações foram diárias. Após este período, os pupários muscoides foram dissecados e quantificou-se o número total de parasitóides imaturos e/ou adultos remanescentes.

Durante o período experimental, a temperatura e a umidade relativa do ar no laboratório oscilaram entre 19 a 32 $^{\circ}\text{C}$ e 32 a 82%, respectivamente. Não houve controle da luz. Os valores relativos às proles parasitóides foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Dunnett de Comparação Múltipla, ao nível de 5% de significância. Testes preliminares indicaram que os valores relativos à contagem dos insetos não exigiam transformação para o emprego das análises.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A emergência dos microhimenópteros ocorreu no intervalo de 12 a 15 dias após o início da exposição das pupas viáveis e inviabilizadas de *C. megacephala* ao parasitoidismo. O número expressivo de fêmeas de *N. vitripennis* observado nas progênes oriundas de pupas muscoides previamente submetidas a baixas temperaturas (Tabela 1) foi constatado em outros experimentos (KLUNKER & FABRITIUS, 1992;

Tabela 1 - Desempenho reprodutivo de fêmeas de *Nasonia vitripennis* expostas, em laboratório, a pupas de *Chrysomya megacephala* frescas e previamente armazenadas em baixa e ultrabaixas temperaturas, sob condições experimentais

Condição de armazenamento	Parasitóides adultos emergentes/ pupário hospedeiro ¹		Parasitóides imaturos e adultos faratos/ pupário hospedeiro dissecado ²		Adultos faratos/ pupário hospedeiro (%)	Pupários hospedeiros com parasitóides pré-emergentes (%)	Razão sexual ³	Massa corporal das pupas hospedeiras (mg) ^{4,5}	
	$\bar{X} \pm s \bar{x}$	Intervalo de Variação	$\bar{X} \pm s \bar{x}$	Intervalo de Variação				$\bar{X} \pm s \bar{x}$	Intervalo de Variação
Laboratório (=pupas frescas)	15,3± 2,6 a	11,7-20,4	13,6±1,7	3-25	99,3	92,6	0,37	55,88± 0,36 a	54,70-56,90
-20 °C	10,0± 1,8 ab	6,7-13,0	9,9±1,0	3-23	92,9	77,8	0,73	56,76± 1,17 a	54,50-60,80
NL 1 minuto ⁶	6,1± 3,1 bc	1,8-12,2	10,4± 1,3	2-19	80,8	66,7	0,63	56,40± 0,77 a	54,10-58,90
NL 3 minutos ⁶	5,5± 0,7 bc	4,4-6,9	9,4± 0,9	4-18	84,0	63,0	0,76	55,04± 1,04 a	52,10-57,70
NL 15 minutos ⁶	5,7± 0,9 bc	4,0-7,1	10,3± 2,4	2-17	72,8	44,4	0,77	54,68± 0,81 a	52,30-56,60

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Dunnett de Comparação Múltipla ao nível de 5% de significância. Os parâmetros (médias e intervalos de variação/ repetições) foram contabilizados a partir do número total de hospedeiros amostrados (9 pupas hospedeiras/ repetição x 3/ tratamento).

² (ANOVA F=1,146; P= 0,3898, considerado não significante)

³ Razão sexual = fêmeas / fêmeas + machos

⁴ Massa corporal registrada em lotes, 24h após a pupariação e imediatamente anterior ao armazenamento em baixa e ultra-baixas temperaturas

⁵ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey-Kramer ao nível de 5% de significância.

⁶ Espécimens alocados em nitrogênio líquido e posteriormente transferidos para o freezer

MILWARD-DE-AZEVEDO & CARDOSO, 1996). Segundo KLUNKER & FABRITIUS (1992), a otimização da produção de parasitóides em larga escala, a partir de pupas crioconservadas, compensa a desproporção sexual, pois, espécie gregária, as fêmeas virgens de *N. vitripennis* são arrenótocas.

Pupas muscóides frescas permitiram, em média, a emergência de 15 parasitóides por pupário (Tabela 1), valor inferior ao registrado em experimentos anteriores (CARDOSO & MILWARD-DE-AZEVEDO, 1995). Entretanto, nesta amostra, os pupários distinguiram um número expressivo de pteromalídeos faratos, durante a dissecação (Tabela 1), sugerindo que a redução da taxa de emergência de *N. vitripennis*, durante o período de monitoramento, foi influenciada pelas condições climáticas (aumento da nebulosidade ambiental). As condições climáticas atuantes durante o período experimental também podem ter contribuído para a diminuição da velocidade de desenvolvimento dos espécimens. Por outro lado, a interrupção do desenvolvimento pós-embrionário, numa fração mais ou menos acentuada, em proles de *N. vitripennis*, é amplamente destacada pela literatura (vide revisão MILWARD-DE-AZEVEDO & CARDOSO, 1998). Admite-se ainda que a exposição ao parasitoidismo durante o período de 72 horas, utilizando-se a relação de 1 fêmea parasitóide : 1 pupário hospedeiro, pode ter provocado a exploração intensiva dos hospedeiros, acarretando um superparasitoidismo e, conseqüentemente, incrementando a taxa de

mortalidade de imaturos. A hipótese de que a adaptação de estoques de insetos às condições de cativeiro potencializaria a diminuição da capacidade reprodutiva das imagos poderia ser introduzida nesta discussão (BARTLETT, 1985). Entretanto, de acordo com investigações prévias, estoques de *N. vitripennis* podem manter um desempenho uniforme por cerca de 60 gerações (MOREIRA et al., 1996).

Nos tratamentos submetidos ao NL por 1, 3 e 15 minutos, o número de parasitóides imaturos e adultos faratos encontrados no interior dos pupários foi superior ao número de adultos que emergiram durante o intervalo de observação preestabelecido (63,0; 63,1 e 64,4% da progênie total, respectivamente); 19,2, 16,0 e 27,2% de espécimens, nestas amostras, foram caracterizados como imaturos. Estes percentuais sugerem que a qualidade nutricional do substrato como fonte de alimentação é insatisfatória.

As pupas muscóides alocadas diretamente em freezer viabilizaram a emergência de um maior número de microhimenópteros. O número médio de imaturos no interior destes pupários foi, inclusive, menos expressivo, sugerindo-o, entre os substratos crioconservados, como o mais favorável ao desenvolvimento da espécie (Tabela 1). Porém, a dispersão dos valores obtidos em torno da média apresentou-se elevada (Tabela 1); assim, o contraste entre este tratamento e os alocados em NL não revelou diferenças significativas ($q < 2.890$; $P > 0,05$).

A dissecação de 7,4; 22,2; 33,3; 37,0 e 55,5 % de pupas frescas e previamente submetidas à baixa e ultrabaixas temperaturas (NL: 1, 3 e 15 minutos), respectivamente, não caracterizou a presença de parasitóides imaturos e/ou adultos faratos. Não ocorreu emergência de muscóides no lote de pupas viáveis expostas ao parasitoidismo.

MAZUR & CHU (1972), ao investigarem os efeitos do processo de congelamento em células de macro-organismos, observaram que a transferência do material de um ambiente a -196°C para -75°C e, posteriormente, para 5°C , não afetou a viabilidade celular. No entanto, destacaram que, na passagem intermediária pela temperatura de -40°C , as células sofreram inativação mais rápida do que aquelas armazenadas diretamente a -40°C . Os autores ponderaram sobre o processo de recristalização da água no interior da célula, promovendo maiores injúrias, quando o processo de congelamento rápido é seguido de descongelamento lento. É possível que a estocagem das pupas na temperatura de -20°C após sua passagem pelo NL, no presente bioensaio, tenha funcionado como um processo de descongelamento lento.

A massa corporal das pupas hospedeiras com 24 horas de idade não diferiu entre os grupos amostrados (Tabela 1). Conseqüentemente, não influenciou os resultados.

RIVERS & DENLINGER (1995) sugeriram que a injeção do veneno de *N. vitripennis* no hospedeiro *Sarcophaga bullata* Parker (Diptera: Sarcophagidae) altera o metabolismo lipídico da pupa. Afirmaram ainda que a ausência do sincronismo entre as modificações metabólicas que se seguem ao envenenamento e as fases de desenvolvimento das larvas parasitóides reduzem o sucesso final do parasitoidismo. As pupas expostas a baixas e ultrabaixas temperaturas são inviabilizadas e, conseqüentemente, o seu metabolismo é interrompido. Assim, como foi comentado anteriormente, a redução da taxa reprodutiva de fêmeas parasitóides criadas em pupas congeladas pode estar, fundamentalmente, relacionada à indisponibilidade parcial de alimento adequado ao desenvolvimento de seus imaturos: a oferta qualitativa da dieta deve ser diretamente dependente do grau de conservação das pupas.

Certamente não existe uma causa isolada relacionada à adequação ainda insatisfatória do uso de pupas muscóides crioconservadas como substrato de criação de *N. vitripennis*, e sim um complexo de fatores interferentes. A perda do odor natural e a desidratação das pupas hospedeiras, determinadas pelo congelamento, por exemplo, não podem ser

propriedades subestimadas. A inclusão de crioprotetores, durante o armazenamento de espécimens hospedeiros em baixas temperaturas e que demanda maior complexidade metodológica é, atualmente, matéria de estudo (GULIAS-GOMES, 2000). Os resultados aqui registrados, portanto, não são, em absoluto, conclusivos. É inquestionável que a adequação de uma metodologia eficaz, como expressaram KLUNKER & FABRITIUS (1992), permitiria criações em larga escala mais salubres e homogêneas, o que garantiria, inclusive, a produção de agentes controladores durante todo o ano, atendendo às exigências populacionais de vetores residentes nas regiões tropicais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTLETT, A.C. Guidelines for genetic diversity in laboratory colony establishment and maintenance. In: SINGH, P.; MOORE, R.F. (eds). **Handbook of insect rearing**. Amsterdam : Elsevier, 1985. V.1, Cap.2, p.7-17.

CARDOSO, D.; MILWARD-DE-AZEVEDO, E.M.V. Influência da densidade de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) sobre a capacidade reprodutiva de fêmeas nuparas de *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera, Pteromalidae). **Revta Bras Ent**, v.39, n.4, p. 779-786, 1995.

CARDOSO, D.; MILWARD-DE-AZEVEDO, E.M.V. Aspectos da biologia de *Nasonia vitripennis* (Walker), (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *C. albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), sob condições de laboratório. **Revta Bras Ent**, v.40, n.2, p.143-146, 1996.

GULIAS-GOMES, C.C. **Pupas crioconservadas de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) como substrato de criação de *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae): emprego de crioprotetores, análise eletroforética e registro fotográfico**. 2000. 80f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária/ Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

KLUNKER, R.; FABRITIUS, K. Ergebnisse und erfahrungen mit der stammhaltung und massenzucht einiger puariumparasitoide von fliegen auf kältekonservierten wirtspuparien. **Mitt Dtsch Ges Allg Angew Ent**, v.8, p.287-294, 1992.

MAZUR, P.S.P.; CHU, E.H.Y. A two factor hypothesis of freezing injury. **Exp Cell Res**, v.71, p.345-355, 1972.

MILWARD-DE-AZEVEDO, E.M.V.; CARDOSO, D. Criação de *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas congeladas de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae): Testes preliminares. **Arq Biol Tecnol**, v.39, n.1, p.89-98, 1996.

MILWARD-DE-AZEVEDO, E.M.V.; CARDOSO, D. *Nasonia vitripennis*: um microhimenóptero controlador de moscas

- varejeiras. In: **Explorando os animais que nos exploram: caleidoscópio de idéias e fatos/ Tópicos**. Departamento de Parasitologia Animal, IB-UFRRJ, 1998. CD-ROM. Capturado em agosto 2002. Online. Disponível na Internet: <http://www.ufrj.br/posgrad/proin/cd-proin.htm>
- MOREIRA, O I.; MARTINS, C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, E.M.V. Avaliação preliminar do desempenho reprodutivo de *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) em função do número de gerações. **Arq Biol Tecnol**, v.39, n.3, p.491-495, 1996.
- PETERSEN, J.J. Augmentation of early season releases of filth fly (Diptera: Muscidae) parasita (Hymenoptera: Pteromalidae) with freeze-killed hosts. **Environ Entomol**, v.15, p.590-593, 1986.
- PETERSEN, J.J.; PAWSON, B.M. Early season dispersal of *Muscidifurax zaraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae) utilizing freeze-killed housefly pupae as hosts. **Med Vet Entomol**, v.2, p.137-140, 1988.
- PICKENS, L.G.; MILLER, R.W. Using frozen host pupae to increase the efficiency of a parasite-release program. **Fla Entomol**, v.61, n.3, p.153-158, 1978.
- RIVERS, D.B.; DENLINGER, D.L. Fecundity and development of the ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* are dependent on host quality. **Entomol Exp Appl**, v.76, p.15-24, 1995.
- ROTH, J.P.; FINCHER, G.T.; SUMMERLIN, J.W. Suitability of irradiated or freeze-killed horn fly (Diptera: Muscidae) pupae as hosts for hymenopteran parasitoids. **J Econ Entomol**, v.84, n.1, p.94-98, 1991.
- SANTOS, M.B., dos; MARTINS, C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, E.M.V. Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) criada em dieta a base de carne equina previamente exposta por diferentes períodos, a condições controladas. **Revta Bras Ent**, v.41, n.2-4, p.129-132, 1998.