

알기생봉(*Trichogramma* sp. Nabis101)의 저온 발육 휴지와 단기 저장 기술김용균\* · 허혜정 · 김근섭 · 함은혜<sup>1</sup> · 김지원<sup>1</sup> · 강성영<sup>1</sup> · 권기면<sup>1</sup>안동대학교 생명자원과학과, <sup>1</sup>(주) 나비스 중앙연구소Effect of a Low Temperature-Induced Quiescence on Short Term Storage of an Egg Parasitoid, *Trichogramma* sp. Nabis101Yonggyun Kim\*, Hyejung Heo, Geun Seob Kim, Eunhye Hahm<sup>1</sup>, Jiwon Kim<sup>1</sup>, Sungyoung Kang<sup>1</sup> and Kimyeon Kwon<sup>1</sup>

Department of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749

<sup>1</sup>Agricultural Environment Research Center, NABIS Co., Ltd., Moongyeong, Korea

**ABSTRACT** : A commercial egg parasitoid, *Trichogramma* sp. Nabis101, was released into agricultural cultivating areas in Korea due to its wide host spectrum against insect pests. Moreover, an application technique has been recently developed to enhance its control efficacy by mixture treatment with a microbial control agent. Despite its expansion of commercial availability, any genetic identification on this commercial strain was not determined. Also, to meet inconsistent demands from consumers, the live parasitoids need to be stored without significant loss of their survival and parasitic activity. This study determined nucleotide sequence of internal transcribed spacer (ITS) of the wasp species. The identified ITS sequences indicate that this wasp species is most similar to *T. brasiliensis*. Optimal storage condition of this wasp required young parasitized stage at 10°C. Under these conditions, survival, sex ratio, longevity, and parasitic behavior were not much impaired for 5 weeks.

**KEY WORDS** : ITS, Parasitism, Parasitoid, Storage, *Trichogramma*

**초 록** : 상용화된 *Trichogramma* sp. Nabis101은 알 기생봉으로 대상 기주 범위가 넓어 해충 방제용으로 농생태계에 방사되고 있다. 더욱이 최근에 미생물농약과 혼용 기술이 개발되어 이들의 적용 확대가 기대되고 있다. 그러나 아직 이 기생봉의 정확한 종 동정이 되어 있지 않다. 또한 비교적 불규칙적 수요에 대응하여 생존력과 기생 능력 차이 없이 기생봉을 저장할 수 있는 기술이 요구되고 있다. 본 연구는 이 기생봉의 internal transcribed spacer (ITS)의 염기서열을 결정하였다. 이를 토대로 이 기생봉의 종 동정을 실시한 결과 *T. brasiliensis*와 가장 높은 유사성을 나타냈다. 이 기생봉의 저장은 기생 초기의 기주 알을 10°C에서 보관하는 기술이 결정되었다. 이 조건에서 기생봉은 5주 동안 생존력, 성비, 수명 및 기생능력의 큰 저하 없이 유지될 수 있었다.

**검색어** : 염기서열, 기생, 치사기생자, 저장, 알 기생봉

\*Corresponding author. E-mail: hosanna@andong.ac.kr

넓은 기주 범위와 전 세계적 분포를 갖는 *Trichogramma* 알 기생봉은 체장이 0.2-1.5 mm의 소형 곤충으로 좀벌상과(Chalcidoidea)에 속하며 *Oligosita*와 함께 알벌과(*Trichogrammatidae*) 전체의 약 40%를 차지하고 있다(Pinto and Sthouthamer, 1994). 이 속에 속한 알 기생봉을 방사하는 기술은 포식자와 피포식자의 자연적 평형 상태를 이루려는 생물적 방제 전략 가운데 하나로서 농업 현장에 적용되고 있다. 이를 위해 알 기생봉의 대량 사육 기술이 필수적이며, 또한 시기적으로 불규칙한 수요에 대처할 수 있는 기생봉의 대량 저장 기술이 요구된다.

알 기생봉의 효과적 저장 방법으로 기생봉의 휴면 생리를 이용하여 장기간 보존을 꾀하려 했다(Stinner, 1977; Boivin, 1994; Chang *et al.*, 1996). 일부 *Trichogramma* 속에 속한 종들은 일장과 온도 유기 인자에 의해 전용 시기에 휴면발육이 진행된다(Pizzol, 1978; Zaslavski and Umarova, 1990). 이러한 휴면 발육은 알 기생봉을 장기간(약 6개월) 보존이 가능하게 한다(Ventura Garcia *et al.*, 2002).

그러나 많은 알 기생봉이 뚜렷한 휴면 발육을 보이지 않고 또 비교적 단기성(약 1개월) 저장이 간편한 저온 처리에 의해 가능하기에 이러한 저온 저장 방법이 *Trichogramma*에 속한 종들에서 연구되어 왔다(Pitchet *et al.*, 2002; Ventura Garcia *et al.*, 2002; Rundle *et al.*, 2004). 즉, 생리적 휴지 상태를 이용하여 단기성 저장을 꾀하는 기술 개발은 효과적 저온 선택과 이러한 저온에 노출될 기생봉 발육 시기를 결정할 필요가 있다.

본 연구는 현재 국내 생물적 방제 인자로서 상용화되고 보급되고 있는 알 기생봉 *Trichogramma* sp. Nabis101을 대상으로 저온 저장 기술을 분석하고 효과적 저장 기술을 개발하는 데 목표를 두었다. 또한 정확한 생물적 종 특성을 파악하고자 ribosomal RNA 유전자 영역에 존재하는 internal transcribed space (ITS)를 중심으로 염기서열 분석을 진행하였다.

## 재료 및 방법

### 시험곤충

알 기생봉(쌀좀알벌, (주) 나비스, 예천, 한국)은 줄알락명나방(*Cadra cautella*) 알을 기주로 실내조건(26±2°C, 74±5% 상대습도, 18L:6D)에서 사육하였다. 먹이로 40% 설탕물을 기생봉 성충에게 공급하였다.

### Ribosomal DNA의 ITS 영역 염기서열 분석

알 기생봉 10 마리를 이용하여 Kang *et al.* (2005)의 방법으로 게놈 DNA를 추출하였다. 대상 DNA 영역 증폭은 Vrain *et al.* (1992)이 제시한 프라이머를 이용하였다. 정반응 프라이머 서열은 5'-TTGATTACGTCCTGCCCTTT-3' 이고, 역반응 프라이머 서열은 5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3'을 이용하였다. PCR 반응용액의 구성은 10X PCR 완충용액(5 µl), dNTP 혼합액(각 2.5 mM) (5 µl), 25 pmol 정반응 프라이머(2 µl), 25 pmol 역반응 프라이머(2 µl), Taq DNA 중합효소(1 µl) 및 탈이온증류수(34 µl)을 포함했다. 여기에 기계유(20 µl)를 첨가한 후 PTC-100 (MJ Research, Minnesota, USA) 기기를 이용하여 반응시켰다. PCR 반응 조건은 35 반복 증폭반응으로, 각 반응은 94°C에서 1 분, 46°C에서 1 분 그리고 72°C 2 분으로 구성되며, 이후 72°C에서 10 분 간 잔여 합성 반응을 실시하였다. 이렇게 얻어진 PCR 증폭물은 TA 벡터(pGEM<sup>®</sup>, Promega, Madison, USA)에 재조합시키고, Sp6와 T7 프라이머를 이용하여 양방향으로 염기서열을 분석하였다. 결정된 염기서열은 GenBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 BlastN 검색 프로그램을 이용하여 유사성이 있는 염기서열을 추적하였으며, 이를 다시 DNASTAR 프로그램(Version 5.01, DNASTAR Inc., Madison, USA)을 이용하여 염기서열 사이에 상동성을 결정하였다.

### 저온 저장 처리

기주 알을 알 기생봉에 24 시간 노출시킨 후 다시 5°C에서 4일 또는 7일 경과된 알을 각각 처리구 당 200 마리로 4°C와 10°C의 저온에 시기별로 처리하였다. 처리 기간은 5주까지 실시하였으며 주별로 상온으로 옮긴 후 10일 동안 우화된 성충 수로 생존율을 산출하였다.

### 저온 저장 후 생물적 특성 분석

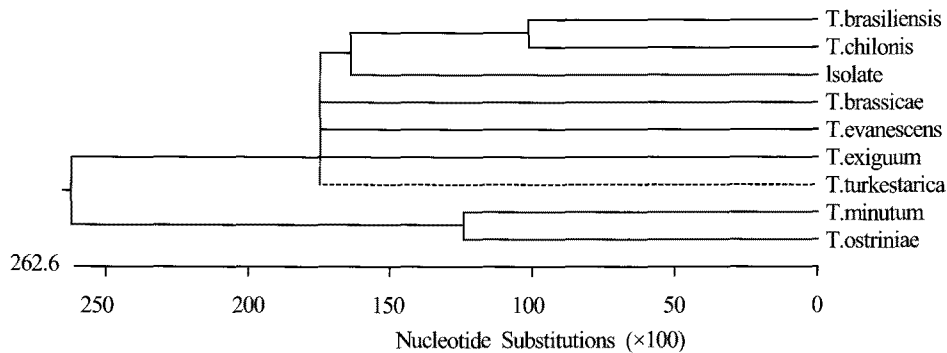
알 기생봉을 기생시킨 기주 알(각 패트리디쉬 당 35 개)을 10°C에서 1, 2, 3, 4, 5 주 동안 저장한 후 기생봉 발육 조건(26±2°C, 74±5% 상대습도, 18L:6D)에서 우화율, 우화한 성충의 암·수 성비 및 수명을 조사하였다. 또한 각 저장기간에 따라 우화한 암컷 성충을 수컷 성충과 24 시간 동안 교미 시킨 후, 암컷 성충 1 마리에 24 시간마다 줄알락명나방 알 100 개를 공급하였으며,



(A)

<i>Trichogramma</i>	<i>Trichogramma</i> sp. Nabis101			
	NCBI access number	Nucleotide identity (%)	Match score (bits)	E value
<i>T. minutum</i>	AY357710	97	865	0.0
<i>T. ostrinae</i>	AF073789	94	808	0.0
<i>T. chilonis</i>	AY167418	95	741	0.0
<i>T. exiguum</i>	AY167419	95	725	0.0
<i>T. brasiliensis</i>	AY167416	96	712	0.0
<i>T. turkestarica</i>	DQ088062	91	593	6e <sup>-166</sup>
<i>T. evanescens</i>	DQ088059	92	577	6e <sup>-161</sup>
<i>T. brassicae</i>	DQ314611	92	566	1e <sup>-157</sup>

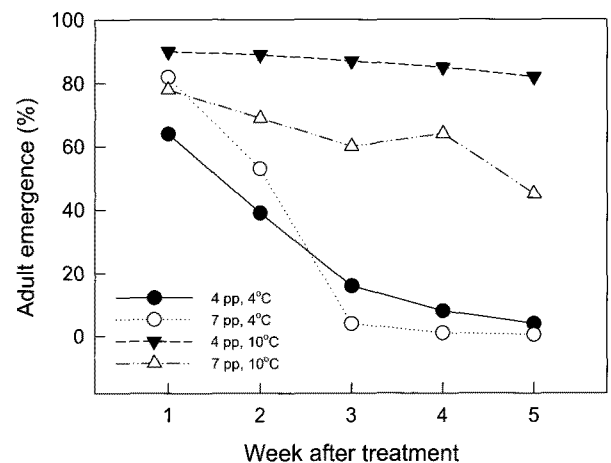
(B)



**Fig. 2.** Comparison of ITS nucleotide sequence of *Trichogramma* sp. Nabis101 ('Isolate') with other *Trichogramma* spp. (A) Sequence match using a Blast mode of NCBI GenBank. (B) A phylogenetic tree constructed by Clustal W sequence alignment program of DNASTar Version 4.1.

이 염기서열을 바탕으로 NCBI에 등록된 DNA 염기서열 자료와 유사도를 분석하였다(Fig. 2). 높은 일치성은 E value를 중심으로 *T. minutum*, *T. ostrinae*, *T. chilonis*, *T. exiguum* 및 *T. brasiliensis*로 나타났으나, 이 가운데 가장 높은 유사성은 97%로서 *T. minutum*으로 판명되었다(Fig. 2A). 이들을 다시 계통분류학 방식으로 분석한 결과 본 연구의 난기생충은 *T. chilonis* 및 *T. brasiliensis*와 근접하였고, Blast 탐색에서 유사도가 높은 *T. minutum*은 계통학적 차이를 보였다(Fig. 2B). 두 결과를 종합하여 보면 본 기생충은 *T. brasiliensis*와 가장 높은 유전적 관계를 갖는 것으로 나타났다.

***Trichogramma* sp. Nabis101의 저온 저장 조건 결정**  
알 기생충의 저장 기술을 개발하기 위해 두 가지 서로 다른 저온을 서로 다른 기생 상태의 알에 처리하였다(Fig. 3). 상온 조건에서 기생 후 기생충의 성충 출현이 약 11 일 소요되기에(Jung *et al.*, 2005) 기생 후 4일 및 7일 차 기생된 알을 각각 저장을 위한 초기와 후기 기



**Fig. 3.** Effects of age of parasitized host and low temperature on long-term storage of *Trichogramma* sp. Nabis101. The host eggs of *Cadra cautella* parasitized by the wasp were incubated at 25°C for 4 days ('4 pp') or 7 days ('7 pp'). These parasitized eggs were kept in two low temperatures. After different storage periods, the eggs were transferred to 25°C for 10 days and observed to count wasp emergence. Each treatment measurement came out of 100 parasitized eggs.

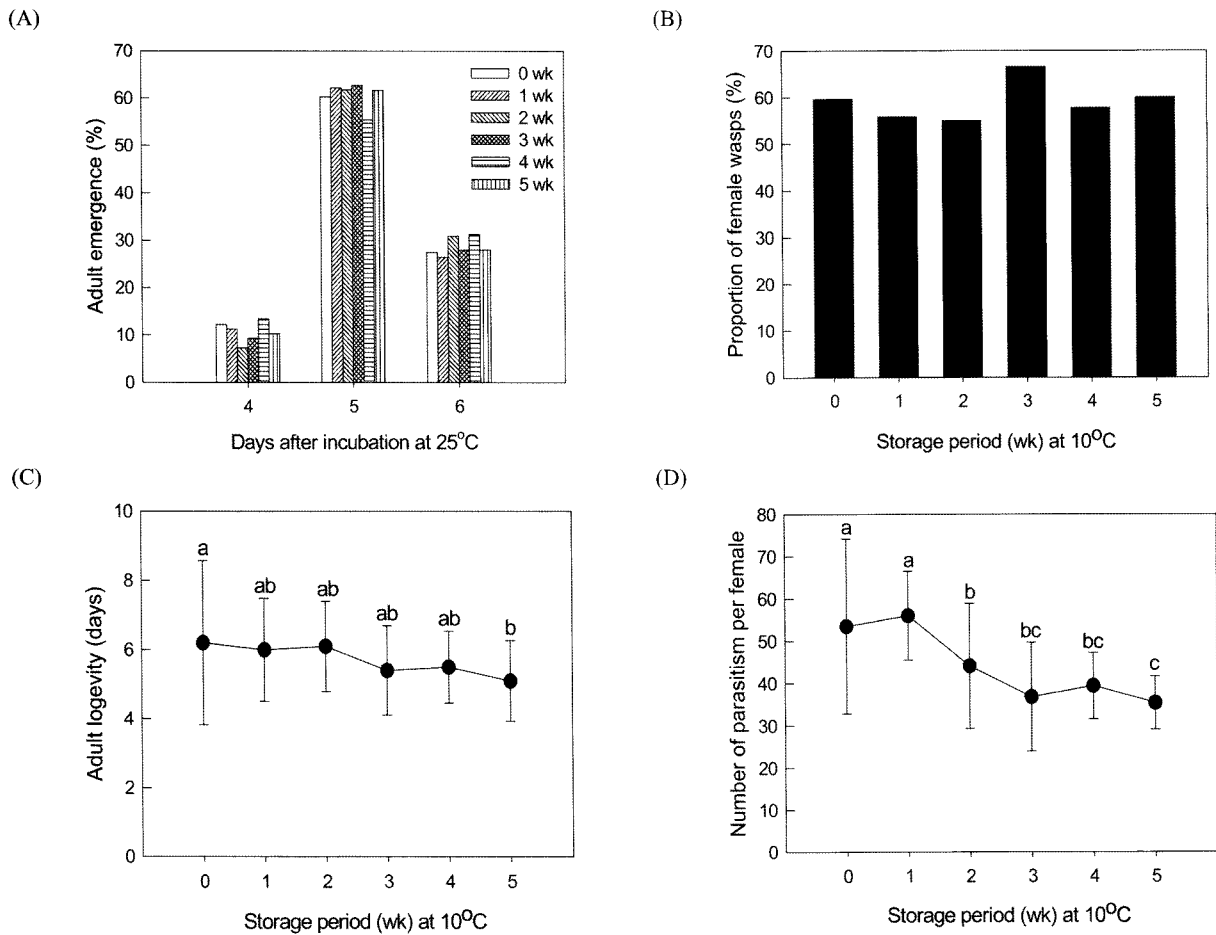
생봉 발육태로 규정하고 선발하였다. 저장 효율은 온도에 민감하여 4°C 보다는 10°C에서 높은 생존력을 보였다. 저온 처리 3주 이후부터 4°C 경우 급격한 생존율 저하를 나타냈다. 또한 10°C에서는 초기 기생봉 발육태가 후기 기생봉 발육태에 비해 처리 5 주 동안 생존 능력이 높은 것으로 나타났다. 후기 기생봉 발육태의 경우 저장 5 주가 경과하면 약 50%만 생존하는 낮은 생존 능력을 보였다. 이 선행 연구를 토대로 이후 모든 저장 연구는 10°C에서 기생 후 4 일된 알을 기준으로 실시하였다.

**저온 저장 이후 기생봉의 생물학적 특성 변화**

-이상의 결과는 초기 발육태의 기생봉이 10°C의 조건에서 약 5 주간 생존할 수 있다는 것을 보여 주었다. 여기서 생존된 기생봉이 정상적 성충 생활 능력을 보이는

지를 판명하기 위해 저장 기간에 따라 일별 우화 리듬, 암컷비율, 수명 및 기생률을 분석하였다(Fig. 4). 우화 리듬은 상온으로 옮겨진 후 4 일이 경과하면 나타나기 시작하여 5 일째에 최대 피크를 보이고 다음 날 잔여 출현수를 보였다(Fig. 4A). 이러한 우화 리듬은 10°C에서 저장 기간에 관계없이 동일한 패턴을 보였다( $X^2 = 3.46$ ;  $df = 10$ ;  $P = 0.9685$ ). 저온 저장 기간에 따른 우화된 성충의 암컷 비율(Fig. 4B)은 처리에 따라 약 55-65%의 차이를 보였으나 통계적으로 유의성은 보이지 않았다( $X^2 = 0.20$ ;  $df = 5$ ;  $P = 0.991$ ). 성충 수명(Fig. 4C)은 약 6 일을 보였으며, 5 주차 저장 처리에서 수명이 감소하는 것으로 나타났다. 기생율(Fig. 4D)은 무처리의 경우 암컷 한 마리당 약 52 개를 산란하는 반면, 저장 기간이 지속됨에 따라 감소하여 5 주간 저장된 알에서 출현한 성충의 경우 40 개 미만을 나타냈다.

저온 저장에 따라 알 기생봉의 기생 리듬을 분석하였



**Fig. 4.** Effect of low temperature storage in host eggs parasitized by *Trichogramma* sp. Nabis101 on their wasp adult development and parasitism. The parasitized eggs were kept at 10°C for different week ('wk') periods. (A) Time to emergence (B) sex ratio (C) longevity (D) parasitism after different storage periods.

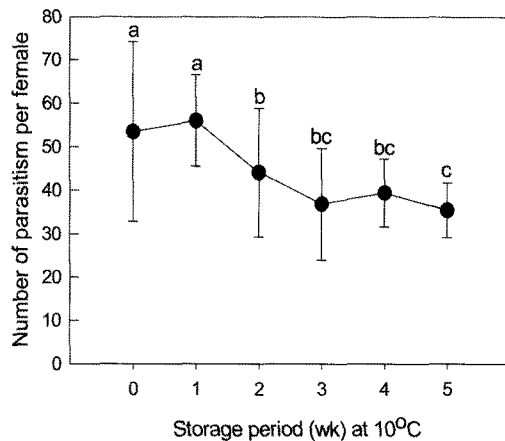


Fig. 5. Effect of low temperature storage in host eggs parasitized by *Trichogramma* sp. Nabis101 on parasitic activity of their wasp adults. The parasitized eggs were kept at 10°C for different week ('wk') periods.

다(Fig. 5). 저장 기간에 상관없이( $F = 0.11$ ;  $df = 5$ , 695;  $P = 0.9902$ ) 모두 우화 후 24 시간이 경과하면 대부분 기생을 보이고 이후 급격하게 줄어드는( $F = 981.75$ ;  $df = 4$ , 695;  $P < 0.0001$ ) 경향을 나타냈다.

## 고 찰

알 기생봉인 *Trichogramma*는 중요한 생물적 방제인 자로서 전 세계적으로 매년 3,200만 ha의 농생태계에 처리되고 있다(Li, 1994). 이들은 비교적 사육이 용이한 저곡해충인 보리나방(*Sitotroga cerealella*), 알락명나방류(*Anagasta kuehniella*), 명나방류(*Corcyra cephalonica*)를 이용하여 사육되어 왔으며, 현재는 대체기주 또는 기내배양 조건에서 단가를 저감한 대량사육기술이 개발되어 있다(Flanders, 1930; Li, 1994; Smith, 1996). *Trichogramma*를 이용한 해충 방제 기술은 다양한 해충 방제 기술과 접목하여 혼용이 가능하므로, 현재 종합해충방제에 널리 이용되고 있다. 본 연구는 국내에서 시판되고 있는 *Trichogramma* sp. Nabis101에 대한 유전학적 특징을 ITS 염기서열을 중심으로 먼저 분석하였다. 기존에 이 종이 *T. evanescens*으로 알려져 있으나(Kim et al., 2008) 염기서열 자료는 이 종과는 큰 차이를 보였고, 오히려 *T. brasiliensis*와 가장 높은 염기서열 상동성을 보였다. Kumar et al. (2009)은 ITS-2 길이의 다양성을 바탕으로 *Trichogrammatid* 알 기생봉을 세부류로 나누어, 이 영역의 길이가 제일 긴 800-850 bp인 Group I은 *Trichogrammatoidea armigera*와 *Tr. bactrae*

를 포함하며, 570-620 bp인 Group II는 *T. achaeae*, *T. embryophagum* 및 *T. japonicum*을 포함하며, 500-550 bp인 Group III는 *T. chilonis*, *T. dendrolimi*, *T. evanescens*, *T. mwanzai*, *T. brassicae* 및 *T. pretiosum*을 포함시켰다. 이러한 분류에 따르기 위해서 Kumar et al. (2009)의 연구에서 사용된 PCR 프라이머를 본 연구에서 밝혀진 *Trichogramma* sp. Nabis101 염기서열에 접목하면 800-1370까지를 증폭하는 결과로서 일부 5.8S 영역을 포함한 571 bp의 증폭 길이를 나타내게 된다. 즉, 본 연구 대상인 알 기생봉이 Group II에 속한다는 의미로서 Group III에 속한 *T. evanescens* 또는 *T. chilonis*가 아니라는 것을 다시 뒷받침하여 주고 있다. 한편 유사도와 계통분류학적으로 가장 근접한 *T. brasiliensis*의 ITS-2를 분석하면 525 bp가 산출되어 이러한 분류에 기초하여 본 연구 대상 기생봉과 차이점을 나타냈다. 이상의 염기서열 결과를 종합하면 본 연구대상 기생봉인 *Trichogramma* sp. Nabis101은 염기서열이 밝혀진 이 분류군의 기생봉 가운데 *T. brasiliensis*와 가장 근접하나 ITS-2 분석에서 보듯 일치하지 않는 뚜렷한 차이를 나타냈다. 이에 대한 형태학적 분류 동정이 요구된다.

알 기생봉의 저온 저장을 통해 성충 출현을 연장시킴으로 단기간 저장이 가능하다는 것이 본 연구를 통해 결정되었다. 저온은 낮은 4°C 보다는 10°C가 일시적 발육 정지를 유발하는 데 유효하였다. 이는 낮은 온도에서 일어나는 세포막 장애와 같은 냉해 피해(Quinn, 1985)를 줄이면서 발육 지연 효과를 얻는 데서 비롯되었을 것으로 사료된다. 또한 10°C는 *Trichogramma* 속에 속한 많은 종들의 발육 영점온도에 해당하게 된다(Curl and Burbutis, 1977; Rundle and Hoffmann, 2003). 따라서 이 이상의 온도는 발육 정지효과를 유발하기 힘들고, 이 이하의 온도는 생존을 유지하기 위한 에너지 소모가 있기에 생존력 감소가 유발되었을 것으로 사료된다.

이러한 저온 저장 이후 기생봉의 생존율은 유지되었지만 기타 여러 기생 관련 특징에 있어서 피해가 나타날 수 있다. 이러한 피해는 생식력 감소(Jalali and Singh, 1992; Chang et al., 1996), 비행 능력 저하(Dutton and Bigler, 1995), 성충 수명 감소(Jalali and Singh, 1992; Hutchinson and Bale, 1994) 및 수컷 촉각 구조 결실(Pintureau and Daumal, 1995)을 포함할 수 있다. 본 연구는 10°C 저장 이후 우화된 성충을 대상으로 성비, 수명, 기생력을 비교한 결과 다른 특징에서는 차이가 없으나 저장 2 주 이후부터 기생력이 다소 저하되는 것을 확인하였다. 즉, 2 주 이후에는 10°C 조건에

서도 에너지 소모가 있을 수 있고, 이러한 에너지 소모는 생식력에 영향을 주었을 것으로 추정된다. 그러나 저장 기간에 상관없이 암컷 성충의 나이별 기생 리듬은 전혀 변동 없이 유지되었다. 그러나 5주 이상의 저장은 현재의 기술로 기생력과 성충 수명에 영향을 주어 이에 대한 장기 저장 기술이 개발되어야 한다.

본 연구는 현재 시판되고 있는 *Trichogramma* sp. Nabis101이 기존에 알려진 싹좀알벌(*T. evanescens*)과는 유전적 성질에서 뚜렷한 차이가 있음을 나타냈다. 또한 저온을 이용한 단기저장을 위해서는 초기 기생봉 발육태의 기주 알을 10°C에서 저장 할 경우 5 주까지 생존율에 차이가 없고 80% 이상의 기생능력을 보유하는 것으로 나타났다.

## 사 사

본 연구는 2008년도 제16차 중소기업청의 산학공동 기술개발지원사업으로부터 지원받아 수행되었다. 김근섭은 교육부 2단계 BK21사업에서 지원받았다.

## Literature Cited

- Boivin, G. 1994. Overwintering strategies of egg parasitoids. pp. 219-244. *In* Biological control with egg parasitoids, eds. by E. Wajnberg and S. A. Hassan. CAB International, Wallingford, England.
- Chang, Y.F., M.J. Tauber and C.A. Tauber. 1996. Reproduction and quality of F1 offspring in *Chrysoperla carnea*: differential influence of quiescence, artificially-induced diapause and natural diapause. *J. Insect Physiol.* 42: 521-528.
- Curl, G.D. and P.P. Burbutis. 1977. The mode of overwintering of *Trichogramma nubilale* Estle and Davis. *Environ. Entomol.* 6: 629-632.
- Dutton, A. and F. Bigler. 1993. Flight activity assessment of the egg parasitoid *Trichogramma brassicae* (Hym.: Trichogrammatidae) in laboratory and field conditions. *Entomophaga* 40: 223-233.
- Flanders, S.E. 1930. Mass production of egg parasites of the genus *Trichogramma*. *Hilgardia* 4: 145-167.
- Hutchinson, L.A. and J.S. Bale. 1994. Effects of sublethal cold stress on the aphid *Rhopalosiphum padi*. *J. Appl. Ecol.* 31: 102-108.
- Jalali, S.K. and S.P. Singh. 1992. Differential response of four *Trichogramma* species to low temperatures for short term storage. *Entomophaga* 37: 159-165.
- Jung, J.K., J.H. Park, D.J. Im and T.M. Han. 2005. Parasitism of *Trichogramma evanescens* and *T. ostriniae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to eggs of the asian corn borer, *Ostrinia furacalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Kor. J. Appl. Entomol.* 44: 43-50.
- Kang, S., S. Han and Y. Kim. 2005. Identification and pathogenic characteristics of two Korean isolates of *Heterorhabditis megidis*. *J. Asia-Pac. Entomol.* 8: 411-418.
- Kim, G., H. Heo, J. Park, Y. Yu, E. Hahm, S. Kang, K. Kwon, K. Lee and Y. Kim. 2008. Efficacy of an integrated biological control of an egg parasitoid, *Trichogramma evanescens* Westwood, and microbial insecticide against the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta* (Gueneé) infesting hot pepper. *Kor. J. Appl. Entomol.* 47: 435-445.
- Kumar, G.A., S.K. Jalali, T. Venkatesan, R. Stouthamer, P. Niranjana and Y. Lalitha. 2009. Internal transcribed spacer-2 restriction fragment length polymorphism (ITS-2-RFLP) tool to differentiate some exotic and indigenous trichogrammatid egg parasitoids in India. *Biol. Control* 49: 207-213.
- Li, L.Y. 1994. Worldwide use of *Trichogramma* for biological control on different crops: a survey, pp. 37-53. *In* Biological control with egg parasitoids, eds. by E. Wajnberg and S.A. Hassan. CAB international, Wallingford, England.
- Pinto, J.D. and R. Stouthamer. 1994. Systematics of the Trichogrammatidae with emphasis on *Trichogramma*. pp. 1-36. *In* Biological control with egg parasitoids, eds. by E. Wajnberg and S. A. Hassan. CAB International, Wallingford, England.
- Pintureau, B. and J. Daumal. 1995. Effects of diapause and host species on some morphometric characters in *Trichogramma* (Hym.: Trichogrammatidae). *Experientia* 51: 68-72.
- Pitcher, S.A., M.P. Hoffmann, J. Gardner, M.G. Wright and T.P. Kuhar. 2002. Cold storage of *Trichogramma ostriniae* reared on *Sitotroga cerealella* eggs. *Biocontrol* 47: 525-535.
- Quinn, P.J. 1985. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology* 22: 128-146.
- Rundle, B.J. and A.A. Hoffmann. 2003. Overwintering of *Trichogramma funiculatum* Carver (Hymenoptera: Trichogrammatidae) under semi-natural conditions. *Environ. Entomol.* 32: 290-298.
- Rundle, B.J., L.J. Thomson and A.A. Hoffmann. 2004. Effects of cold storage on field and laboratory performance of *Trichogramma carverae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and the response of three *Trichogramma* spp. (*T. carverae*, *T. nr. brassicae*, and *T. funiculatum*) to cold. *J. Econ. Entomol.* 97: 213-221.
- SAS Institute, 1988. SAS/STAT user's guide, Release 6.03, Ed. Cary, N.C.
- Smith, S.M. 1996. Biological control with *Trichogramma*: advances, successes, and potential of their use. *Annu. Rev. Entomol.* 41: 375-406.
- Stinner, R.E. 1977. Efficacy of inundative releases. *Annu. Rev. Entomol.* 22: 515-531.
- Ventura Garcia, P., E. Wajnberg, J. Pizzol and M.L.M. Oliveira. 2002. Diapause in the egg parasitoid *Trichogramma cordubensis* role of temperature. *J. Insect Physiol.* 48: 349-355.
- Vrain, T.C., D.A. Wakarchuk, A.C. Levesque and R.I. Hamilton. 1992. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fund. Appl. Nematol.* 15: 563-574.
- Zaslavski, V.A. and T.Y. Umarova. 1990. Environmental and endogenous control of diapause in *Trichogramma* species. *Entomophaga* 35: 23-29.

(Received for publication June 11 2009;  
revised September 18 2009; accepted September 22 2009)