



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**DESENVOLVIMENTO DE *Podisus nigrispinus* (DALLAS, 1851)
(HETEROPTERA: PENTATOMIDAE) EM DIFERENTES
TEMPERATURAS E USO DE SOLUÇÕES QUÍMICAS PARA
PERMEABILIZAÇÃO DE OVOS**

ÍTALA TAINY BARRETO FRANCISCO DOS SANTOS

2017



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

ÍTALA TAINY BARRETO FRANCISCO DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE *Podisus nigrispinus* (DALLAS, 1851) (HETEROPTERA:
PENTATOMIDAE) EM DIFERENTES TEMPERATURAS E USO DE SOLUÇÕES
QUÍMICAS PARA PERMEABILIZAÇÃO DE OVOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Orientador
Prof. Dr. Genésio Tâmara Ribeiro

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2017

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237d Santos, Ítala Tainy Barreto Francisco dos.
Desenvolvimento de *Podisus nigrispinus* (DALLAS, 1851) (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE) em diferentes temperaturas e uso de soluções químicas para permeabilização de ovos / Ítala Tainy Barreto Francisco dos Santos; orientador Genésio Tâmara Ribeiro. – São Cristóvão, 2017.
46 f.: il.

Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, 2017.

1. Percevejo (Inseto) – Controle biológico. I. Ribeiro, Genésio Tâmara, orient. II. Título.

CDU 595.754

ÍTALA TAINY BARRETO FRANCISCO DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE *Podisus nigrispinus* (DALLAS, 1851) (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE) EM DIFERENTES TEMPERATURAS E USO DE SOLUÇÕES QUÍMICAS PARA PERMEABILIZAÇÃO DE OVOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

APROVADA em 05 de Julho de 2017.

Dra. Eliana Maria dos Passos
Embrapa Tabuleiros Costeiros

Prof. Dra. Rozimar de Campos Pereira
UFRRB

Prof. Dr. Genésio Tâmara Ribeiro
UFS
(Orientador)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

*Aos meus pais Everaldo Francisco e Adriana
Barreto, aos meus irmãos Elder Cleiton e
Áurio Henrique, ao meu esposo Alex Victor e
aos demais familiares*
Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, Onipotente, Onipresente e Onisciente.

À minha família por todo amor incondicional: Aos meus pais, Adriana Barreto e Everaldo Francisco, pela dedicação em me orientar desde a minha infância. Aos meus irmãos, Elder Cleito e Áurio Henrique, pelo laço de amor fraternal. Ao meu Esposo, Alex Victor, pelo amor, companheirismo amizade, apoio e por fazer parte da minha vida.

À Universidade Federal de Sergipe e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela oportunidade de realização do curso.

Ao Prof. Dr. Genésio Tâmara pela orientação e amizade.

Ao Dr. Júlio Poderoso pela co-orientação e amizade.

À Dra. Fátima pelas sugestões e amizade.

À Heloísa Pinheiro, Edson José e Vancleber pelo apoio na execução desta pesquisa, companheirismo e amizade.

À equipe do laboratório de Entomologia Florestal pelo acolhimento, apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. João Basílio Mesquita pela amizade e por ter cedido o laboratório de Patologia Florestal para realizar algumas etapas desta pesquisa.

A Felipe pelo suporte técnico.

Ao Prof. Dr. Eduardo Serrão e sua equipe pela oportunidade de aprendizado e contribuições neste trabalho.

Por fim, a todos que deixei de mencionar o nome, mas que sou enormemente agradecida pelo apoio oferecido para que aqui chegasse.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
4. CAPÍTULO 1: DIFERENTES TEMPERATURAS NO DESENVOLVIMENTO DE <i>Podisus nigrispinus</i> (DALLAS, 1851) (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE): IMPLICAÇÕES NA CRIAÇÃO MASSAL.....	13
Resumo.....	13
Abstract	14
4.1. Introdução	14
4.2. Material e Métodos	15
4.3. Resultados	16
4.4. Discussão	19
4.5. Conclusões	21
4.6. Referências Bibliográficas	21
5. CAPÍTULO 2: DECORIONIZAÇÃO E PERMEABILIZAÇÃO DE OVOS DE <i>Podisus nigrispinus</i> (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE): FATORES LIMITANTES PARA A CRIOPRESERVAÇÃO.....	24
Resumo.....	24
Abstract	25
5.1. Introdução	25
5.2. Material e Métodos	26
5.3. Resultados	27
5.4. Discussão	29
5.5. Conclusões	30
5.6. Referências Bibliográficas	31
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	34

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura	Página
1 Duração (dias) da fase de ovo (A), de cada estágio ninfal (B, C, D, E, e F) e desenvolvimento total da fase ninfal (G) de <i>Podisus nigrispinus</i> (Heteroptera: Pentatomidae) submetidos a temperaturas constantes (17, 21, 25 e 29 ± 0,2°C), umidade relativa de 60 ± 9,5%, fotoperíodo de 12hs e alimentados com <i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: Tenebrionidae).....	16
2 Sobrevivência (%) em cada estágio ninfal (A, B, C, D e E) e de adultos (F) de <i>Podisus nigrispinus</i> (Heteroptera: Pentatomidae) submetidos a temperaturas constantes (17, 21, 25 e 29 ± 0,2°C), umidade relativa de 60 ± 9,5%, fotoperíodo de 12hs e alimentados com <i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: Tenebrionidae).....	17
3 Longevidade (dias) de machos e fêmeas (A) e número de ovos por fêmeas (B) de <i>Podisus nigrispinus</i> (Heteroptera: Pentatomidae) submetidos a temperaturas constantes (17, 21, 25 e 29 ± 0,2°C), umidade relativa de 60 ± 9,5%, fotoperíodo de 12hs e alimentado com <i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: Tenebrionidae).....	18
4 Período de Pré-oviposição, Oviposição e Pós-oviposição de fêmeas de <i>Podisus nigrispinus</i> (Heteroptera: Pentatomidae), submetidos a temperaturas constantes (17, 21, 25 e 29 ± 0,2°C) umidade relativa de 60 ± 9,5%, fotoperíodo de 12hs e alimentado com <i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: Tenebrionidae).....	18
5 Peso (mg) de machos e fêmeas de <i>Podisus nigrispinus</i> (Heteroptera: Pentatomidae) recém-emergidos submetidos a temperaturas constantes (17, 21, 25 e 29 ± 0,2°C), umidade relativa de 60 ± 9,5%, fotoperíodo de 12hs e alimentado com <i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: Tenebrionidae).....	19
6 Comprimento (cm) (A) e largura (cm) (B) de machos e fêmeas de <i>Podisus nigrispinus</i> (Heteroptera: Pentatomidae) 24 hs de emergidos, submetidos a temperaturas constantes (17, 21, 25 e 29 ± 0,2°C), umidade relativa de 60 ± 9,5%, fotoperíodo de 12hs e alimentado com <i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: Tenebrionidae).....	19

CAPÍTULO 2

Figura	Página
1 Secções histológicas do córion de <i>Podisus nigrispinus</i> (Heteroptera: Pentatomidae) com 48 horas de idade embrionária, controle (ovos sem tratamento) (A) e com soluções químicas (HD+HP+IS+HX) para decorionização/permeabilização (B). Barra= 6µ. Exocóron (Ex), Endocóron (En) e espinhos (Th).....	28

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela		Página
1	Viabilidade (% $\pm$ SE) de ovos de <i>Podisus nigrispinus</i> (Heteroptera: Pentatomidae) com diferentes idades embrionárias (24, 48, 72 e 96 horas) após aplicação de soluções químicas para retirada e permeabilização do corion. Controle (ovos sem tratamento), Hidróxido de sódio (HD), Hipoclorito de sódio (HP), Álcool isopropil (IS), Hexano (HX), HD+HP, HD+HP+IS, HD+HP+IS+HX.....	28
2	Espessura (μ m) do córion de <i>Podisus nigrispinus</i> (Heteroptera: Pentatomidae) com 48 horas de idade embrionária após tratamento com soluções químicas (HD+HP+IS+HX) para decorionização/permeabilização.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

MIP	Manejo Integrado de Pragas
HD	Hidróxido de sódio
HP	Hipoclorito de sódio
IS	Isopropil
HX	Hexano
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UFS	Universidade Federal de Sergipe
LEFLO	Laboratório de Entomologia Florestal
EX	Exocórion
EN	Endocórion
TH	Espinhos

RESUMO

SANTOS, Ítala Tainy Barreto Francisco dos. **Desenvolvimento de *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae) em diferentes temperaturas e uso de soluções químicas para permeabilização de ovos.** São Cristóvão: UFS, 2017. 34p. (Dissertação– Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).*

Podisus nigrispinus Dallas (Heteroptera: Pentatomidae) é um percevejo predador utilizado no controle biológico de diversas pragas e por isso tem sido criado em grandes quantidades em laboratórios. Assim, com objetivo de otimizar a criação massal de *P. nigrispinus* manipulando a temperatura, dois experimentos foram realizados, um voltado à investigação dos efeitos de diferentes temperaturas no desenvolvimento e outras características biológicas do percevejo predador; e outro, voltado à avaliação dos processos de decorionização e permeabilização na viabilidade de ovos de *P. nigrispinus* com diferentes idades embrionárias. No primeiro experimento, quatro temperaturas foram utilizadas (17, 21, 25 e 29°C $\pm$ 0,2), e os parâmetros avaliados foram duração da fase de ovo, dos estádios ninfais, sobrevivências, longevidade de adultos, número de ovos por fêmea, período de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição, peso e tamanho de adultos. Como resultado, foi observada uma relação inversamente proporcional entre os parâmetros duração da fase de ovo e dos estádios ninfais com a sobrevivência nas temperaturas estudadas. Maior longevidade de adultos e período de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição foram obtidos na temperatura de 17°C. Todavia, o número de ovos, peso e tamanho de adultos foram afetados adversamente. Portanto, as temperaturas de 21 e 25°C são mais apropriadas para o desenvolvimento do predador. Entretanto, as temperaturas extremas (17 e 29°C) permitiram retardar ou acelerar o ciclo de vida do inseto, mediante necessidade de inimigos naturais em campo. No segundo experimento, embriões de 24, 48, 72 e 96 horas de idade foram submetidos a soluções químicas para decorionização e permeabilização. Consequentemente, embriões com 96 horas de idade apresentaram maiores viabilidades quando comparados aos de 24, 48 e 72 horas. Observações em microscópio de luz revelaram diferenças na espessura do córion após tratamentos com soluções químicas. Assim, as soluções para decorionização e permeabilização de ovos de *P. nigrispinus*, juntamente com a idade embrionária afetam a viabilidades de embriões a serem criopreservados.

Palavras-chave: Criação massal, Percevejo-Predador, Temperatura, Vitificação.

* Comitê Orientador: Genésio Tâmara Ribeiro – UFS (Orientador)

ABSTRACT

SANTOS, Ítala Tainy Barreto Francisco dos. **Development of *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae) in different temperatures and use of chemical solutions for eggs permeabilization.** São Cristóvão: UFS, 2017. 34p. (Master of Science in Agriculture and Biodiversity).*

Podisus nigrispinus Dallas (Heteroptera: Pentatomidae) is a stinkbug used in the biological control of several pests, and has therefore been massively reared in laboratories. Thus, with the objective of optimizing the mass rearing of *P. nigrispinus* by manipulating the temperature, two experiments were carried out: the first, aimed at investigating the effects of different temperatures on the development and on other biological characteristics of the predatory stinkbug; and the second, aimed at evaluating the processes of dechoriation and permeabilization in the viability of *P. nigrispinus* eggs with different embryonic ages. In the first experiment, four temperatures were used (17, 21, 25, and 29 °C $\pm$ 0.2), and the following parameters were evaluated: duration of the egg and nymphs stages; survival; adults longevity; number of eggs per female; pre-oviposition, oviposition and post-oviposition periods; adult weight and size. As result, an inversely proportional relationship was observed between the parameters duration of the egg and nymphs stages and survival at the temperatures studied. Longer adult longevity, pre-oviposition, oviposition and post-oviposition periods were obtained at a temperature of 17 °C. Conversely, the number of eggs, weight and size were adversely affected. Therefore, temperatures of 21 and 25 °C are the most suitable for the development of the predator; however, the extreme temperatures (17 and 29 °C) allowed delaying or accelerating the life cycle of the insect. In the second experiment, embryos of 24, 48, 72 and 96 hours of age were subjected to chemical solutions for dechoriation and permeabilization. Consequently, embryos with 96 hours of age presented greater viabilities, when compared with those with 24, 48 and 72 hours of age. Observations under a light microscope revealed differences in the chorion thickness after treatments with chemical solutions. Thus, the solutions for dechoriation and permeabilization of *P. nigrispinus* eggs together with embryonic age affect the viability of embryos to be cryopreserved.

Key-words: Mass rearing, Stinkbug-Predator, Temperature, Vitification.

* Supervising Committee: Genésio Tâmara Ribeiro – UFS (Orientador).

1. INTRODUÇÃO GERAL

Podisus é um dos gêneros mais importantes da família Pentatomidae, com distribuição geográfica nos países de clima temperado e tropical e de hábito alimentar generalista (LUNDGREN, 2011). Desse gênero destaca-se a espécie *P. nigrispinus* Dallas (1851) (Heteroptera: Pentatomidae) que é considerada um importante predador de lepidópteros e coleópteros daninhos (ZANUNCIO et al., 2002; MEDEIROS et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2011; VACARI et al., 2014).

Estima-se que *P. nigrispinus* possui habilidade em predação cerca de 30 espécies de insetos-praga de importância econômica (MENEZES et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2008; TORRES; ZANUNCIO; MOURA, 2006), e ainda que insetos herbívoros são responsáveis por perdas médias de 14% na produtividade agrícola nos países desenvolvidos (ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009; ZAMBOLIM; CONCEIÇÃO; SANTIAGO, 2008). Por isso, insetos predadores, como *P. nigrispinus*, têm sido criados em laboratório e liberados em programas de controle biológico em culturas como o eucalipto (ZANUNCIO et al., 2002), algodão (MEDEIROS et al., 2000), soja (FERREIRA et al., 2008) e tomate (TORRES et al., 2002).

A produção eficiente e econômica é o fator determinante para o sucesso de programa de controle biológico. Estima-se que 60 a 80% dos custos de produção do inseto são gastos com mão de obra (PARRA et al., 2002). Trata-se de um desafio para a comercialização e uso desses insetos em um programa de MIP (DE BORTOLI et al., 2011). Outro desafio é a sincronia do calendário de produção de inimigos naturais com surto de pragas no campo, o que em muitas vezes não ocorre, indicando, assim, a necessidade de técnicas de armazenamento (COLINET; HANCE, 2010) ou métodos que manipule o ciclo de vida do agente de controle biológico.

A temperatura é o principal fator que explica a variação do desenvolvimento de insetos (KINGSOLVER; HUEY, 2008; LIU; ZHANG; ZHU, 1995) e com isto, pode-se manipular o ciclo de vida do inimigo natural em criações massais através de diferentes temperaturas. Um método promissor é a criopreservação, que utiliza-se de baixas temperaturas, (-196°C), o qual foi aplicado com sucesso em algumas ordens de insetos como Himenoptera, Lepidoptera e Diptera (RAJAMOCHAN et al., 2013; RAJAMOCHAN; RINEHART; LEOPOLD, 2014; ROVERSI; COSI; IRDANI, 2008).

A criopreservação pode ser uma alternativa eficiente para estocagem de ovos de agente de controle biológico, pois em criações convencionais os agentes de controle biológico são criados frequentemente, enquanto que a ocorrência do surto da praga flutua ao longo do tempo (COLINET; BOIVIN, 2011; COSTA et al., 2016). Dessa forma, a necessidade de construir e manter grandes instalações para criações massais poderiam ser diminuídas com o uso da tecnologia. Adicionalmente, o uso de agentes de controle biológico em substituição aos pesticidas poderia ser mais expandido se tecnologia de armazenagem, tal como criopreservação, fosse desenvolvida, pois, ao contrário dos inimigos naturais, pesticidas químicos são armazenados e transportados com facilidade por todo mundo (LEOPOLDO, 1991).

Até a presente data, poucos estudos são encontrados a respeito do efeito de diferentes temperaturas no desenvolvimento ninfal de *P. nigrispinus*. Adicionalmente, para criopreservação de ovos desse percevejo nada foi descrito. Sendo esses, portanto, os focos deste trabalho.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Podisus nigrispinus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae)

2.1.1 Biologia

Podisus nigrispinus (Dallas, 1851) pertencente a subordem Heteroptera, família Pentatomidae, é um percevejo predador amplamente distribuído e encontrado nos países de clima temperado e tropical (INAYAT et al., 2011; NEVES; TORRES; ZANUNCIO, 2010). Os aspectos biológicos desse predador variam em função de fatores bióticos e abióticos, tais como: temperatura, umidade, alimentação e espaço de criação massal (TORRES; ZANUNCIO; MOURA, 2006).

O ciclo de vida de *P. nigrispinus* passa por fases de ovo, ninfa e adulto. O período de incubação dos ovos sob 25 a 27°C varia de cinco a seis dias (TORRES; ZANUNCIO; MOURA, 2006). Na fase ninfal, o inseto passa por cinco estádios, sendo que o início da alimentação ocorre no segundo instar e o período total de desenvolvimento ninfal dura entre 20 a 30 dias quando mantido a 25°C e alimentado com *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (OLIVEIRA et al., 2004).

Na fase adulta, as fêmeas, usualmente, são maiores do que os machos; seus tamanhos variam de 10 a 12mm e de 8,5 a 10mm, respectivamente. Além disto, as fêmeas apresentam maiores pesos (45 a 140mg) do que os machos (35 a 100mg) (TORRES; ZANUNCIO; MOURA, 2006). A maturação sexual ocorre de dois a quatro dias para as fêmeas, e para os machos de um a dois dias (CARVALHO et al., 1994a; 1994b).

A oviposição ocorre cerca de um dia após o acasalamento, mas picos de oviposição ocorrem ao redor da segunda e terceira semana de vida adulta (TORRES; ZANUNCIO; MOURA, 2006). O número de ovos pode variar entre 350 a 390 (CURITIBA ESPINDULA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011, 2002), isto porque o acasalamento múltiplo aumenta a viabilidade dos ovos (RODRIGUES et al., 2008; SOUSA-SOUTO et al., 2006). Em geral, as fêmeas realizam 13 copulações com três a quatro machos durante um período de uma a duas semanas, este período é suficiente para produzir ovo e fertilizar ninfas por cerca de 80% de sua vida útil (TORRES; ZANUNCIO, 2001).

As fêmeas podem, ainda, estocar em suas espermatecas espermatozoides para garantir uma reprodução sem interrupção (SAKURAI, 1998). Porém, fêmeas, quando acasaladas isoladamente, exibem intervalo mais longo entre oviposição e diminuem a fertilidade após a produção de cerca de 200 ovos, o que pode indicar escassez de espermatozoides, necessitando, assim, de inseminações adicionais (TORRES; ZANUNCIO, 2001).

Por fim, a longevidade de machos e fêmeas varia de 30 a 85 dias quando mantidos a 25 a 27°C. A longevidade, assim como outros parâmetros biológicos do predador, depende das condições ambientais, disponibilidade de presa e qualidade nutricional das mesmas (TORRES; ZANUNCIO; MOURA, 2006).

2.1.2 Importância econômica

Podisus nigrispinus é comumente encontrado nas Américas (TORRES; ZANUNCIO; MOURA, 2006), e no Brasil encontra-se distribuído em praticamente todo território (PIRES et al., 2009). É um importante predador naturalmente associado aos surtos de lepidópteros e coleópteros daninhos, e por isso, é considerado como a primeira linha de defesa de pragas no Manejo Integrado de Pragas de espécies agrícolas e florestais (MEDEIROS et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2011; VACARI et al., 2014; ZANUNCIO et al., 1994).

Este inimigo natural preda cerca de 30 espécies de insetos-praga de importância econômica (RODRIGUES et al., 2008; TORRES; ZANUNCIO; MOURA, 2006). Em cultivos agrícolas como *Gossypium* sp., *Solanum* sp. e *Glycine* sp. (DE OLIVEIRA et al., 2002; LEMOS et al., 2001; NETO et al., 2002) *P. nigrispinus* tem sido utilizado no controle biológico de lagartas desfolhadoras como *Alabama argillacea* Hübner (Lepidoptera:

Noctuidae), *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (DE BORTOLI et al., 2011; HASSANPOUR et al., 2011; MEDEIROS et al., 2003; NETO et al., 2002).

Já em plantações florestais de eucalipto tem sido utilizado no controle de *Thyrinteina arnobia* Stoll (Lepidoptera: Geometridae), *Psorocampa denticulata* Schaus (Lepidoptera: Notodontidae), *Eupseudosoma aberrans* Schaus (Lepidoptera: Noctuidae), *Sarsina violascens* Herrich-Schaeffer (Lepidoptera: Noctuidae) e *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (ZANUNCIO et al., 1991; ZANUNCIO et al., 1994).

Assim, por se tratar de um predador generalista com eficiência em predação diversas pragas, *P. nigrispinus* tem sido utilizado em programas de Manejo Integrado de Pragas por empresas agrícolas e florestais. No Brasil, várias empresas reflorestadoras mantêm suas criações e fazem liberação em campo para prevenir surto de ocorrência de pragas (ZANUNCIO et al., 1991), tal como, a Bahia Specialty Cellulose/ Copener. Já na Europa e nos Estados Unidos, percevejos predadores pertencente à subfamília Asopinae podem ser encontrados disponíveis comercialmente para o controle de pragas (DE BORTOLI et al., 2011).

2.2 Controle Biológico de Insetos

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) consiste em um sistema de apoio de decisões isoladas ou associadas para a adoção de controle de pragas, que considera aspectos econômicos, ecológicos, toxicológicos e sociais para a tomada de decisão de controle (DA SILVA; BATISTA; BRITO, 2009; KOGAN, 1998). Entre os métodos de controle de pragas do MIP estão os métodos culturais, genéticos, legislativo, resistência de plantas, mecânicos, físicos, por comportamento, químico e biológico (CROCOMO, 1990).

O Controle Biológico trata-se de uma importante ferramenta utilizada dentro de um programa de MIP (BUSOLI et al., 2015) e pode ser definido como um fenômeno natural que consiste na regulação populacional de insetos-praga por meio da ação de inimigos naturais, resultante de interações antagônicas como parasitismo, predação e competição (CALTAGIRONE, 1988; BUSOLI et al., 2015).

O Controle Biológico pode ser de três tipos: o clássico, em que há a introdução (importação) de organismos para o controle da praga, o natural, em que visa favorecer as populações de inimigos naturais e o aplicado, em que os inimigos naturais são multiplicados em laboratório para aplicação em campo (BUENO, 2009). Já os principais agentes de controle biológico são os predadores, parasitas, parasitoides e entomopatógenos.

Os predadores são organismos de vida livre que se alimentam durante seu desenvolvimento de uma presa, em geral, estes são maiores do que a presa. Os parasitas, estes utilizam-se de mais de um hospedeiro para completar o ciclo de vida e não os matam. Os parasitoides que necessitam de um único indivíduo para completar seu desenvolvimento, e os matam lentamente. Ambos, parasitas e parasitoides, possuem tamanho inferior ao seu hospedeiro. Por fim, os entomopatógenos que são responsáveis em causar doenças em insetos, em geral são os vírus, fungos, bactérias e nematoides (GALLO et al., 1988).

O controle de pragas por inimigos naturais foi apreciado por mais de mil anos (SIMMONDS; FRANZ; SAILER, 1976) entretanto, nos últimos anos houve um aumento no seu uso (DE-BACH, 1964) devido à eficiência no controle de pragas, redução de agroquímicos e possibilidade de criação desses insetos em escala comercial (DA SILVA; DE BRITO, 2015).

2.2.1 Criação massal de insetos

A utilização de inimigos naturais como agente de controle biológico está ligada à produção em laboratório (BUENO, 2009). Portanto, a criação massal é a produção de um suprimento de insetos relativamente grande para a distribuição em campo (LEPPLA; ADAMS, 1987; PARRA, 2009).

Ao se iniciar uma criação massal, etapas devem ser seguidas. Algumas delas são a coleta, identificação e manutenção do inimigo natural; seleção de presas para criação; avaliação dos aspectos comportamentais do predador; estudo da dinâmica populacional da praga; produção em laboratório do inimigo natural; determinação de época e forma de liberação; dentre outros (PARRA et al., 2002).

A produção eficiente e econômica é o fator determinante para o sucesso de programa de controle biológico. Estima-se que 60 a 80% dos custos de produção do inseto são gastos com mão de obra, sendo então um desafio para a comercialização e uso desses insetos em um programa de MIP (DE BORTOLI et al., 2011; PARRA et al., 2002). Outro desafio está ligado à produção de um número adequado de inimigos naturais e harmonização com o surto da praga em campo (COLINET; HANCE, 2010). Por isso, ao longo dos anos, os programas de criação massal de inimigos naturais têm passado por mudanças consideráveis para minimizar alguns desequilíbrios, como adaptações de presas (DE OLIVEIRA et al., 2002) e estocagem de ovos (COSTA et al., 2016).

2.3 Efeito da temperatura no desenvolvimento dos insetos

2.3.1 Temperatura

O desenvolvimento e sobrevivência de um inseto pode variar em resposta a fatores bióticos e abióticos (COURET; DOTSON; BENEDICT, 2014). A temperatura é principal fator, ocasionando alterações nas taxas metabólicas (HODKOVA; HODEK, 2004; KINGSOLVER; HUEY, 2008), como crescimento, alimentação, oviposição, número de gerações e principalmente a velocidade de desenvolvimento (BURSELL, 1974; SPEIGHT et al., 1999).

Insetos somente conseguem alcançar a fase adulta e se reproduzir dentro de um gradiente de temperatura, existindo uma temperatura ótima (HADDAD; PARRA; MORAES, 1999). As faixas ótimas de temperatura para grande parte dos insetos, estão localizados em torno de 15°C a 38°C, sendo 25°C o ponto ótimo de desenvolvimento, com maior número de descendentes. Em temperaturas acima de 38°C ou abaixo de 15°C os insetos podem entrar em um estado quiescente, e, readquirem suas atividades metabólicas quando a temperatura retorna a faixa ótima. (SILVEIRA-NETO, 1976; ROSENTHAL, 2013). Mas, efeitos negativos são esperados quando submetidos a temperaturas próximas dos limites mínimo e máximo (HADDAD; PARRA; MORAES, 1999).

As exigências térmicas de insetos tem sido amplamente estudadas para a compreensão da dinâmica populacional de insetos-praga em campo (WALLNER, 1987; JOHNSON et al., 2016). E, recentemente variações térmicas têm sido utilizadas para manipular o ciclo de vida de inúmeros insetos, permitindo controlar a população em laboratório (PARRA, 2001), e trazendo maior flexibilidade e eficiência da criação (LEOLPOLDO; CHEN, 2005; CAO et al., 2016).

2.3.2 Criopreservação de insetos

A aplicação da criopreservação tem sido abundantemente utilizada em muitos materiais biológicos, tais como espermatozoides (NASCIMENTO et al., 2015), óvulo e embriões de animais e humanos (CANTANHÊDE et al., 2016; GASDA, 2015; TSAI; LIN, 2012), tecidos vegetais e sementes (PORTO, 2013) e nas últimas duas décadas em embriões de insetos (LEOPOLD; RINEHART, 2010).

A criopreservação pode ser obtida através de duas técnicas: o congelamento lento ou vitrificação. No congelamento lento utiliza-se de baixas concentrações de crioprotetores, a temperatura é reduzida gradativamente de forma constante até atingir -32°C, na célula a água do meio extracelular se cristaliza, aumentando a concentração de solutos fora da célula atraindo a água do meio intracelular (LEIBO, 1977). Na vitrificação utilizam-se altas concentrações de crioprotetores que aumentam a viscosidade do meio em que, durante o

resfriamento, a água celular se solidifica em estado vítreo, sem formação de cristais de gelo (RALL; FASHY, 1985; VAJTA; NAGY, 2006).

Para insetos, a criopreservação por vitrificação tem sido comprovada apenas em ordens como Diptera, Lepidoptera, sendo oito espécies de embriões de Diptera (LEOPOLD et al., 2001; MAZUR et al., 1992; RAJAMOHAN et al., 2013; RAJAMOHAN; LEOPOLD, 2007; RAJAMOHAN; RINEHART; LEOPOLD, 2014; STEPONKUS et al., 1990; AUGUSTINOS et al., 2016) e duas espécies de embriões de Lepidoptera (RAJAMOHAN et al., 2013; ROVERSI; COSI; IRDANI, 2008).

A criopreservação de embriões de insetos, ao contrário da de embriões de mamíferos, é mais difícil, pois o conteúdo em um embrião de inseto normalmente é intolerante ao congelamento, além de apresentar o córion, uma barreira de proteção contra a dissecação e perigos ambientais, que dificulta a penetração de crioprotetores (LEOPOLD, 1991). Portanto, o processo de criopreservação de insetos envolve algumas etapas, como definição do estágio de desenvolvimento, decorionização dos ovos, remoção da água superficial, permeabilização com soluções alcalinas, proteção dos embriões com agentes crioprotetores, desidratação e finalmente imersão em nitrogênio líquido (LEOPOLD; RINEHART, 2010).

O estágio de desenvolvimento adequado para a criopreservação de insetos é durante o desenvolvimento embrionário, porém na fase inicial embrionária as soluções crioprotetoras podem ser altamente tóxicas (LEOPOLD; RINEHART, 2010; RAJAMOHAN; LEOPOLD, 2007; WANG et al., 2000), já em embriões no final do estágio de desenvolvimento o tratamento com crioprotetores é ineficiente devido à formação de cutículas impedindo a remoção da água (LEOPOLD; RINEHART, 2010).

O córion recobre a membrana vitelina dos insetos e o sucesso da criopreservação também depende da permeabilização ou remoção desse material (BERKEBILE; CHIRICO; LEOPOLD, 2000). Em trabalhos com dípteros e lepidópteros, soluções como hipoclorito de sódio e alcanos foram utilizados para remover/permeabilizar o corion e membrana vitelina, respectivamente (RAJAMOHAN et al., 2013; RAJAMOHAN; RINEHART; LEOPOLD, 2014; ROVERSI; COSI; IRDANI, 2008; STEPONKUS et al., 1990).

Os crioprotetores são agentes químicos que conferem tolerância às células ao frio e/ou congelamento, estes podem penetrar ou não as células através da membrana plasmática e evitam a formação de cristais de gelo (LEOPOLD, 1991). Os crioprotetores penetrantes, como etileno glicol, propanodiol e dimetilsulfóxido, são pequenas moléculas que atravessam as membranas celulares e formam pontes de hidrogênio com as moléculas de água no citosol fazendo com que o ponto de congelamento da água diminua, reduzindo a probabilidade de formação de cristais de gelo na célula (PEREIRA; MARQUES, 2008). Os crioprotetores não penetrantes, tais como trealose e sacarose, não atravessam as membranas por serem moléculas grandes, permanecendo no meio extracelular e atraem a água para fora da célula, levando-a a desidratação (PEREIRA; MARQUES, 2008).

Variações nas características dos embriões, tais como volume do embrião, permeabilização, composição da superfície de cera, espessura do córion, taxa de desenvolvimento, dentre outros (NELSON; LEOPOLD, 2003; RAJAMOHAN; LEOPOLD, 2007) faz com que haja necessidade de padronização de um protocolo de criopreservação para cada espécie de inseto.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUGUSTINOS, A. A. et al. Cryopreservation of Embryos of the Mediterranean Fruit Fly *Ceratitis capitata* Vienna 8 Genetic Sexing Strain. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 15, 2016.

BERKEBILE, D. R.; CHIRICO, J.; LEOPOLD, R. A. Permeabilization of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) Embryos. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 6, p. 968–972, 2000.

BUENO, V. H. P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: UFLA, 2. ed. 2009. 411p.

BURSELL, E. Environmental aspects – Temperature. In: ROCKSTEIN, M. (ed.). **The physiology of insecta**. 2.ed. New York: Academic, 1974. Cap.1, 1-41p.

BUSOLI, A. C. et al. Tópicos em Manejo Integrado de Pragas em sistemas agrícolas. In: BUSOLI, A. C.; CASTILHO, R. C.; ANDRADE, D. J.; ROSSI, G. D.; VIANA, D. L.; FRAGA, D. F.; SOUZA, L. A. (eds.) **Tópicos em Entomologia Agrícola – VIII**. Jaboticabal (SP): Maria de Lourdes Brandel, 2015. 277-303p.

CANTANHÊDE, L. F. et al. Desenvolvimento da criopreservação de embriões em caprinos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 11, p. 155–171, 2016.

CALTAGIRONE, L. E. Definitions and principles of biological control. In. 2nd International Short Course in Biological Control, Berkeley, **Anais...** Berkeley: University of California, 1988. 7p.

CAO, G. et al. Low Temperature Storage of Eggs Improve the Development and Reproduction of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). **Journal of Economic Entomology**, v. 109, n. 5, p. 2061–2068, 2016.

CARVALHO, R. S. et al. Caracterização morfológica da glândula do feromônio sexual do predador *Podisus nigrispinus* (Dallas). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 143-147, 1994a.

CARVALHO, R. S. et al. Ritmo do comportamento de acasalamento e atividade sexual de *Podisus connexivus* Bergroth (Heteroptera: Pentatomidae: Asopinae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 23, n. 2, p.197-202, 1994b.

CROCOMO, W. B. **Manejo Integrado de Pragas**. Botucatu, São Paulo: UNESP/CETESB, 1990. 358p.

COLINET, H.; BOIVIN, G. Insect parasitoids cold storage: A comprehensive review of factors of variability and consequences. **Biological Control**, v. 58, n. 2, p. 83–95, 2011.

COLINET, H.; HANCE, T. Interspecific variation in the response to low temperature storage in different aphid parasitoids. **Annals of Applied Biology**, v. 156, n. 1, p. 147–156, 2010.

COSTA, V. H. D. DA et al. Egg storage of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) Predators at low temperatures. **Revista Árvore**, v. 40, n. 5, p. 877–884, 2016.

COURET, J.; DOTSON, E.; BENEDICT, M. Q. Temperature, Larval Diet, and Density Effects on Development Rate and Survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–9, 2014.

CURITIBA ESPINDULA, M. et al. Desenvolvimento e reprodução de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) alimentado com lagartas de *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Idesia (Arica)**, v. 28, n. 3, p. 17–24, 2010.

DA SILVA, A. B.; BATISTA, J. D. L.; BRITO, C. H. D. Capacidade Predatória de *Euborellia annulipes* (Lucas, 1847) sobre *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 1, p. 7–11, 2009.

DA SILVA, A. B.; DE BRITO, J. M. Controle biológico de insetos-pragas e suas perspectivas para o futuro. **Agropecuária Técnica**, v. 36, n. 1, p. 248–258, 2015.

DE-BACH, P. **The scope of biological control.** In **Biological Control of Insect Pests and Weeds**. P. DeBach (eds.). New York: Reinhold Publishing Corporation. 1964, 3-20p.

DE BORTOLI, S. A. et al. Comparative biology and production costs of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) when fed different types of prey. **Biological Control**, v. 58, n. 2, p. 127–132, 2011.

DE OLIVEIRA, J. E. M. et al. Biologia de *Podisus nigrispinus* predando lagartas de *Alabama argillacea* em campo. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 37, n. 1, p. 7–14, 2002.

FERREIRA, J. A. M. et al. Predatory behaviour of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) on different densities of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 7, p. 711–719, 2008.

GALLO, D. et al. **Manual de entomologia agrícola.** São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1988, 531p.

GASDA, É. E. Criopreservação de embriões humanos no contexto da saúde sexual e reprodutiva. **Revista Pistis Praxis**, v. 7, n. 656, p. 635, 2015.

HADDAD, M. L.; PARRA, J. R. P.; MORAES, R. C. B. **Métodos para estimar os limites térmicos inferior e superior de desenvolvimento de insetos.** Piracicaba: FEALQ, 1999. 29p.

HASSANPOUR, M. et al. Functional response of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): Effect of prey and predator stages: Functional response of *Chrysoperla carnea* to *Helicoverpa armigera*. **Insect Science**, v. 18, n. 2, p. 217–224, 2011.

HODKOVA, M.; HODEK, I. Photoperiod, diapause and cold-hardiness. **European Journal of Entomology**, v. 101, n. 3, p. 445–458, 2004.

INAYAT, T. P. et al. Predator-prey relationship among selected species in the croplands of central Punjab, Pakistan. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 48, n. 2, p. 153–157, 2011.

- JOHNSON, C. A. et al. Effects of temperature and resource variation on insect population dynamics: the bordered plant bug as a case study. **Functional Ecology**, v. 30, n. 7, p. 1122–1131, jul. 2016.
- KINGSOLVER, J. G.; HUEY, R. B. Size, temperature, and fitness: three rules. **Evolutionary Ecology Research**, v. 10, n. 2, p. 251–268, 2008.
- KOGAN, M. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. **Annual review of entomology**, v. 43, n. 1, p. 243–270, 1998.
- LEE, R. E. Principles of insect Low Temperature Tolerance. In: LEE R. E. DENLINGER, D.L. (eds). **Insects at low temperature**. Chapman & Hall, New York, USA, 1991. 17-46p.
- LEIBO, S. P. Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. In: Elhott K, Whelan J, (eds). **The Freezing of Mammalian embryos**. Ciba Foundation Symposium 52. Amsterdam: Elsevier, Excerpta Medica, 52, 1977, 69-92p.
- LEMOS, W. P. et al. Effects of plant feeding on the development, survival and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). **International Journal of Pest Management**, v. 47, n. 2, p. 89–93, 2001.
- LEOPOLD, R.A. Cryopreservation of insect germoplasm: cells, tissues and organisms. In: LEE R. E. DENLINGER, D.L. (eds). **Insects at low temperature**. Chapman & Hall, New York, USA, 1991. 379-407p.
- LEOPOLD, R. A. et al. Cryopreservation of Embryos of the New World Screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 94, n. 5, p. 695–701, 2001.
- LEOPOLD, R. A.; CHEN, W. L. Refrigerated storage of glassy-winged sharpshooter eggs used for propagation of the parasitoid, *Gonatocerus ashmeadi*. In: TARIQ, M. A.; BLINCOE, P.; MOCHEL, M.; OSWALT, S.; ESSER, T. (eds.) **Proceedings of the 2005 Pierce's Disease Research Symposium**. San Diego, CA, 2005. 354–358p.
- LEOPOLD, R. A.; RINEHART, J. P. A template for insect cryopreservation. **Low temperature biology of insects**, 2010, 325–341p.
- LEPPLA, N. C.; ADAMS, F. Insect massrearing technology, principles and applications. 1987p.
- LIU, S.-S.; ZHANG, G.-M.; ZHU, J. U. N. Influence of temperature variations on rate of development in insects: analysis of case studies from entomological literature. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 88, n. 2, p. 107–119, 1995.
- LUNDGREN, J. G. Reproductive ecology of predaceous Heteroptera. **Biological Control**, v. 59, n. 1, p. 37–52, 2011.
- MAZUR, P. et al. Cryobiological preservation of *Drosophila* embryos. **Science- New York Then Washington**, v. 258, p. 1932–1932, 1992.

- MEDEIROS, R. S. et al. Age-dependent fecundity and life-fertility tables for *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 124, p. 319–324, 2000.
- MEDEIROS, R. S. et al. Temperature influence on the reproduction of *Podisus nigrispinus*, a predator of the noctuid larva *Alabama argillacea*. **BioControl**, v. 48, n. 6, p. 695–704, 2003.
- MENEZES, C. W. G. et al. Selectivity of atrazin and nicosulfurom to *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Planta Daninha**, v. 30, n. 2, p. 327–334, 2012.
- NASCIMENTO, J. N. et al. Utilização de diferentes diluentes na criopreservação de espermatozoides de garanhões manga larga marchado. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 324–330, 2015.
- NELSON, D. R.; LEOPOLD, R. A. Composition of the surface hydrocarbons from the vitelline membranes of dipteran embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, n. 2, p. 295–308, 2003.
- NETO, M. et al. Nymphal development of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera, Pentatomidae) preying on larvae of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera, Noctuidae) fed with resistant and susceptible soybeans. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 46, n. 3, p. 237–241, 2002.
- NEVES, R. C. dos S.; TORRES, J. B.; ZANUNCIO, J. C. Production and storage of mealworm beetle as prey for predatory stinkbug. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, n. 10, p. 1013–1025, 2010.
- OLIVEIRA, J. E. et al. Efeito das plantas do algodoeiro e do tomateiro, como complemento alimentar, no desenvolvimento e na reprodução do predador *Podisus nigrispinus* (Dallas)(Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 1, p. 101–108, 2002.
- OLIVEIRA, H. N. de et al. Development of the predator *Podisus nigrispinus* fed on *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 10, p. 947–951, 2004.
- OLIVEIRA, H. N. DE et al. Development and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fed with *Thyrintina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) reared on guava leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 3, p. 429–434, 2011.
- PARRA, J. R. P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 2001. 134p.
- PARRA, J. R. P. et al. Controle biológico: uma visão inter e multidisciplinar. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. (Eds.) **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002, 125-142p.
- PARRA J. R. P. A evolução das dietas artificiais e suas interações em ciência e tecnologia. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Org.). **Bioecologia e nutrição de insetos: base para o Manejo Integrado de Pragas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009, 1164p.
- PEREIRA, R. M.; MARQUES, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell and Tissue Banking**, v. 9, n. 4, p. 267–277, 2008.

PESHIN, R.; DHAWAN, A. K. (eds.). **Integrated Pest Management: Innovation-Development Process**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009.

PIRES, E. M. et al. **Produção de Percevejos Predadores**. 1. ed. Suprema, MG: Visconde do Rio Branco, 2009. 56p.

PORTO, J. M. P. **Criopreservação de calos, ápices caulinares e sementes de barbatimão**. Tese de Doutorado—Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2013.

RAJAMOHAN, A. et al. Permeability Barriers to Embryo Cryopreservation of *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 2, p. 855–861, 2013.

RAJAMOHAN, A.; LEOPOLD, R. A. Cryopreservation of Mexican fruit flies by vitrification: Stage selection and avoidance of thermal stress. **Cryobiology**, v. 54, n. 1, p. 44–54, 2007.

RAJAMOHAN, A.; RINEHART, J. P.; LEOPOLD, R. A. Cryopreservation of Embryos of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 2, p. 360–367, 2014.

RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. **Nature**, v. 313, p. 573–575, 1985.

RODRIGUES, A. R. S. et al. Spermatogenesis, changes in reproductive structures, and time constraint associated with insemination in *Podisus nigrispinus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, n. 12, p. 1543–1551, 2008.

ROSENTHAL, L. D. Influência de baixas temperaturas no desenvolvimento e aspectos bionômicos de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera, Muscidae). **Biotemas**, v. 26, n. 4, p. 93–99, 2013.

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

SAKURAI, T. Variation in time to sperm depletion and oviposition patterns in females of *Riptortus clavatus* (Heteroptera: Alydidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 91, n. 5, p. 737–740, 1998.

SILVEIRA-NETO, S. **Manual de Ecologia dos Insetos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976. 419p.

SIMMONDS F. J.; FRANZ, J. M, SAILER, R. I. History of biological control. In: Huffaker, C.B.; Messenger, P.S. (eds). **Theory and Practice of Biological Control**. New York: Academic. 1976. 788p.

SOUSA-SOUTO, L. et al. Sperm depletion: a cost for single mated females of *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 6, p. 923–926, 2006.

SPEIGHT, M.R. et al. **Ecology of insects, concepts and applications**. Oxford: Blackwell Science, 1999. 350p.

STEPONKUS, P. L. et al. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. **Nature**, v. 345, p. 170–172, 1990.

TORRES, J. B.; ZANUNCIO, J. C. Effects of sequential mating by males on reproductive output of the stinkbug predator, *Podisus nigrispinus*. **BioControl**, v. 46, n. 4, p. 469–480, 2001.

TORRES, J. B. et al. Dispersal of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) nymphs preying on tomato leafminer: Effect of predator release time, density and satiation level. **Journal of Applied Entomology**, v. 126, p. 326–332, 2002.

TORRES, J. B.; ZANUNCIO, J. C.; MOURA, A. M. The predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*: biology, ecology and augmentative releases for lepidoperan larval control in Eucalyptus forests in Brazil. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 1, n. 015, p. 1–18, 2006.

TSAL, S.; LIN, C. Advantages and applications of cryopreservation in fisheries science. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 55, n. 3, p. 425–434, 2012.

VACARI, A. M. et al. Effect of Egg Rearing Temperature and Storage Time on the Biological Characteristics of the Predatory Stink Bug *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 107, n. 1, p. 178–183, 2014.

VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 12, n. 6, p. 779–796, 2006.

WANG, W. B. et al. Cryopreservation of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) Embryos. **Cryobiology**, v. 41, n. 2, p. 153–166, 2000.

WALLNER, W. E. Factors affecting insect population dynamics: differences between outbreak and nonoutbreak species. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.32, n.1, p.317–340, 1987.

ZAMBOLIM, L., M. Z. D. CONCEIÇÃO, T. SANTIAGO. **O que Engenheiros Agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários**. ANDEF: Viçosa. 3ªed. 2008, 464p.

ZANUNCIO, T. V. et al. Parâmetros biológicos de *Podisus connexivus* (Hemiptera: Pentatomidae) em alimentação alternada com lagartas de *Bombyx mori* e larvas de *Musca domestica*. **Revista Árvore**, v. 15, n. 3, p. 308–315, 1991.

ZANUNCIO, J. et al. Hemipterous predators of eucalypt defoliator caterpillars. **Forest Ecology and Management**, v. 65, n. 1, p. 65–73, 1994.

ZANUNCIO, J. C. et al. Effect of body weight on fecundity and longevity of the stinkbug predator *Podisus rostralis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 9, p. 1225–1230, 2002.

ZARBIN, P. H.; RODRIGUES, M. A.; LIMA, E. R. Insect pheromones: technology and challenges for a competitive agriculture in Brazil. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 722–731, 2009.

4. CAPÍTULO 1

DIFERENTES TEMPERATURAS NO DESENVOLVIMENTO DE *Podisus nigrispinus* (DALLAS, 1851) (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE): IMPLICAÇÕES NA CRIAÇÃO MASSAL

RESUMO

Percevejos predadores, como o *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae), têm sido criado massalmente em laboratório e liberado nos programas de Manejo Integrado de Pragas. No entanto, a produção de inimigos naturais pode não coincidir com o surto de pragas no campo, fazendo necessário o uso de técnicas que permitam manipular o ciclo de vida do predador. Objetivou-se, portanto, investigar os efeitos de diferentes temperaturas no desenvolvimento e em outras características biológicas do percevejo predador *P. nigrispinus*. Quatro temperaturas foram utilizadas (17, 21, 25 e 29 °C $\pm$ 0,2), e os parâmetros avaliados foram: duração da fase de ovo e dos estádios ninfais; sobrevivências; longevidade de adultos; número de ovos por fêmea; período de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição; peso e tamanho de adultos. Foi observada uma relação inversamente proporcional entre os parâmetros duração da fase de ovo e dos estádios ninfais com a sobrevivência nas temperaturas estudadas. Maior longevidade de adultos e período de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição foram obtidos na temperatura de 17°C. Todavia, o número de ovos, peso e tamanho de adultos foram afetados adversamente. As temperaturas de 21 e 25 °C são as mais apropriadas para o desenvolvimento do predador. Por outro lado, temperaturas extremas (17 e 29 °C) permitem retardar ou acelerar o ciclo de vida do predador mediante a necessidade de inimigos naturais no campo.

Palavras-chave: Percevejo-Predador, Otimização de Desenvolvimento, Temperatura.

ABSTRACT

Different temperatures in the development of *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae): implications for massal rearing

Predatory stinkbugs, such as *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae), have been massively reared in the laboratory and released into Integrated Pest Management programs. However, the rearing of this natural enemy may not coincide with pests outbreaks in the field, which indicates the need for techniques to manipulate the life cycle of the predator. The objective of this study was to evaluate the effect of different temperatures on the development and other biological characteristics of the stinkbug predator *P. nigrispinus*. Four temperatures were used (17, 21, 25 and 29 °C $\pm$ 0.2), and the following parameters were evaluated: duration of the egg and nymphs stages; survival; adults longevity; number of eggs per female; pre-oviposition, oviposition and post-oviposition periods; adult weight and size. An inversely proportional relationship was observed between the parameters duration of the egg and nymphs stages and survival at the temperatures studied. Longer adult longevity, pre-oviposition, oviposition and post-oviposition periods were obtained at a temperature of 17 °C. Conversely, the number of eggs, weight and size were adversely affected. Temperatures of 21 and 25 °C were the most appropriate for the development of the predator; however, the extreme temperatures (17 and 29 °C) allowed delaying or accelerating the life cycle of the predator in function of the need for natural enemies in the field.

Key-words: Stinkbug-Predator, Development Optimization, Temperature.

4.1. Introdução

Podisus nigrispinus (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae) é um predador generalista encontrado em regiões de clima temperado e tropical (Neves et al. 2010; Inayat et al. 2011). São percevejos eficientes em preda diversas pragas em culturas como algodão, tomate, soja e eucalipto (Neto et al. 2002; Oliveira et al. 2002; Torres et al. 2002; Zanuncio et al. 2002). Este predador tem sido criado massalmente em laboratório e liberado em programas de controle biológico no Manejo Integrado de Pragas (Zanuncio et al. 2002; Bottega et al. 2014).

Embora a criação massal em laboratório produza grande quantidade de inimigos naturais, a produção de predadores pode não coincidir com o surto da praga no campo (Costa et al. 2016), o que gera custos, isto porque a presa é criada de forma contínua para sustentar a produção durante todo ano (Neves et al. 2010). A falta de sincronismo no calendário de produção de inimigos naturais com o surgimento de pragas no campo indica a necessidade de técnicas de armazenamento (Colinet e Hance 2010) ou métodos que manipule o ciclo de vida do agente de controle biológico.

Sabe-se que o desenvolvimento e sobrevivência de um inseto pode variar em resposta a fatores bióticos e abióticos (Couret et al. 2014). E que é a temperatura o principal fator que explica a variação do desenvolvimento dos insetos (Liu et al. 1995; Kingsolver e Huey 2008) devido às alterações das taxas metabólicas (Hodkova e Hodek 2004). Por exemplo, temperaturas mais altas estão associadas com o aumento da taxa de desenvolvimento (Kingsolver e Huey 2008; Arrese e Soulages 2010), o que é ideal quando há a necessidade rápida de inimigos naturais. Enquanto que o uso de temperaturas baixas foi comprovado como um método que aumenta a vida útil dos insetos (Colinet e Hance 2010).

Contudo, a manipulação da temperatura quer seja para o atraso no ciclo ou obtenção rápida de predadores não é tão simples assim. Exposição prolongada ao frio pode causar lesões que acumuladas progressivamente tornam-se irreversíveis ou letais em um limite

específico (Košťál et al. 2006; Silva et al. 2013), como em *P. nigrispinus*, em que ovos a 5°C são afetados letalmente (Vacari et al. 2014).

Em geral, embriões apresentam maior tolerância a baixas temperaturas (Baek et al. 2014), e sob tais condições ninfas podem eclodir, todavia o ciclo de desenvolvimento pode não ser completo, como em *Edessa mediatubunda* (Hemiptera: Pentatomidae) submetido à 15°C, no qual as ninfas sobreviveram até o segundo instar (Gonçalves et al. 2008). Efeitos negativos também são esperados quando submetidos a temperaturas próximas do limite máximo (Haddad et al. 1999). Em *Podisus distinctus* (Hemiptera: Pentatomidae) a duração ninfal diminuiu com o aumento da temperatura, mas 33°C foi letal para o inseto (Santos et al. 2004). Dessa forma, objetivou-se neste estudo investigar os efeitos de diferentes temperaturas no desenvolvimento de *P. nigrispinus* para otimizar a criação massal do percevejo predador.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Insetos

Os testes foram realizados no Laboratório de Entomologia Florestal do Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Sergipe (UFS), Sergipe, Brasil. Os insetos utilizados foram obtidos da criação mantida no laboratório com temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 9,5\%$ e fotoperíodo de 12h.

Adultos do percevejo predador *P. nigrispinus* são criados em gaiolas teladas de 60x40x40 cm, alimentados com pupas da presa alternativa *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) e a água é disponibilizada em algodão umedecido. As posturas depositadas pelas fêmeas nas gaiolas são coletadas com algodão no dia da oviposição e transferidas para placas de Petri (9,0 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) contendo algodão umedecido com água destilada. Após a eclosão, as ninfas permanecem nessas placas e são alimentadas com pupas de *T. molitor* até a fase adulta, quando são transferidas para as gaiolas.

4.2.2. Desenvolvimento de *Podisus nigrispinus* em diferentes temperaturas

Na primeira fase do experimento, massas de ovos de até 24 horas foram coletadas da criação massal e separadas por tratamento. Os tratamentos foram constituídos das temperaturas constantes 17, 21, 25 e 29°C com variação $\pm 0,2$; fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de $60 \pm 9,5\%$. Cada tratamento foi iniciado com 25 repetições, sendo cada repetição constituído de 20 ovos. Após a eclosão, as ninfas foram mantidas nas mesmas placas de Petri e alimentadas com pupas de *T. molitor*.

Na segunda fase, após término da fase ninfal, 20 casais de adultos recém-emergidos foram separados em caixa tipo gerbox e mantidos nas mesmas condições de temperaturas em que foram provenientes. Um algodão foi depositado na tampa dos gerbox a fim de manter a umidade e os adultos foram alimentados com pupas de *T. molitor*.

Nas duas fases do experimento foram realizadas observações diárias a fim de manter o fornecimento de água em níveis adequados, bem como realizar observações dos parâmetros avaliados que foram: (a) Duração da fase de ovo, ninfa e desenvolvimento total da fase ninfal; (b) sobrevivência em cada estágio ninfal e adultos recém-emergidos; (c) Longevidade de machos e fêmeas; (d) Número de ovos por fêmeas; (e) Período de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição; (f) Peso de machos e fêmeas recém-emergidos; (g) Comprimento e largura de insetos adulto.

4.2.3. Análise estatística

Todos os parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e em seguida à análise de regressão, sendo os modelos escolhidos de acordo com a significância dos coeficientes de regressão (t , $p < 0,05$) e pelo coeficiente de determinação (R^2). Na análise estatística utilizou-se o software SISVAR 5.0 (Ferreira 2014).

4.3. Resultados

Em geral, na duração dos estádios de desenvolvimento de *P. nigrispinus* percebeu-se que o tempo em cada estágio de ovo e ninfa aumenta com a diminuição da temperatura, este comportamento fica explícito através das regressões polinomiais do tipo quadrática, dada por parábolas negativas. Observa-se que a duração total do desenvolvimento de *P. nigrispinus* até atingir a fase adulta foi de $65,3 \pm 2,07$; $38,4 \pm 0,55$; $21,5 \pm 0,47$ e $17,4 \pm 0,34$ dias para as temperaturas de 17, 21, 25 e 29°C, respectivamente (Figura 1) (ANOVA, $p < 0,05$).

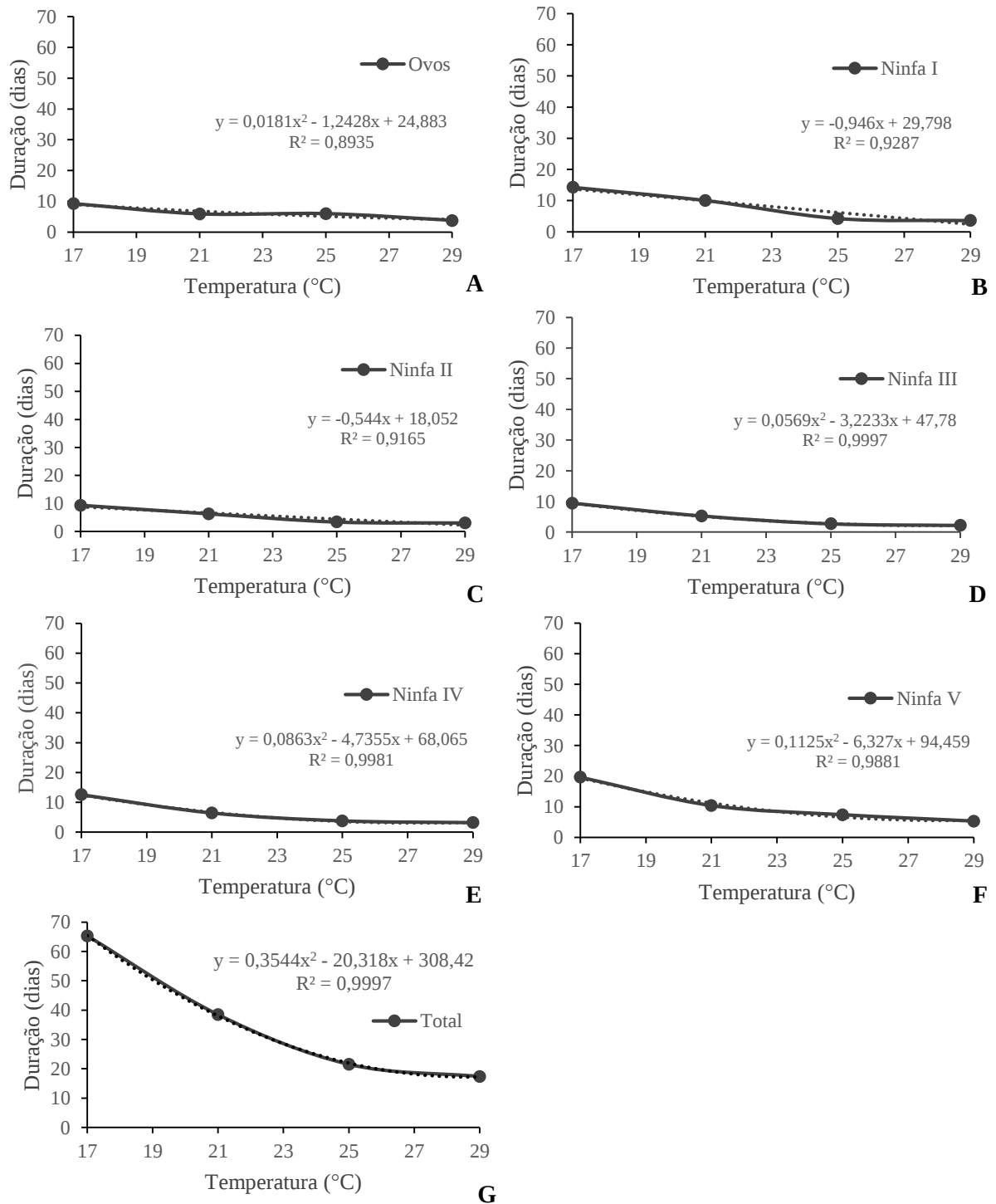


Figura 1. Duração (dias) da fase de ovo (A), de cada estágio ninfal (B, C, D, E e F) e desenvolvimento total da fase ninfal (G) de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae)

submetidos a temperaturas constantes (17, 21, 25 e 29± 0,2°C), umidade relativa de 60 ± 9,5%, fotoperíodo de 12hs e alimentados com *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae).

Na fase de ninfa e adultos observou-se que a sobrevivência de *P. nigrispinus* diminui nas temperaturas extremas (17°C e 29°C). Este comportamento fica evidente ao se avaliar as equações de regressões polinomiais do tipo quadrática, dada por parábolas positivas, exceto para a sobrevivência de ninfa no primeiro instar (Figura 1A). O ponto máximo, ou seja, a máxima sobrevivência, está localizado próximo à temperatura de 25°C (temperatura controle). No entanto, a sobrevivência durante a evolução de cada estágio de desenvolvimento tende a diminuir, já que no primeiro estágio ninfal foi de 75 a 90%, mas na fase adulta de 25 a 50% (Figura 2A e 2F) (ANOVA, $p < 0,05$).

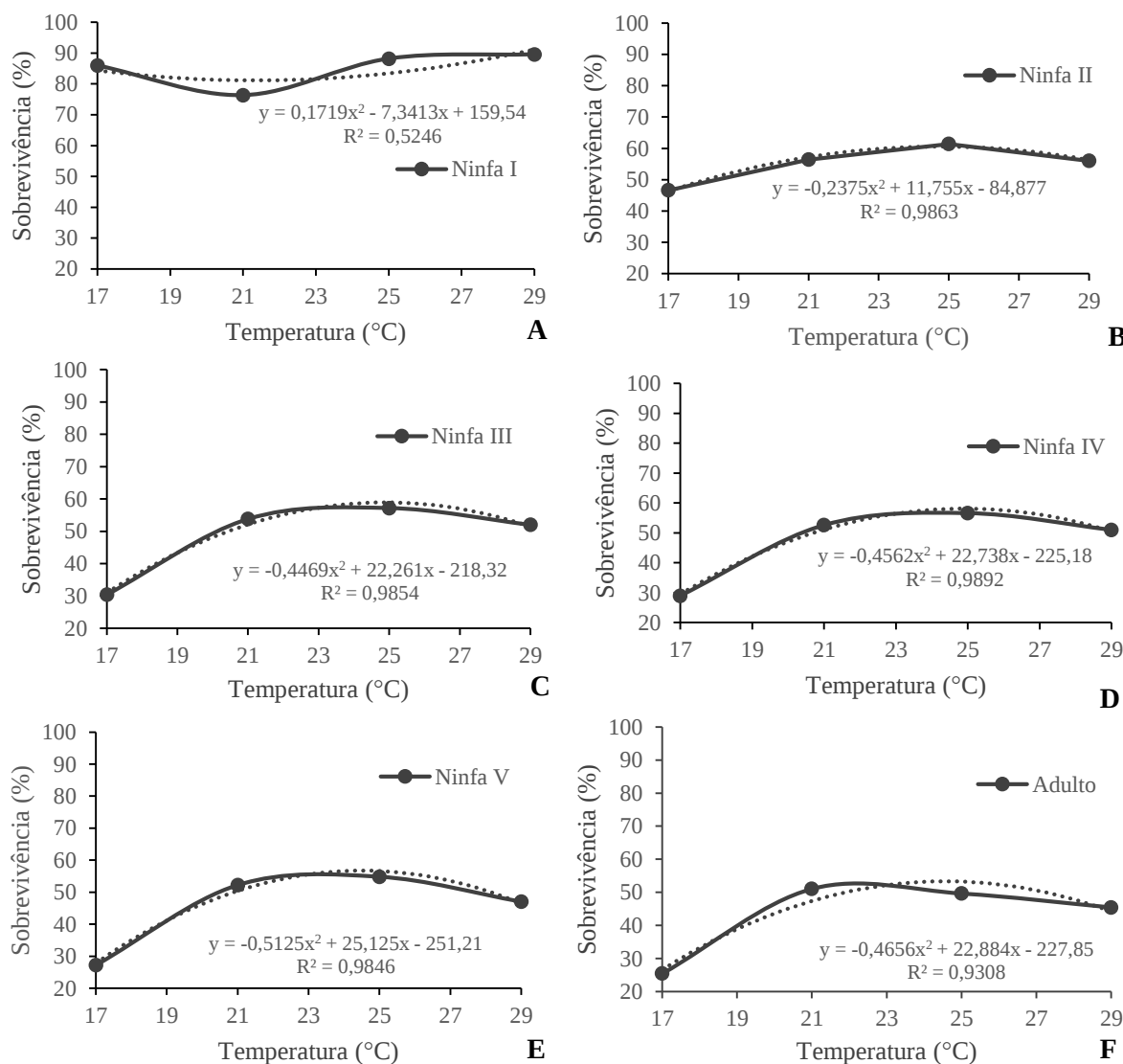


Figura 2. Sobrevivência (%) em cada estágio ninfal (A, B, C, D e E) e de adultos (F) de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) submetidos a temperaturas constantes (17, 21, 25 e 29± 0,2°C), umidade relativa de 60 ± 9,5%, fotoperíodo de 12hs e alimentados com *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae).

A longevidade de *P. nigrispinus*, tanto macho quanto fêmea, diminui à medida que a temperatura aumenta, e independente da temperatura, as fêmeas possuem menor longevidade em relação aos machos (Figura 3A). No número de ovos por fêmea, a temperatura de 17°C

proporcionou um baixo número de ovos por fêmea ($13,5 \pm 6,63$), e através de derivação, o ponto máximo, ou seja, a máxima produção de ovos ($208,10$) por fêmea em função da temperatura é a $24,38^\circ\text{C}$ (ANOVA, $p < 0,05$) (Figura 3B).

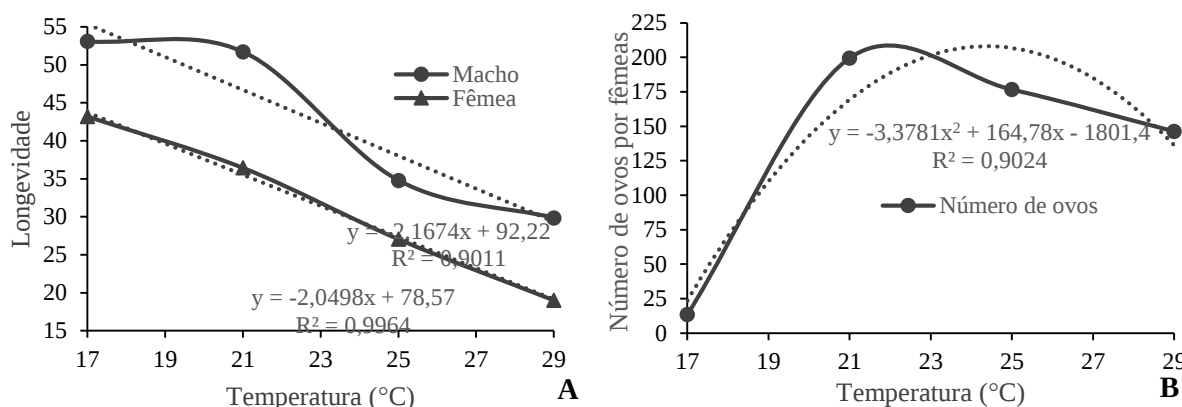


Figura 3. Longevidade (dias) de machos e fêmeas (A) e número de ovos por fêmeas (B) de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) submetidos a temperaturas constantes ($17, 21, 25$ e $29 \pm 0,2^\circ\text{C}$), umidade relativa de $60 \pm 9,5\%$, fotoperíodo de 12hs e alimentado com *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae).

O período de pré-oviposição de *P. nigrispinus* submetidos a diferentes temperaturas foi de $8,45 \pm 0,94$; $8,00 \pm 0,52$; $7,50 \pm 0,29$ dias para as temperaturas de $21, 25$, e 29°C , respectivamente, no entanto, para 17°C esse período foi de $27,6 \pm 0,94$ dias. O período de oviposição tende a diminuir com o aumento da temperatura, sendo $34,2 \pm 6,58$ dias para as fêmeas submetidas à 17°C e $10,1 \pm 1,92$ dias para 29°C . Quanto ao período de pós-oviposição, este também foi diminuindo com o aumento da temperatura, com $6,4 \pm 1,3$ dias para a temperatura de 17°C e $1,4 \pm 0,22$ dias para 29°C (ANOVA, $p < 0,05$) (Figura 4).

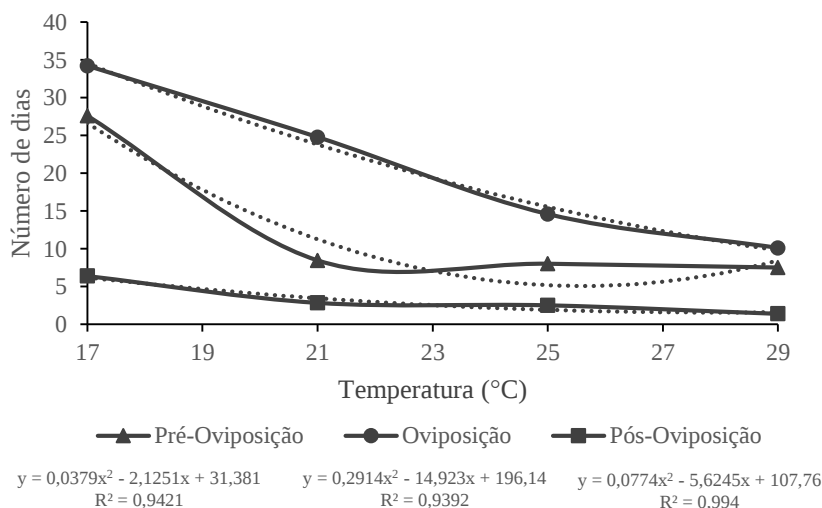


Figura 4. Período de Pré-oviposição, Oviposição e Pós-oviposição de fêmeas de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae), submetidos a temperaturas constantes ($17, 21, 25$ e $29 \pm 0,2^\circ\text{C}$) umidade relativa de $60 \pm 9,5\%$, fotoperíodo de 12hs e alimentado com *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae).

Nos insetos recém-emergidos de *P. nigrispinus* observou-se que as diferentes temperaturas afetam nos pesos de machos e fêmeas. O peso de machos de *P. nigrispinus* é maior com o aumento da temperatura, porém, as fêmeas nas temperaturas extremas (17 e

29°C) tendem a diminuir seu peso. Observou-se também que as fêmeas são em média 17,5 mg mais pesadas que os machos (ANOVA, $p < 0,05$) (Figura 5).

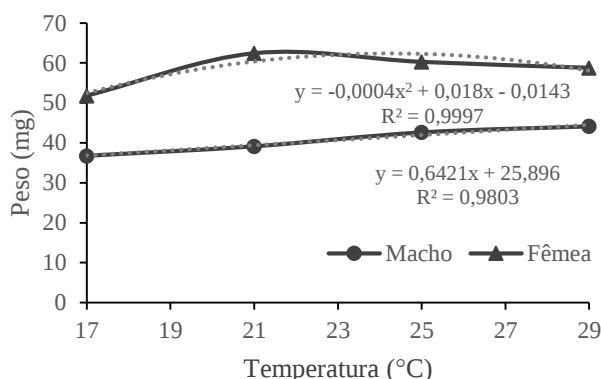


Figura 5. Peso (mg) de machos e fêmeas de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) recém-emergidos submetidas a temperaturas constantes (17, 21, 25 e $29 \pm 0,2^\circ\text{C}$), umidade relativa de $60 \pm 9,5\%$, fotoperíodo de 12hs e alimentado com *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae).

Nos adultos recém-emergidos de *P. nigrispinus* observou-se que as temperaturas afetam no comprimento e largura de machos e fêmeas. Verificou-se que o comprimento do inseto tende a aumentar com o aumento da temperatura, e que as fêmeas são em média 1,3mm maiores que os machos. Quanto a largura, observou-se que as temperaturas extremas (17 e 29°C) tendem a aumentar a largura dos insetos independente do sexo. Percebe-se ainda, que as fêmeas são 1,1 mm mais largas que os machos (ANOVA, $p < 0,05$) (Figura 6).

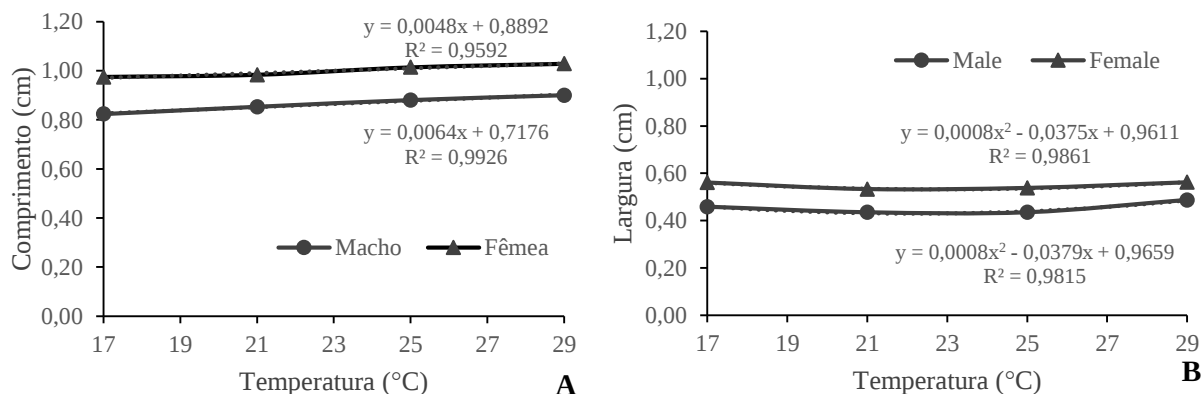


Figura 6. Comprimento (cm) (A) e largura (cm) (B) de machos e fêmeas de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) 24 hs de emergidos, submetidas a temperaturas constantes (17, 21, 25 e $29 \pm 0,2^\circ\text{C}$), umidade relativa de $60 \pm 9,5\%$, fotoperíodo de 12hs e alimentado com *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae).

4.4. Discussão

O período de desenvolvimento de vários percevejos aumenta com a diminuição da temperatura, até um certo limite, devido à redução das taxas metabólicas (Hodkova e Hodek 2004) comportamento observado em todas as fases do ciclo de vida de *P. nigrispinus*. Embora exista um *trade-off* na relação de retardamento do desenvolvimento com as características

biológicas do predador, esse tempo permite alongar o tempo de criação massal na ausência de insetos-praga no campo.

Temperaturas fora da faixa térmica do inseto devem ser evitadas (Baek et al. 2014), pois, embora o limiar inferior de *P. nigrispinus* seja de até 11,5°C (Didonet et al. 1995), temperaturas próximas a esse limite podem afetá-lo letalmente, mesmo quando apenas os ovos são submetidos à baixa temperatura, como verificado por Costa et al. (2016) em que a estocagem por mais de 10 dias a 13°C não permite ao percevejo completar seu ciclo, morrendo ainda na fase ninfal.

Na determinação das exigências térmicas de *P. nigrispinus* por Didonet et al. (1995), verificaram que, na fase de ovo menores, períodos embrionários foram apresentados na temperatura de 29°C, e maiores em temperaturas de 15°C. Resultados semelhantes foram alcançados neste trabalho, em que o desenvolvimento embrionário de *P. nigrispinus* a 17°C durou $9,28 \pm 0,55$ dias e $3,8 \pm 0,10$ dias a 29°C (Figura 1).

A temperatura ideal para alongamento do tempo de desenvolvimento ninfal de *P. nigrispinus* foi a de 17°C, pois o ciclo de desenvolvimento até a emergência de adultos foi de 3,0 e 3,7 vezes maiores do que na temperatura de 25 e 29°C (Figura 1). Em estudo do desenvolvimento de *P. distinctus* sobre efeito de temperaturas variando entre 17°C e 33°C, a tolerância e o alongamento das fases também foram verificados, em que o ciclo de vida até chegar a fase adulta de *P. distinctus* a 17°C foi 4,5 vezes maiores do que a 29°C (Santos et al. 2004).

O aumento no tempo de desenvolvimento causado pela redução nas taxas metabólicas faz com que os recursos energéticos do inseto sejam desviados para sobrevivência do mesmo (Vacari et al. 2014), isto foi observado claramente pela diminuição dos parâmetros como sobrevivência ninfal (Figura 2), peso de macho e fêmea recém-emergidos (Figura 5), tamanho dos insetos adultos (Figura 6) e oviposição (Figura 4). *Trade-off* semelhante foi constatado na estocagem de ovos de *P. nigrispinus* por (Vacari et al. 2014), em que insetos advindos de ovos estocados por 17 dias à 15°C tiveram o período ninfal, viabilidade ninfal e peso diminuídos.

A temperatura afeta o desenvolvimento (Baek et al. 2014; Poncio et al. 2016; Johnson et al. 2016) e reprodução de insetos (Scriber e Slansky Jr 1981), como observado na temperatura de 17°C que permitiu um acréscimo na longevidade de machos e fêmeas (Figura 3A), no entanto, esse acréscimo acarretou na redução do número total de ovos por fêmeas ($13,5 \pm 6,63$ ovos por fêmea) (Figura 3B) e no acasalamento. Constata-se, assim, que nesta temperatura, os gastos energéticos das fêmeas são concentrados na sobrevivência.

A temperatura também influenciou na reprodução de *P. nigrispinus*, em que a elevação da temperatura diminui o período de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição (Figura 4), resultados semelhantes aos estudos de (Medeiros et al. 2003) com *P. nigrispinus* alimentado com *Alabama argillacea* (Lepidoptera: Noctuidae) sob diferentes temperaturas. Período de pré e pós-oviposição mais curto, como observado nas temperaturas de 21, 25 e 29°C, indica que maior quantidade energética foi alocada para o período de oviposição (De Bortoli et al. 2011).

A fecundidade de *P. nigrispinus* reportada na literatura é alta à 25°C (Medeiros et al. 2003). No entanto, mesmo nos regimes térmicos ideais de desenvolvimento, a produção total de ovos por fêmeas do percevejo foi baixa ($199,4 \pm 35,69$ e $176,5 \pm 33,0$, respectivamente). Isto porque, fêmeas que acoplam isoladamente podem apresentar um intervalo mais longo de oviposição e diminuir a produção de ovos para até 200 ovos, indicando assim a escassez de espermatozoides (Torres e Zanuncio 2001). Porém, as que realizam o acoplamento múltiplo, ou seja, com vários machos, apresentam um número de ovos que pode variar entre 350 à 390 ovos (Oliveira et al. 2002, 2011, Espindula et al. 2010).

Insetos de *P. nigrispinus* até o quarto instar não apresentam diferenças de pesos entre machos e fêmeas, no entanto, a partir do quinto instar, as fêmeas passam a ser mais pesadas do que os machos (Oliveira et al. 2011), como constatado nas temperaturas desse estudo. O

peso de fêmeas maior que os machos é devido o acúmulo de biomassa que é necessário para a reprodução, e ainda por causa do desenvolvimento dos ovários e formação de ovos (Oliveira et al. 2002, 2011). Porém, menores pesos de machos e fêmeas em relação as demais temperaturas foram constatadas à 17°C, nesta temperatura os insetos apresentaram cerca de 9mg a menos do que nas demais temperaturas avaliadas.

O tamanho do corpo de *P. nigrispinus* pode estar relacionado com o peso, nas temperaturas mais altas o comprimento foi maior (Figura 6A), assim como o peso. Corroborando com (Davidowitz et al. 2003) que afirmam que o peso é um fator crítico e atua na determinação do tamanho corporal. Além disso, Wang et al. (2009) afirmam que indivíduos maiores tendem a apresentar maior massa corporal, maior longevidade e maior fecundidade.

Os resultados encontrados neste estudo demonstram o desenvolvimento de *P. nigrispinus* em função da temperatura e possui duas aplicações. Primeiro, a otimização da criação massal do predador, aumentando o sucesso da produção e redução dos custos mediante necessidade de inimigos naturais para liberação em campo (Didonet et al. 1995; Santos et al. 2004). Pois, baixas temperaturas permitem um alongamento do tempo de desenvolvimento de *P. nigrispinus*, por outro lado, temperaturas mais altas permitem um aceleração do desenvolvimento do inseto. E segundo, a facilitação no transporte de ovos do predador, pois ao contrário das ninfas, ovos não precisam ser alimentados (Baek et al. 2014) e à 17 °C podem ser armazenados por 9 dias sem perda significativas da viabilidade.

4.5. Conclusões

As temperaturas 17, 21, 25 e 29°C afetam o desenvolvimento de *Podisus nigrispinus*. As melhores condições de desenvolvimento para o predador são 21 e 25°C. Mas, otimização da criação massal do percevejo mediante necessidade de inimigos naturais pode ser conseguida na temperatura de 29°C. Esta afetou positivamente os parâmetros avaliados, exceto a largura do percevejo. Na ausência de insetos-praga em campo, o aumento do ciclo de *P. nigrispinus* pode ser conseguido à 17°C, porém, esta temperatura afeta adversamente a sobrevivência, número de ovos por fêmea, peso e tamanho do predador.

4.6. Referências Bibliográficas

- Arrese EL, Soulages JL (2010) Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annu Rev Entomol* 55:207–225. doi: 10.1146/annurev-ento-112408-085356
- Baek S, Son Y, Park Y-L (2014) Temperature-dependent development and survival of *Podisus maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae): implications for mass rearing and biological control. *J Pest Sci* 87:331–340. doi: 10.1007/s10340-013-0546-2
- Bottega DB, de Souza BHS, da Silva AG, Boiça Júnior AL (2014) Comportamento de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) na interação com lagartas de *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: noctuidae) e cultivares de soja com diferentes graus de resistência. *Rev. Agric.* 89:53–64.
- Colinet H, Hance T (2010) Interspecific variation in the response to low temperature storage in different aphid parasitoids. *Ann Appl Biol* 156:147–156. doi: 10.1111/j.1744-7348.2009.00374.x
- Costa VHD da, Soares MA, Assis Júnior SL de, et al (2016) Egg storage of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) predators at low temperatures. *Rev Árvore* 40:877–884. doi: 10.1590/0100-67622016000500011

- Couret J, Dotson E, Benedict MQ (2014) Temperature, Larval Diet, and Density Effects on Development Rate and Survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). PLoS ONE 9:1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0087468
- Davidowitz G, D'Amico LJ, Nijhout HF (2003) Critical weight in the development of insect body size. *Evol Dev* 5:188–197. doi:10.1046/j.1525-142X.2003.03026.x
- De Bortoli SA, Otuka AK, Vacari AM, et al (2011) Comparative biology and production costs of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) when fed different types of prey. *BioControl* 58:127–132. doi: 10.1016/j.biocontrol.2011.04.011
- Didonet J, Zanuncio JC, Sediyaama CS, Picanço MC (1995) Nymphal development of *Podisus nigrispinus* (Dallas) and *Supputius cincticeps* (Staal)(Heteroptera, Pentatomidae) at constant temperatures. *Rev Bras Zool* 12:513–518.
- Espindula MC, Zanuncio JC, Andrade GS, et al (2010) Desenvolvimento e reprodução de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) alimentado com lagartas de *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Idesia Arica* 28:17–24. doi: 10.4067/S0718-34292010000300003
- Ferreira DF (2014) Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciênc E Agrotecnologia* 38:109–112. doi:10.1590/S1413-70542014000200001
- Gonçalves L, Almeida FS, Mota F de M (2008) Efeitos da temperatura no desenvolvimento e reprodução de *Edessa meditabunda* (Fabricius, 1794) (Hemiptera: Pentatomidae). *Acta Biológica Parana* 37:111–121.
- Haddad ML, Parra JRP, Moraes RCB (1999). Métodos para estimar os limites térmicos inferior e superior de desenvolvimento de insetos. Piracicaba: FEALQ, 29p.
- Hodkova M, Hodek I (2004) Photoperiod, diapause and cold-hardiness. *Eur J Entomol* 101:445–458. doi:10.14411/eje.2004.064
- Inayat TP, Rana SA, Rana N, et al (2011) Predator-prey relationship among selected species in the croplands of central Punjab, Pakistan. *Pak J Agri Sci* 48:153–157.
- Johnson CA, Coutinho RM, Berlin E, et al (2016) Effects of temperature and resource variation on insect population dynamics: the bordered plant bug as a case study. *Funct Ecol* 30:1122–1131. doi: 10.1111/1365-2435.12583
- Kingsolver JG, Huey RB (2008) Size, temperature, and fitness: three rules. *Evol Ecol Res* 10:251–268.
- Košťál V, Yanagimoto M, Bastl J (2006) Chilling-injury and disturbance of ion homeostasis in the coxal muscle of the tropical cockroach (*Nauphoeta cinerea*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 143:171–179. doi: 10.1016/j.cbpb.2005.11.005
- Liu S-S, Zhang G-M, Zhu JUN (1995) Influence of temperature variations on rate of development in insects: analysis of case studies from entomological literature. *Ann Entomol Soc Am* 88:107–119. doi:10.1093/aesa/88.2.107
- Medeiros RS, Ramalho FS, Serrão JE, Zanuncio JC (2003) Temperature influence on the reproduction of *Podisus nigrispinus*, a predator of the noctuid larva *Alabama argillacea*. *BioControl* 48:695–704. doi: 10.1023/A:1026395729902
- Neto M, da Costa F, Zanuncio JC, et al (2002) Nymphal development of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera, Pentatomidae) preying on larvae of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera,

- Noctuidae) fed with resistant and susceptible soybeans. *Rev Bras Entomol* 46:237–241.doi: 10.1590/S0085-56262002000300002
- Neves RC dos S, Torres JB, Zanuncio JC (2010) Production and storage of mealworm beetle as prey for predatory stinkbug. *Biocontrol Sci Technol* 20:1013–1025. doi: 10.1080/09583157.2010.500718
- Oliveira HN de, Espindula MC, Duarte MM, et al (2011) Development and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fed with *Thyriniteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) reared on guava leaves. *Braz Arch Biol Technol* 54:429–434.doi: 10.1590/S1516-89132011000300001
- Oliveira JE, Torres JB, Carrano-Moreira AF, Barros R (2002) Efeito das plantas do algodoeiro e do tomateiro, como complemento alimentar, no desenvolvimento e na reprodução do predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotrop Entomol* 31:101–108.
- Poncio S, Dequech STB, Bolzan A, et al (2016) Effect of temperature on immatures of *Stiretrus decastigmus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Braz J Biol* 76:495–499. doi: 10.1590/1519-6984.21914
- Santos GP, Zanuncio TV, Ribeiro GT, et al (2004) Influência da temperatura no desenvolvimento ninfal de *Podisus distinctus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *Cerne* 10:213–221.
- Scriber JM, Slansky Jr F (1981) The nutritional ecology of immature insects. *Annu Rev Entomol* 26:183–211.doi: 10.1146/annurev.en.26.010181.001151
- Silva RJ, Cividanes FJ, Pedroso EC, et al (2013) Effect of Low-Temperature Storage on *Diaeretiella rapae* (McIntosh) (Hymenoptera: Braconidae). *Neotrop Entomol* 42:527–533. doi: 10.1007/s13744-013-0148-y
- Torres JB, Zanuncio JC (2001) Effects of sequential mating by males on reproductive output of the stinkbug predator, *Podisus nigrispinus*. *BioControl* 46:469–480.doi: 10.1023/A:1014175507239
- Torres JB, Evangelista Jr W., Barros R, Guedes RNC (2002) Dispersal of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) nymphs preying on tomato leafminer: Effect of predator release time, density and satiation level. *J Appl Entomol* 126:326–332.10.1046/j.1439-0418.2002.00653.x
- Vacari AM, Goulart RM, Volpe HXL, De Bortoli SA (2014) Effect of Egg Rearing Temperature and Storage Time on the Biological Characteristics of the Predatory Stink Bug *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Ann Entomol Soc Am* 107:178–183. doi: 10.1603/AN13027
- Wang X-G, Johnson MW, Daane KM, Yokoyama VY (2009) Larger olive fruit size reduces the efficiency of *Psytalia concolor*, as a parasitoid of the olive fruit fly. *Biol Control* 49:45–51. doi: 10.1016/j.biocontrol.2009.01.004
- Zanuncio JC, Molina-Rugama AJ, Santos GP, Ramalho F de S (2002) Effect of body weight on fecundity and longevity of the stinkbug predator *Podisus rostralis*. *Pesqui Agropecuária Bras* 37:1225–1230.doi:10.1590/S0100-204X2002000900004

5. CAPÍTULO 2

DECORIONIZAÇÃO E PERMEABILIZAÇÃO DE OVOS DE *Podisus nigrispinus* (DALLAS, 1851) (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE): FATORES LIMITANTES PARA A CRIOPRESERVAÇÃO

RESUMO

Protocolos de criopreservação estão desenvolvidos para Diptera, Lepidoptera e Hymenoptera, no entanto, para Heteroptera como *Podisus nigrispinus* Dallas, 1851 (Pentatomidae) nada está descrito. Objetivou-se neste estudo avaliar os processos de decorionização e permeabilização na viabilidade de ovos de *P. nigrispinus* com diferentes idades embrionárias. Em laboratório, embriões de 24, 48, 72 e 96 horas de idade foram submetidos a soluções químicas (Hidróxido de sódio, Hipoclorito de sódio, Isopropil e Hexano) para decorionização e permeabilização. O experimento foi realizado em esquema fatorial 4x8. Embriões com 96 horas de idade apresentaram maiores viabilidades comparados aos de 24, 48 e 72 horas. Observações em microscópio de luz revelaram diferenças na espessura do córion após tratamentos com soluções químicas. Estas soluções para decorionização e permeabilização de ovos de *P. nigrispinus*, juntamente com a idade embrionária, afetam as viabilidades de embriões a serem criopreservados.

Palavras-chave: Percevejo-Predador, Embrião, Vitrificação.

ABSTRACT

Dechoriation and permeabilization of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) eggs: Limiting factors for criopreservation

Cryopreservation protocols have been developed for Diptera, Lepdoptero and Hymenoptera; however, for Heteroptera, such as *Podisus nigrispinus* Dallas, 1851 (Pentatomidae) no procedures have been described yet. The objective of this study was to evaluate the processes of dechoriation and permeabilization in the viability of eggs of *P. nigrispinus* with different embryonic ages. In the laboratory, embryos of 24, 48, 72 and 96 hours of age were subjected to chemical solutions (Sodium Hydroxide, Sodium Hypochlorite, Isopropyl and Hexane) for dechoriation and permeabilization. The experiment was carried out in a 4x8 factorial scheme. 96-hour-old embryos presented greater viability when compared with 24, 48 and 72-hour-old embryos. Observations under a light microscope revealed differences in the chorion thickness after treatments with chemical solutions. These solutions for dechoriation and permeabilization of *P. nigrispinus* eggs together with embryonic age affect the viability of embryos to be cryopreserved.

Key-words: Stinkbug-Predator, Embryo, Vitrification.

5.1. Introdução

Podisus nigrispinus (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae) é um percevejo encontrado no Brasil em culturas florestais, como eucalipto; e agrícolas, como algodão, tomate e soja (Neto et al. 2002, Oliveira et al. 2002, Zanuncio et al. 2002). Estima-se que esse predador possui habilidade em predação cerca de 30 espécies de insetos-praga de importância econômica (Torres 2006, Rodrigues et al. 2008, Oliveira et al. 2011, Menezes et al. 2012) e por isso, tem sido criado massalmente em laboratório e liberado em programas de controle biológico (Menezes et al. 2012).

Um dos desafios para comercialização e uso de inimigos naturais, como *P. nigrispinus*, em programas de Manejo Integrado de Pragas, é o custo de criação massal (De Bortoli et al. 2011, Menezes et al. 2012). Um outro fator que interfere nestes programas de manejo é a falta de sincronia do calendário de produção do predador com o surto de pragas no campo, pois a maioria dos agentes de controle biológico têm ciclo de vida relativamente curto, sendo necessário serem produzidos pouco antes de sua utilização, o que indica a necessidade de técnicas de armazenamento desses agentes (Colinet e Hance 2010).

Dentre as técnicas de armazenamento, a criopreservação tem sido abundantemente utilizada na conservação de muitos materiais biológicos, tais como espermatozoides (Nascimento et al. 2015), óvulo e embriões de animais (Konc et al. 2014, Tsai e Lin 2012), tecidos vegetais e sementes (Pukacki e Juszczak 2015). E nas últimas duas décadas, utilizadas em embriões de insetos das ordens de Diptera, Lepidoptera e Hymenoptera (Leopold e Rinehart 2010).

O processo de criopreservação de insetos envolve algumas etapas, como definição do estágio de desenvolvimento, decorionização dos ovos, remoção da água superficial, permeabilização com soluções alcalinas, proteção dos embriões com agentes crioprotetores, desidratação e finalmente imersão em nitrogênio líquido (Cosi et al. 2010, Leopold e Rinehart 2010). Sendo o estágio de desenvolvimento embrionário e o córion as principais barreiras que dificultam a criopreservação de insetos por vitrificação (Nelson e Leopold 2003, Rajamohan e Leopold 2007). Por exemplo, a seleção adequada do estágio de desenvolvimento embrionário determinou o sucesso da criopreservação do inseto modelo *Drosophila* spp. (Landi et al. 2015).

A espessura do córion varia entre insetos, esse é um complexo de várias camadas. De forma simplificada, as camadas são o exocóron, endocóron, camada cerosa e membrana vitelina (Klowden 2007). A camada cerosa, identificada em insetos como hemípteros, dípteros e lepidópteros (Beament 1946, Margaritis 1985), juntamente com a membrana vitelina, são os principais obstáculos ao fluxo de água e outros materiais dentro e fora do ovo (Wang et al. 2000, Woods 2005, Così et al. 2010).

A barreira coriônica à permeabilização foi vencida em estudos com díptero e lepidópteros utilizando substâncias como hidróxido de sódio, hipoclorito de sódio, alcanos como hexano, heptano e octano, e álcoois como isopropil (Steponkus et al. 1990, Roversi et al. 2008, Rajamohan et al. 2013, 2014). Mas, devido a variações nas características do ovo e embriões de insetos, faz com que haja necessidade de padronização de um protocolo para cada espécie e nenhum protocolo está descrito para embriões de *P. nigrispinus*. Assim, propomos avaliar os processos de decorionização e permeabilização na viabilidade de ovos de *P. nigrispinus* com diferentes idades embrionárias.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Insetos

Os testes foram realizados no Laboratório de Entomologia Florestal do Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Sergipe (UFS), Sergipe, Brasil. Os insetos utilizados foram obtidos da criação mantida no laboratório com temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12h.

Adultos do percevejo predador *P. nigrispinus* são criados em gaiolas teladas de 60x40x40 cm, alimentados com pupas da presa alternativa *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) e a água é disponibilizada em algodão umedecido. As posturas depositadas pelas fêmeas nas gaiolas são coletadas com algodão no dia da oviposição e transferidas para placas de Petri (9,0 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) contendo algodão umedecido com água destilada. Após a eclosão, as ninfas permanecem nessas placas e são alimentadas com pupas de *T. molitor* até a fase adulta, quando são transferidas para as gaiolas.

5.2.2. Decorionização e Permeabilização

O ensaio para a decorionização e permeabilização do córion de *P. nigrispinus* e da camada cerosa foi realizado com modificações no protocolo de Berkebile et al. (2000). Os procedimentos para decorionização e permeabilização constituíram-se nas seguintes etapas: (1) Os ovos foram agitados com auxílio de uma pipeta de Pasteur em uma solução de hidróxido de sódio à 1% (HD) por 5 min. Este procedimento foi seguido por uma tríplice lavagem com água destilada esterilizada por 1 min cada. (2) Os ovos foram imersos em uma solução de hipoclorito de sódio 1,5% (HP) para remover o córion. Os ovos foram agitados por 1 min com auxílio de uma pipeta de Pasteur e enxaguados com água destilada por 2 min. (3) Para remover a superfície de água, os ovos foram transferidos para uma membrana de filtro onde foram imersos em álcool isopropil (IS) por 15 segundos e secos ao ar. (4) Quando secos, para remover a camada cerosa que recobre o embrião, os ovos foram imersos em hexano (HX) por 15 segundos e secos ao ar.

Antes da imersão nas soluções, massas de ovos de 24, 48, 72 e 96 horas foram coletadas e depositadas em placas de Petri (7 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) as quais foram adicionadas em 30ml de cada solução química. A cada solução utilizada, 100 ovos eram distribuídos no mesmo número de placas de Petri (quatro) e para verificar a toxicidade de cada solução, ovos foram submetidos nas soluções isoladamente pelos mesmos tempos descritos acima.

Após receberem os tratamentos, os embriões foram incubados em placas de Petri, contendo algodão umedecido a fim de manter a umidade ($60 \pm 10\%$) e vedadas com plástico filme até a eclosão. Observações diárias foram realizadas, a fim de manter o fornecimento de

água em níveis adequados, bem como verificar a viabilidade dos ovos, obtidos pela relação entre a quantidade de ovos em cada tratamento e a quantidade de ninfas eclodidas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4x8, sendo quatro idades embrionárias (24, 48, 72 e 96) e oito soluções [Controle (ovos sem tratamento); HD; HP; IS; HX; HD+HP; HD+HP+IS; HD+HP+IS+HX], cada tratamento possuiu quatro repetições de 25 ovos cada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P<0,05$). A análise estatística foi realizada no software SISVAR 5.0 (Ferreira 2014).

5.2.3. Histologia

Para confirmar a decorionização e permeabilização dos ovos, amostras foram encaminhadas ao laboratório de ultra estrutura celular da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde cortes histológicos foram realizados a fim de mensurar as possíveis diferenças na espessura do córion. De cada idade embrionária, 20 ovos de *P. nigrispinus* foram transferidos para a solução fixadora Zamboni's (Stefanini et al. 1967), desidratados em uma série graduada de álcool (70, 80, 90 e 95%), por 10 min cada, e embebidos em uma solução de historesina (Leica JB-4). Laminas de 3 μ m, obtidas usando um micrótomo foram coradas com hematoxilina e eosina e analisada em microscópio de luz.

O comprimento do córion de ovos de *P. nigrispinus* foi quantificado com auxílio do software ImagePro-Plus, versão 4.5.1.29 (MediaCybernetics). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P<0,05$) utilizando o software SISVAR 5.0 (Ferreira 2014).

5.3. Resultados

5.3.1. Decorionização e Permeabilização

Nas soluções químicas utilizadas para decorionização e permeabilização dos ovos, observou-se que o hipoclorito de sódio (HP), álcool isopropil (IS), e hexano (HX) não afetaram a viabilidade dos embriões, pois não diferem estatisticamente do controle. No entanto, o hidróxido de sódio (HD) reduziu a viabilidade dos embriões em $27,5 \pm 6,6\%$; $22,5 \pm 7,5\%$; $27,5 \pm 4,7\%$ e $51,25 \pm 11,4\%$ em todas idades embrionárias (24, 48, 72 e 96 horas, respectivamente) ($F= 4,62$; $df= 3, 3$; $p=0,097$, ANOVA) (Tabela 1).

Do mesmo modo, a viabilidade dos embriões foi diminuída em cada etapa da decorionização e permeabilização quando o hipoclorito de sódio foi adicionado ao hidróxido de sódio (HD+HP), bem como, quando adicionou o álcool isopropil (HD+HP+IS) e quando adicionou a solução alcana, Hexano (HD+HP+IS+HX) nas idades de 24, 48 e 72 horas (Tabela 1).

Comparando as idades embrionárias de ovos de *P. nigrispinus*, houve um decréscimo na viabilidade dos embriões nos ovos com idades de 24, 48 e 72 horas quando submetidos às sequências das soluções químicas (HD+HP, HD+HP+IS, HD+HP+IS+HX), entretanto foi alta a viabilidade de ovos com 96 horas ($90,0 \pm 3,5$; $92,5 \pm 2,5$ e $75,0 \pm 6,4\%$, respectivamente) ($F= 4,47$; $df= 7, 3$; $p= 0,01$, ANOVA) (Tabela 1).

Tabela 1: Viabilidade ($\% \pm \text{SE}$) de ovos de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) com diferentes idades embrionárias (24, 48, 72 e 96 horas) após aplicação de soluções químicas para retirada e permeabilização do corion. Controle (ovos sem tratamento), Hidróxido de sódio (HD), Hipoclorito de sódio (HP), Álcool isopropil (IS), Hexano (HX), HD+HP, HD+HP+IS, HD+HP+IS+HX.

Tratamentos	Idade (Horas)			
	24	48	72	96
Controle	87,5 $\pm$ 5,2Aa	80,0 $\pm$ 9,5Aa	80,0 $\pm$ 9,5Aa	78,7 $\pm$ 11,7Aab
NaOH (HD)	27,5 $\pm$ 6,6Bb	22,5 $\pm$ 7,5Bb	27,5 $\pm$ 4,7Bab	51,2 $\pm$ 11,4Ab
NaClO (HP)	82,5 $\pm$ 5,1Aa	76,2 $\pm$ 2,3Aa	87,5 $\pm$ 3,2Aa	76,2 $\pm$ 6,2Aab
Isopropil (IS)	77,5 $\pm$ 7,1Aa	91,2 $\pm$ 5,1Aa	87,5 $\pm$ 3,2Aa	85,0 $\pm$ 3,5Aa
Hexano (HX)	87,5 $\pm$ 2,0Aa	87,5 $\pm$ 3,2Aa	85,0 $\pm$ 4,5Aa	77,5 $\pm$ 3,2Aab
HD+HP	13,75 $\pm$ 4,2Bb	13,7 $\pm$ 4,2Bb	12,5 $\pm$ 3,2Bc	90,0 $\pm$ 3,5Aa
HD+HP+IS	12,5 $\pm$ 5,9Bb	13,7 $\pm$ 6,2Bb	8,75 $\pm$ 2,3Bc	92,5 $\pm$ 2,5Aa
HD+HP+IS+HX	13,75 $\pm$ 4,7Cb	20,0 $\pm$ 9,3Cb	46,2 $\pm$ 5,1Bb	75,0 $\pm$ 6,4Aab
CV (%)	21,64			

Médias seguidas de mesmas letras maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não difere entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.3.2 Histologia

A microscopia de luz do córion de *P. nigrispinus* submetidos aos tratamentos de decorionização e permeabilização evidencia diferenças entre as espessuras no córion de *P. nigrispinus*, sendo mais evidentes na camada mais externa, o exocóron. Verificou-se a ausência dos espinhos, estruturas comumente constatadas nos ovos não tratados. Mudanças nas colorações nos ovos foram observadas após o tratamento com as soluções químicas, essas assumiram uma coloração pérola após o tratamento e podem estar relacionadas à ausência do exocóron (Figura 1).

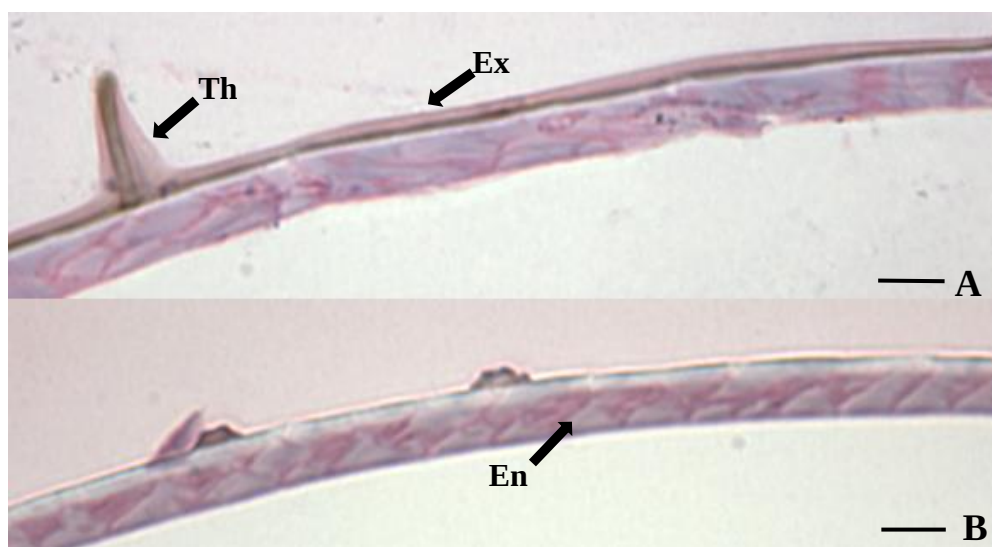


Figura 1: Secções histológicas do córion de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) com 48 horas de idade embrionária, controle (ovos sem tratamento) (A) e com soluções químicas (HD+HP+IS+HX) para decorionização/permeabilização (B). Barra= 6 μ . Exocóron (Ex), Endocóron (En) e espinhos (Th).

Nos cortes histológicos de *P. nigrispinus* a espessura do córion foi de $7,54 \pm 0,33\mu\text{m}$ e após tratamento químico reduziu-se para $5,11 \pm 0,30\mu\text{m}$ ($F=48,35$; $df= 1, 49$; $p<0,01$, ANOVA) (Tabela 2). A camada mais externa do córion, o exocóron, foi reduzida de $1,73 \pm 0,09\mu\text{m}$ para $0,46 \pm 0,03\mu\text{m}$ após o tratamento ($F=161,46$; $df= 1, 49$; $p<0,01$, ANOVA) e, verificou-se também que as soluções químicas antes de decorionizar o exocóron atuaram também na camada mais interna, o endocóron, reduzindo de $5,80 \pm 0,25\mu\text{m}$ para $4,64 \pm 0,10\mu\text{m}$ ($F=18,39$; $df= 1, 49$; $p<0,01$, ANOVA) (Tabela 2).

Tabela 2: Espessura (μm) do córion de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) com 48 horas de idade embrionária após tratamento com soluções químicas (HD+HP+IS+HX) para decorionização/permeabilização.

	Corion	Exocorion	Endocorion
Controle	$7,54 \pm 0,33a$	$1,73 \pm 0,09a$	$5,80 \pm 0,25^a$
Decorionizado/Permeabilizado	$5,11 \pm 0,30b$	$0,46 \pm 0,03b$	$4,64 \pm 0,10b$
CV%	27.60		

Médias seguidas de mesmas letras minúscula nas colunas não difere entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.4. Discussão

As barreiras de proteção contra desidratação apresentados pelos ovos de insetos são o corion e a membrana vitelina (Wang et al. 2000). Estas barreiras fazem com que cada espécie a ser criopreservada necessite de um protocolo (Leopold et al. 2001). Para que a criopreservação de embriões de insetos seja bem sucedida é necessário promover o efluxo de água e o influxo dos crioprotetores pela membrana vitelina antes do congelamento em nitrogênio líquido (Leopold e Rinehart 2010), para isto, dois obstáculos devem ser vencidos. Um é a determinação das soluções e concentrações adequadas para a decorionização e permeabilização do córion. A outra limitação é a determinação da fase embrionária mais adequada para a qual a permeabilização possa ser realizada e que garanta a sobrevivência adequada dos embriões (Berkebile et al. 2000).

Os ovos *P. nigrispinus* possuem uma camada mais espessa de córion que em *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) (Mazur et al. 1992), *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) (Wang et al. 2000), *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) (Rajamohan et al. 2013), *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) (Roversi et al. 2008) e outros insetos que já foram criopreservados. Contudo, os embriões deste Heteroptera foram muito sensíveis aos tratamentos de decorionização e permeabilização usualmente empregados em dípteros e lepidópteros, pois baixas percentagens de viabilidade dos ovos foram obtidas após aos tratamentos.

Em *Drosophila*, o hidróxido de sódio foi utilizado para separar as massas de ovos alcançando o objetivo (Mazur et al. 1992), no entanto, em ovos de *P. nigrispinus* esta substância causou uma reação que teve como consequência a redução da viabilidade dos embriões após 24 horas da aplicação. A viabilidade foi reduzida de $87,5 \pm 5,2$ para $27,5 \pm 6,6\%$; viabilidade ainda menor foi observado quando os embriões foram submetidos a todos os procedimentos para decorionização e permeabilização. Em microscópio estereoscópio binocular, nenhuma alteração na estrutura do córion, como pelos e aeromicropilares, foi observada após o tratamento.

Em estudos com embriões de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), o índice de sobrevivência foi considerado satisfatória após o tratamento com hidróxido de sódio, hipoclorito de sódio e isopropil, mas baixa quando os embriões foram expostos a hexano (Berkebile et al. 2000). Em *Anopheles gambiae* (Diptera), todos os embriões foram mortos quando submetidos à decorionização com 50% de Clorox (hipoclorito de sódio 1,5%) por 3 minutos de exposição (Valencia et al. 1996). Já Wang et al. (2000) mostraram que o

hexano permeia com facilidade a membrana vitelina de *M. domestica* e, combinado com o álcool isopropil, aumenta a sobrevivência de embriões. O tempo padrão de uso do hexano e do álcool isopropil em protocolo de Dípteros é de 20 a 30 segundos, no entanto, nos ovos de *P. nigrispinus*, tempos superiores a 15 segundos apresentaram um efeito deletério aos embriões, possivelmente devido aos danos nos embriões como afirmado por Rajamohan et al. (2014) em *L. sericata*.

A idade do embrião de *P. nigrispinus* mais tolerante aos tratamentos para decorionização foi de 96 horas. No entanto, nestas idades, os embriões de *P. nigrispinus* já se encontram no final do seu desenvolvimento, em que é possível discriminar os olhos compostos, pois o ovo assume uma coloração avermelhada e o córion uma coloração translúcida, como verificado por De Sá et al. (2013) para *P. distinctus*. Em estudos com *C. hominivorax*, verificou-se também que os estágios mais avançados de desenvolvimento são menos afetados pelos tratamentos de decorionização e permeabilização, no entanto, os embriões foram rejeitados porque o desenvolvimento estava demasiadamente avançado para permitir a permeabilização adequada dos crioprotetores (Berkebile et al. 2000).

Embriões de *Drosophila* com 12 horas de idade foram tratados antes da criopreservação com heptano, 1-isobutil para permeabilização e a taxa de eclosão foi de 80%. Nessa idade embrionária (12 horas) são encontradas cerca de 50.000 células, entretanto o mesmo tratamento foi deletério para embriões de 3 horas (Mazur et al. 1992). Já em *G. mellonella*, tratamentos para decorionização/permeabilização devem acontecer com embriões de até 35 horas de idade, sendo então criopreservados com sucesso. Após essa idade (35 horas), a cutícula cerosa, que impede a permeabilização, começa a ser formada (Roversi et al. 2008). Tratamentos em embriões com a cutícula cerosa passam a ser ineficientes no final do estágio de desenvolvimento (Leopold e Rinehart 2010).

Observações ao microscópio óptico feitas após os tratamentos evidenciaram que o córion de embriões de *P. nigrispinus* permaneceu praticamente intacto, a decorionização com hipoclorito de sódio por 1 min e reduziu o córion de $7,54 \pm 0,33\mu\text{m}$ para $5,11 \pm 0,30\mu\text{m}$. Existem diferenças entre ovos de insetos, como tamanho, composição química e espessura (Luo et al. 2006). A espessura do córion de *Drosophila* spp. é de $<1\mu\text{m}$ (Margaritis, 1985), e consequentemente, os procedimentos de decorionização e permeabilização aplicados a *Drosophila* spp. não são eficientes quando aplicados a outros insetos, mesmo que dentro da mesma ordem (Luo et al. 2006). Isto ocorre devido variações nas características dos embriões, como volume do embrião, taxa de desenvolvimento embrionário, espessura de córion e membrana vitelina, composição da superfície de cera e quantidade de vitelo (Nelson e Leopold 2003, Rajamohan e Leopold 2007).

O córion de *P. nigrispinus* é resistente à dissolução, semelhante ao observado por Rajamohan et al. (2013) em *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae), mas ovos deste Lepidoptera apresentaram-se permeáveis aos solventes, e apesar da presença do córion, o efluxo de água e o influxo de soluções crioprotetoras foi possível.

Quando o hipoclorito de sódio foi estendido por mais tempo ou maiores concentrações, a mortalidade foi superior à 90% para embriões jovens. Dessa forma, em *P. nigrispinus* a espessura do córion funciona como o principal obstáculo a permeabilização, pois após os tratamentos com hipoclorito de sódio e hexano apenas o exocóron foi removido. No entanto, assim como em *P. gossypiella* (Rajamohan et al. 2013), acredita-se que o gás do hipoclorito de sódio também atinja o embrião devido a diminuição da viabilidade dos embriões após tratamentos em conjunto (HD+HP; HD+HP+IS; HD+HP+IS+HX).

5.5. Conclusões

Portanto, o uso de soluções químicas para decorionização e permeabilização de ovos de *P. nigrispinus*, juntamente com a idade embrionária, afeta a viabilidades de embriões a serem criopreservados. O hidróxido de sódio afeta a viabilidade dos embriões e a melhor idade para criopreservar se encontra antes das 96 horas, embora a viabilidade ainda seja

significativamente baixa. Uma adequação metodológica deve ser realizada, já que a existente ainda é inviável para se passar ao próximo passo que é a vitrificação.

5.6. Referências Bibliográficas

- Beament, J. W. 1946.** Waterproofing mechanism of an Insect egg. *Nature*. 157: 320.
- Berkebile, D. R., J. Chirico, and R. A. Leopold. 2000.** Permeabilization of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) Embryos. *J. Med. Entomol.* 37: 968–972.
- Colinet, H., and T. Hance. 2010.** Interspecific variation in the response to low temperature storage in different aphid parasitoids. *Ann. Appl. Biol.* 156: 147–156.
- Cosi, E., M. T. Abidalla, and P. F. Roversi. 2010.** The effect of Tween 80 on eggshell permeabilization in *Galleria mellonella* (L.)(Lepidoptera, Pyralidae). *CryoLetters*. 31: 291–300.
- De Bortoli, S. A., A. K. Otuka, A. M. Vacari, M. I. E. G. Martins, and H. X. L. Volpe. 2011.** Comparative biology and production costs of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) when fed different types of prey. *Biol. Control*. 58: 127–132.
- De Sá, V. G. M., J. C. Zanuncio, M. A. Soares, C. S. Rosa, and J. E. Serrão. 2013.** Morphology and Postdepositional Dynamics of Eggs of the Predator *Podisus distinctus* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae: Asopinae). *Zootaxa*. 3641: 282.
- Ferreira, D. F. 2014.** Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciênc. E Agrotecnologia*. 38: 109–112.
- Klowden, M. J. 2007.** Physiological systems in insects, 2nd ed. Elsevier/Academic Press, Amsterdam ; Boston.
- Konc J, K. Kanyó, R. Kriston, B. Somoskői, and S. Cseh. 2014.** Cryopreservation of Embryos and Oocytes in Human Assisted Reproduction. *BioMed Res. Int.* 2014, 1–9.
- Landi, S., E. Gargani, F. Paoli, S. Simoni, and P. F. Roversi. 2015.** Morphological Markers for Cryopreservation in the Embryonic Development of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *J. Econ. Entomol.* 108: 1875–1883.
- Leopold, R. A., and J. P. Rinehart. 2010.** A template for insect cryopreservation. *Low Temp. Biol. Insects*. 325–341.
- Leopold, R. A., W. B. Wang, D. R. Berkebile, and T. P. Freeman. 2001.** Cryopreservation of Embryos of the New World Screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94: 695–701.
- Luo, L., Y. Pang, Q. Chen, and G. Li. 2006.** Cryopreservation of the late stage embryos of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *CryoLetters*. 27: 341–352.
- Margaritis, L.H. 1985.** Structure and physiology of the egg-shell. In L.I. Gilbert and G.A. Kerkut (eds): *Comprehensive Insect Biochemistry, Physiology and Pharmacology*. Vol. 1. New York: Pergamon Press, p.153- 230.

- Mazur, P., K. W. Cole, J. W. Hall, P. D. Schreuders, and A. P. Mahowald. 1992.** Cryobiological preservation of *Drosophila* embryos. *Sci.-N. Y. Then Wash.-.* 258: 1932–1932.
- Menezes, C. W. G., J. B. Santos, S. L. Assis Júnior, A. J. Fonseca, A. C. França, M. A. Soares, and A. F. Fernandes. 2012.** Selectivity of atrazin and nicosulfurom to *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Planta Daninha*. 30: 327–334.
- Nascimento, J. N., H. Blume, F. J. G. Oliveira, and R. A. Oliveira. 2015.** Utilização de diferentes diluentes na criopreservação de espermatozoides de garanhões manga larga marchado. *Ciênc. Anim. Bras*. 16: 324–330.
- Nelson, D. R., and R. A. Leopold. 2003.** Composition of the surface hydrocarbons from the vitelline membranes of dipteran embryos. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol*. 136: 295–308.
- Neto, M., J. C. Zanuncio, I. Cruz, and J. B. Torres. 2002.** Nymphal development of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera, Pentatomidae) preying on larvae of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera, Noctuidae) fed with resistant and susceptible soybeans. *Rev. Bras. Entomol*. 46: 237–241.
- Oliveira, J. E. M., J. B. Torres, A. F. Carrano-Moreira, and F. S. Ramalho. 2002.** Biologia de *Podisus nigrispinus* predando lagartas de *Alabama argillacea* em campo. *Pesq. Agropec. Bras*. 37:7–14.
- Oliveira, H. N. de, M. C. Espindula, M. M. Duarte, F. F. Pereira, and J. C. Zanuncio. 2011.** Development and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fed with *Thyrintea arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) reared on guava leaves. *Braz. Arch. Biol. Technol*. 54: 429–434.
- Pukacki PM, and Juszczuk K, 2015.** Desiccation sensitivity and cryopreservation of the embryonic axes of the seeds of two Acer species. *Trees* 29, 385–396.
- Rajamohan, A., and R. A. Leopold. 2007.** Cryopreservation of Mexican fruit flies by vitrification: Stage selection and avoidance of thermal stress. *Cryobiology*. 54: 44–54.
- Rajamohan, A., J. P. Rinehart, S. P. Foster, and R. A. Leopold. 2013.** Permeability Barriers to Embryo Cryopreservation of *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Econ. Entomol*. 106: 855–861.
- Rajamohan, A., J. P. Rinehart, and R. A. Leopold. 2014.** Cryopreservation of Embryos of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol*. 51: 360–367.
- Rodrigues, A. R. S., J. E. Serrão, V. W. Teixeira, J. B. Torres, and A. A. Teixeira. 2008.** Spermatogenesis, changes in reproductive structures, and time constraint associated with insemination in *Podisus nigrispinus*. *J. Insect Physiol*. 54: 1543–1551.
- Roversi, P. F., E. Cosi, and T. Irdani. 2008.** Chill sensitivity and cryopreservation of eggs of the greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Cryobiology*. 56: 1–7.
- Stefanini, M., C. De Martino, and L. Zamboni. 1967.** Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*. 216: 173–174.

- Steponkus, P. L., S. P. Myers, D. V. Lynch, L. Gardner, V. Bronshteyn, S. P. Leibo, W. F. Rall, R. E. Pitt, T. T. Lin, and R. J. Macintyre. 1990.** Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature*. 345: 170–172.
- Torres, J. 2006.** The predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*: biology, ecology and augmentative releases for lepidoperan larval control in Eucalyptus forests in Brazil. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* 1:1-18.
- Tsai, S. and C. Lin. 2012.** Advantages and applications of cryopreservation in fisheries science. *Braz. arch. biol. technol.* 55: 425–434.
- Valencia, M. D. P., L. H. Miller, and P. Mazur. 1996.** Permeabilization of Eggs of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *Cryobiology*. 33: 149–162.
- Wang, W. B., R. A. Leopold, D. R. Nelson, and T. P. Freeman. 2000.** Cryopreservation of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) Embryos. *Cryobiology*. 41: 153–166.
- Woods, H. A. 2005.** Oxygen and water flux across eggshells of *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 208: 1297–1308.
- Zanuncio, J. C., A. J. Molina-Rugama, G. P. Santos, and F. de S. Ramalho. 2002.** Effect of body weight on fecundity and longevity of the stinkbug predator *Podisus rostralis*. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 37: 1225–1230.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de *Podisus nigrispinus* é afetado pela temperatura, por isso, em curto prazo, pode-se controlar a população em laboratório mediante carência ou não de inimigos naturais para controle biológico de pragas. Contudo, a criopreservação de inseto é um método promissor, pois permite a conservação/estocagem de insetos por tempo indeterminado. Neste trabalho, constatou-se que a metodologia utilizada para criopreservação de dípteros, lepidópteros e himenópteros é inviável para vitrificação de *P. nigrispinus*. Sendo, portanto, necessário adequar ou desenvolver um novo protocolo devido às particularidades desse inseto.