



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira

Centro de Pesquisas do Cacau



BOLETIM TÉCNICO N° 185

CRIAÇÃO DE FORMAS IMATURAS DE INSETOS DE INTERESSE AGRÍCOLA VISANDO A IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE A PARTIR DO SEU IMAGO

Edna Maria de Oliveira Ferronatto

2002

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

Ministro: Marcus Vinicius Pratini de Moraes

Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPLAC

Diretor: Hilton Kruschewsky Duarte

Superintendência Regional da Bahia e Espírito Santo (SUBES)

Superintendente: Francisco Carlos Ferreira Leite

Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC)

Chefe: Raúl René Meléndez Valle

Serviço de Pesquisas

Chefe: Jonas de Souza

Serviço de Suporte Técnico

Chefe: José Marques Pereira

Centro de Extensão (CENEX)

Chefe: Ebiezel Nascimento Andrade Filho

Superintendência Regional da Amazônia Ocidental (SUPOC)

Superintendente: João Valério da Silva Filho

Superintendência Regional da Amazônia Oriental (SUPOR)

Superintendente: Ademir Conceição Carvalho Teixeira



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira
Centro de Pesquisas do Cacau



ISSN 0100-0845

CRIAÇÃO DE FORMAS IMATURAS DE INSETOS DE INTERESSE AGRÍCOLA VISANDO A IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE A PARTIR DO SEU IMAGO

Edna Maria de Oliveira Ferronatto

BOLETIM TÉCNICO N° 185

Ilhéus - Bahia

2002

CENTRO DE PESQUISAS DO CACAU - (CEPEC)

Chefe: Raúl René Meléndez Valle

SERVIÇO DE PESQUISAS

Chefe: Jonas de Souza

SERVIÇO DE SUPORTE TÉCNICO

Chefe: José Marques Pereira

Comissão de Editoração: José Luiz Bezerra, Miguel A. Moreno-Ruiz e Milton Macoto Yamada

Editor: Miguel Antonio Moreno-Ruiz

Assistentes de Editoração: Jacqueline C.C. do Amaral e Selenê Cristina Badaró

Normalização de referências bibliográficas: Maria Christina de C. Faria

Editoração eletrônica: Jacqueline C.C. do Amaral

Endereço para correspondência:

CEPLAC/CEPEC/SIDOC

Caixa Postal 07, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil

Telefone: (73) 214 -3217

Fax: (73) 214 - 3218

E-mail: agrotrop@cepec.gov.br

Tiragem: 600 exemplares

F

595.7

F396

FERRONATTO, R. M. de O. 2002. Criação de formas imaturas de insetos de interesse agrícola visando a identificação da espécie a partir do seu imago. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico n. 185. 32p.

1. Insetos - Criação. 2. Fatores bióticos. 3. Fatores abióticos
I. Título.



SUMÁRIO

1 - RESUMO	5
2 - ABSTRACT	5
3 - INTRODUÇÃO	6
4 - REQUISITOS GERAIS PARA CRIAÇÃO DE FORMAS IMATURAS	7
4.1 - Grupo taxonômico	7
4.2 - Identificação dos parâmetros bióticos e abióticos necessários para a manutenção de formas imaturas em condições de laboratório	7
4.3 - Principais fatores que influenciam o desenvolvimento dos insetos	9
4.3.1. -Temperatura	9
4.3.2 - Umidade relativa	9
4.3.3 - Luz e fotoperíodo	10
4.3.4 - Recipientes de criação	10
4.3.5 – Nutrição	11
5 - LABORATÓRIO	11
5.1 - Instalações	11
5.1.1 - Recepção e triagem das amostras	12
5.1.2 - Ambiente para manutenção da planta hospedeira	12
5.1.3 - Ambientes climatizados para manutenção dos insetos	13
5.1.4 - Local para a preparação de dietas artificiais e semi-artificiais	14
5.1.5 - Controle de doenças entomopatogênicas	14
5.1.5.1 - Descontaminação, esterilização, desinfecção e assepsia	15
5.1.5.2 - Descarte de resíduos	16

6 - MANUTENÇÃO DOS INDIVÍDUOS EM LABORATÓRIO	17
6.1 - Posturas	17
6.2 - Larvas e ninfas	18
6.2.1 - Manutenção de larvas em partes destacáveis do vegetal	18
6.2.2 - Manutenção de larvas nas próprias plantas hospedeiras	18
6.2.3 - Manutenção de larvas rizofágicas	19
6.2.4 - Manutenção de larvas xilófagas	20
6.2.5 - Uso de dietas artificiais e semi-artificiais na alimentação dos estágios imaturos	20
6.3 - Manutenção das Pupas	21
 7 - PONTOS CRÍTICOS DOS MÉTODOS E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS	 22
 8 - IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE E COLEÇÃO DE REFERÊNCIA	 23
 9 - LITERATURA CITADA	 23
 10- ANEXOS	 29
10.1 - Listas de materiais e equipamentos	29

CRIAÇÃO DE FORMAS IMATURAS DE INSETOS DE INTERESSE AGRÍCOLA VISANDO A IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE A PARTIR DO SEU IMAGO

Edna Maria de Oliveira Ferronato

1 - RESUMO

As atuais facilidades no intercâmbio de produtos agrícolas, numa economia globalizada, podem proporcionar uma rápida dispersão de insetos exóticos entre os diversos países. Neste sentido, a forma imatura é especialmente perigosa, tendo em vista que grande parte das espécies Neotropicais, não está descrita, mesmo no caso das espécies consideradas como pragas. Como não se dispõe de literatura, coleções referências, etc., para garantir a identificação, a alternativa é proporcionar as melhores condições possíveis para que as formas imaturas alcancem o estágio adulto em condições de laboratório e então se possa descobrir a espécie. Este trabalho destaca os principais fatores bióticos e abióticos envolvidos na criação de insetos imaturos de interesse agrícola.

Palavras-chave: dietas artificiais, dietas naturais, fatores bióticos, fatores abióticos, criação de formas imaturas.

2 - ABSTRACT

The current facility in the exchange of agricultural products, in a global economy, can cause a fast dispersion of exotic insects among several countries. In this sense, the immature forms are especially dangerous, since most of them are not described, even in the case of species considered pests. Since there aren't books, collections or references available on this subject, to assure the identification, the alternative is to provide the best possible conditions for the immature forms to reach the adult stage in laboratories, and then one can discover the species. This work describes the main requirements found in the books about the rearing of insects in laboratories, and highlights the main biotic and non-biotic factors related with the rearing of immature insects of agricultural concern.

Key words: artificial diets, natural diets, biotic factors, factors abióticos, rearing of immature insects.

LARA – RS/LABORATÓRIO DE PCR

Estrada Ponta Grossa, 3036, Bairro Belém Novo, 91780-580, Porto Alegre - RS

3 - INTRODUÇÃO

A motivação para realização deste trabalho surgiu em decorrência das discussões proporcionadas pelo grupo de trabalho em Métodos Analíticos GTP-PMA do COSAVE (Comitê de Sanidade Vegetal do Cone Sul; site para consulta na Internet: www.cosave.org.py). Constatou-se então, a necessidade de padronização de métodos de diagnósticos e a dificuldade que os países do Cone Sul (Brasil, Paraguai, Uruguai, Argentina e Chile) tinham para resolver o problema de identificação de insetos em produtos vegetais importados e exportados, quando estes estavam em sua forma imatura.

Nos insetos neotropicais o problema de identificação de formas imaturas agrava-se devido ao desconhecimento das características taxonômicas que permitam a identificação de larvas e pupas, uma vez que, grande parte dos mesmos, ainda não está descrita, mesmo no caso das espécies consideradas como pragas. Muitas são as causas para este fato: dificuldades metodológicas para criação em cativeiro, manutenção da planta hospedeira, características desconhecidas do ciclo de vida, culminando com o escasso contingente de profissionais voltados para o estudo da taxonomia e biologia de insetos nos trópicos, que é a região onde ocorre a sua maior diversidade.

Uma alternativa para determinação do nome da espécie é promover o seu desenvolvimento até que atinjam o estágio adulto e, então, com mais segurança, fazer o reconhecimento taxonômico. Nestas circunstâncias, dados como o local de origem da planta hospedeira e do inseto capturado, listas de insetos registrados e condições climáticas para este local, a coleta da parte da planta hospedeira na qual a forma imatura foi capturada (folha, caule, raiz, semente, fruto, pedaços de madeira) serão de grande auxílio para este tipo de criação. As informações anteriores, a consulta à coleções de formas imaturas aliadas à literatura especializada possibilitarão a classificação, pelo menos em grupos taxonômico mais amplos, fornecendo parâmetros para o estabelecimento das condições bióticas e abióticas que o laboratório deverá proporcionar para o desenvolvimento do inseto em questão. Após delimitar-se os objetivos da criação e de acordo com a abrangência decorrente é que deverão ser programadas as dimensões do laboratório, o nível e número do pessoal de apoio, a quantidade e sofisticação dos materiais e equipamentos.

Este trabalho tem a intenção de ressaltar os principais fatores envolvidos na criação de formas imaturas em condições artificiais quando não se conhece previamente o nome científico da espécie.

4- REQUISITOS GERAIS PARA CRIAÇÃO DE FORMAS IMATURAS

4.1 – Grupo taxônomico

Primeiramente, deve-se procurar identificar o estágio imaturo (ovo, larva, ninfa ou pupa) no nível taxonômico mais próximo possível da espécie. A consulta a obras de abrangência geral servirá como referência para esta classificação inicial e poderá auxiliar na descoberta do alimento mais adequado para o desenvolvimento do inseto. Snodgrass (1935); Wigglesworth (1938, 1954, 1972); Hinton (1946); Chu (1946); Böving and Craighead (1953); Imms (1957); Lawson (1959); Peterson (1960, 1962); Metcalf and Flint (1965); Chapman (1969); Peterson (1962) e Stehr, F. (1987, 1991) apresentam chaves ilustradas das principais ordens e famílias de formas imaturas de insetos. Para a identificação das larvas e pupas dos coleópteros brasileiros pode-se consultar Costa *et al.* (1988). Estes últimos autores apresentam a morfologia, chaves e diagnoses acompanhadas de ilustrações das principais espécies de larvas de Coleoptera. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA/SDR/CENAGRI), organizou a versão, para o português, de uma chave sistemática específica da autoria de D. M. Weisman (1996) (USDA, Washington, D.C.), para identificação de lagartas de Lepidoptera, frequentemente interceptada pelos inspetores de quarentena vegetal em portos de entrada nos Estados Unidos da América. Esta mesma instituição (MAPA/SDR/CENAGRI) organizou, também, a versão, para o português, do trabalho onde Anderson *et al.* (1996) apresentam chaves ilustradas para larvas de Coleoptera associados a madeiras em portos de entrada.

Ovos e pupas poderão ser mantidos controlando-se somente os fatores abióticos uma vez que, obviamente, não necessitam de nutrição.

4.2 – Identificação dos parâmetros bióticos e abióticos necessários para a manutenção de formas imaturas em condições de laboratório

Os insetos, na natureza, são submetidos a mudanças estacionais e a ciclos diários de temperatura e de luz. Em cativeiro, são obrigados a permanecer nas condições que lhes oferecemos. Daí a importância de se investigar os fatores limitantes, bióticos e abióticos para o desenvolvimento do inseto alvo, em grupos taxonômicos afins.

De acordo com o nível taxonômico alcançado na classificação, procurar responder, da forma mais completa possível (pelo menos por aproximação), o seguinte questionário: 1 - Qual o número de estádios larvais ou ninfais esperados?

2 – Qual a duração de cada estágio imaturo? 3 – Quais são os fatores bióticos e abióticos limitantes e favoráveis ao desenvolvimento dos ovos, larvas e pupas? 4 – Quais são os hábitos alimentares de grupos afins? 5 – Existem hospedeiros alternativos? 6 – Existe possibilidade do uso de dietas artificiais? 7 – Está registrada a ocorrência de canibalismo em grupos afins? 8 – Qual é a umidade relativa, temperatura e fotoperíodo vigentes no local de origem do vegetal onde o inseto foi capturado? 9 – Quais são as faixas de temperatura, umidade relativa e fotoperíodo ideais para sobrevivência de grupos afins? 10 – O inseto passa por diapausa na natureza? 11 – Quais são os fatores desencadeantes da diapausa no grupo taxonômico em que o inseto foi classificado ou em grupos afins? 12 – Quais são as possibilidades do uso de técnicas químicas, térmicas, choque elétrico, etc. para cessar a diapausa? 13 – Qual é a capacidade de dispersão da forma adulta de grupos taxonômicos afins?

Programas de criação que conseguem manipular interativamente, variáveis físicas, comportamentais e biológicas têm alcançado sucesso na obtenção do imago. Existem exemplos, em diferentes grupos taxonômicos, de insetos que completaram o ciclo de vida em condições de laboratório, a despeito das variações naturais do ambiente. Informações sobre os insetos que infestam produtos armazenados, podem ser encontradas em: Hayhurst and Chem (1942) para diversas ordens; Harein and Soderstrom (1966) para a ordem Coleoptera; Boles and Marzke (1966) para ordem Lepidoptera. Smith (1966) reúne vários trabalhos, onde é discutido e proposto métodos de criação, visando a colonização e produção massal, para cerca de 39 diferentes grupos de insetos. Em Corseuil e Cruz (1970) encontram-se dados sobre a biologia e descrições da larva e do imago das espécies de Coleoptera e Lepidoptera mais comumente encontradas em produtos agrícolas armazenados. Sucessos e dificuldades podem ser constatados na criação de formas imaturas de espécies como: *Plutella xylostella* (Lepidoptera) praga de Crucíferas (Ferronato, 1984); espécies de Eumolpinae, besouro conhecido como “vaquinha” (Coleoptera; Chrysomelidae) praga do cacauzeiro (Ferronato, 1988); as formas imaturas do gafanhoto-crioulo *Rhammatocerus conspersus* (Ferreira, 1996); criações da mosquinha *Ceratitis capitata* (Diptera), realizadas pelo Servicio Agrícola y Ganadero (S.A.G.) do Chile e centenas de espécies pertencentes a diferentes Ordens e Famílias de insetos, criados em dietas artificiais (Singh, 1983, 1985; Parra, 1996). A consulta a estes autores poderá servir de guia para o estabelecimento das condições de criação e ilustrará as diferenças em relação ao tamanho e tipo de arena, gaiolas entomológicas, cobertura para plantas em vasos, sincronia da temperatura e fotoperíodo, umidade relativa, dieta natural ou artificial.

4.3. – Principais fatores que influenciam o desenvolvimento dos insetos

4.3.1 - Temperatura

Segundo Andrewartha and Birch (1974) a temperatura é o fator físico mais importante na criação em cativeiro, atua como um regulador das atividades, influi tanto diretamente no comportamento do inseto, quanto indiretamente na sua alimentação. Os limites térmicos, a faixa ótima de desenvolvimento e a média mais favorável para qualquer inseto em particular, estão relacionados à temperatura vigente nos locais em que normalmente o inseto vive na natureza. Aqueles que vivem em locais frios têm uma faixa de temperatura favorável mais baixa de que outros que vivem em locais quentes. Esta faixa de temperatura é chamada de temperatura preferencial. Na natureza quando um inseto é exposto a temperaturas fora dos limites da sua faixa, pode morrer ou entrar em diapausa, cessando o seu desenvolvimento. Mesmo em temperaturas moderadas, dependendo da umidade relativa, uma larva recém nascida ou ninfa pode ressecar em poucas horas, antes mesmo do processo alimentar iniciar. Temperaturas mais altas ou mais baixas, podem influenciar, entre outras coisas, o tamanho do adulto, mascarando este caráter no momento da identificação da espécie. Várias expressões matemáticas tem sido propostas para descrever a relação entre a velocidade de desenvolvimento e a temperatura. Entre outros autores, Haddad e Parra (1984) apresentam métodos para estimar os limites térmicos e a faixa ótima de desenvolvimento das diferentes fases do ciclo de desenvolvimento dos insetos. Valendo-se do fato dos insetos serem pecilotérmicos, o uso de “graus dias” é uma importante ferramenta que pode ser utilizada como indicadora do desenvolvimento. A idade fisiológica, em graus dias, para qualquer inseto em particular, pode ser calculada pela fórmula: $D^{\circ} = D(T-K)$ - onde “D” é a duração do desenvolvimento em dias, K é o limite inferior de temperatura do desenvolvimento em °C e T é a temperatura constante da criação (Singh and Ashby, 1985). A aplicação desta fórmula, entretanto, limita-se aos insetos cuja biologia já foi estudada em temperaturas constantes e cuja temperatura base foi determinada.

4.3.2 - Umidade Relativa

Ainda, segundo Andrewartha and Birch (1974) existe uma faixa de umidade ótima para o desenvolvimento de certas espécies de insetos e a alteração destes limites ocasionam a morte dos insetos. Em algumas espécies de insetos, o desenvolvimento é mais rápido quando o ar está saturado. Gallo *et al.* (1978)

comentam que nas condições naturais, o inseto procurará se movimentar ao longo do gradiente de umidade favorável para a sua espécie, abrigando-se no local em que a interação da umidade e demais fatores ambientais sejam os mais apropriados, deslocando-se quando estas condições mudam.

4.3.3 – Luz e fotoperíodo

A qualidade de luz e comprimento do fotoperíodo produz respostas físicas, comportamentais e bioquímicas nos insetos. É especialmente importante no que tange ao comportamento e como estímulo para os mecanismos que regulam o ciclo de vida. A luz também é fundamental na manutenção das plantas hospedeiras dos insetos.

A observação das respostas fototáxicas é extremamente útil no manejo de insetos. Os insetos apresentam muitas respostas diferentes ao ritmo diário de luz e escuro. A estimulação do movimento em certas direções, para locais onde as fontes de luz sejam mais favoráveis pode ser usada como uma vantagem, a exemplo da indução da colonização de larvas recém nascidas em dietas artificiais. Existem casos, como o de *Dacus tryoni*, no qual o ritmo da emergência das pupas é influenciado pela exposição a luz experimentada pela geração imediatamente anterior (Andrewartha and Birch, 1974).

O fotoperíodo deverá ser estabelecido de acordo com o fotoperíodo do local de origem do inseto. O desenvolvimento do inseto pode ser atrasado ou acelerado e os padrões reprodutivos podem mudar, na dependência deste fator; a diapausa também depende desse fator. Segundo Lees, 1946, a diapausa deve ser encarada como um mecanismo que possibilita a sobrevivência do inseto frente as variações ambientais. Embora a diapausa possa ser um problema em criações contínuas, ela também pode seguidamente ser induzida, terminada ou prevenida pela manipulação conjunta ou separada do fotoperíodo e temperatura ou através da simulação de certos regimes termoperiódicos.

4.3.4 - Recipiente de criação

A escolha e dimensões do recipiente de criação (arena) depende dos hábitos alimentares, tamanho, comportamento, estágio de desenvolvimento do inseto. Potes de plásticos, redondos, transparentes, recobertos por filó, preso com elástico são os mais práticos pela facilidade do manuseio, limpeza e observação. Para permitir a ventilação e ao mesmo tempo impedir a fuga do inseto, pode-se recortar, parcialmente, as tampas dos pots e colar, nestas aberturas, tecidos resistentes, transparentes, semelhantes a “nylon” de malha fina. Para evitar canibalismo e a

transmissão e contágio de patógenos é interessante que as larvas sejam colocadas em recipientes individuais.

As larvas e as ninfas também podem completar o seu desenvolvimento sobre a própria muda da planta hospedeira, ambas dentro de gaiolas teladas, ou recobrindo-se a planta com plástico, tipo celulóide, transparente semi-rígido, provido de aberturas laterais, revestidas de filós, para permitir a ventilação.

Para insetos que se alimentam de caules e troncos, utilizam-se gaiolas entomológicas, com armação de metal revestidas por telas plásticas ou de metal. O tamanho da malha da tela deve ser tal, que impeça a fuga dos insetos. As dimensões das gaiolas serão escolhidas de acordo com as dimensões da planta hospedeira.

Gaiolas de acrílico transparente, com aberturas laterais revestidas por filós, também podem ser utilizadas, especialmente para afídeos.

4.3.5 - Nutrição

As larvas de interesse agrícola, dependendo da espécie, podem se alimentar das sementes, folhas, frutos, grãos ou das raízes, enfim são altamente diversificadas em seu alimento e modo de vida. As condições naturais sob as quais os insetos imaturos são encontrados precisam ser simuladas o mais aproximadamente possível, seja utilizando dietas naturais ou artificiais.

As espécies rizófagas e xilófagas apresentam muitos problemas para criação em cativeiro, devido a dificuldade de simular as condições ideais (umidade, textura, drenagem) requeridas para a manutenção do vigor e boas qualidades nutritivas da planta e, concomitantemente, simular as condições apropriadas para o desenvolvimento do inseto. Além disto, o controle dos agentes patogênicos também é dificultado. Acrescenta-se o fato de que algumas destas larvas possuem bactérias endo-simbiontes, que limitam o uso de dietas sintéticas ou semi-sintéticas pois estas, normalmente, requerem em suas formulações substâncias fungicidas e bactericidas para evitar o estabelecimento de agentes contaminantes.

5 – LABORATÓRIO

5.1 – Instalações

A organização e manejo dos recursos relacionados a criação de formas imaturas é muito importante para o sucesso do programa. A separação física das etapas proporcionam facilidade de execução das rotinas e proteção contra a disseminação de doenças e outros contaminantes.

5.1.1 – Recepção e triagem das amostras

Algumas formas imaturas e adultos, eventualmente emergidos, se locomovem de forma razoavelmente rápida. Para evitar riscos de os insetos escaparem, a manipulação deve ser feita em um local que atenda aos seguintes requisitos:

- a) bom isolamento externo, portas bem ajustadas, janelas e ralos telados;
- b) tamanho e disposição das janelas, devem permitir uma boa circulação de ar para evitar a proliferação de patógenos e permitir uma luminosidade adequada;
- c) móveis, pias, balcões e mesas revestidas de material resistente à ação dos produtos de limpeza e esterilização. Preferencialmente de cor branca para facilitar a visualização;
- d) para maior conforto e segurança, as ninfas e adultos devem ser manipulados dentro de uma câmara de triagem (Figura 1).

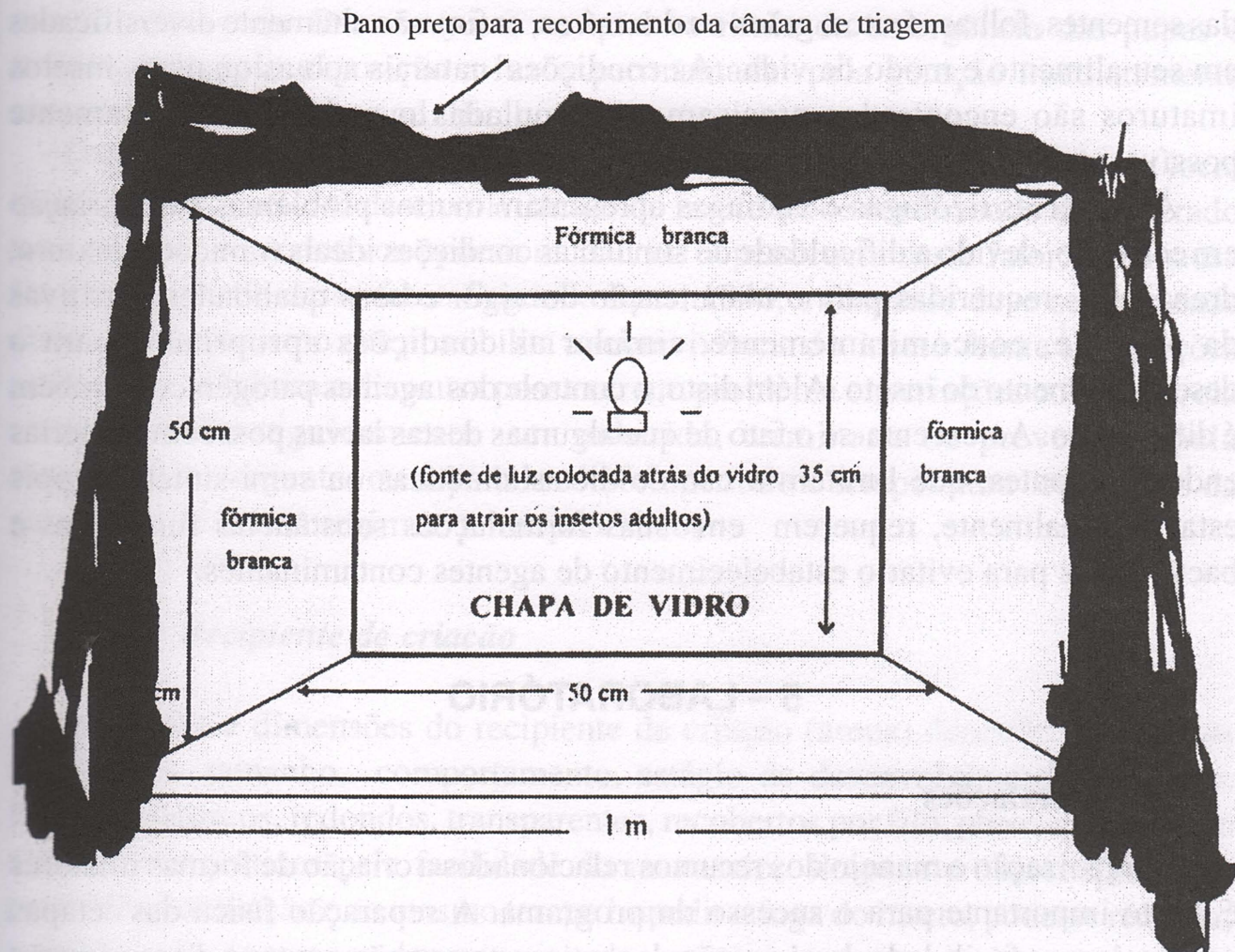


Figura 1 - Câmara para triagem de insetos.

e) Não é aconselhável o uso de vassouras, pois pisos e paredes devem ser pintados ou revestidos com material adequado a limpeza com pano umedecido com substâncias desinfetantes.

No Anexo 10 encontra-se a lista de materiais e equipamentos que podem facilitar esta tarefa.

5.1.2 – Ambiente para a manutenção de plantas hospedeiras

Quando não se dispõe da luz natural para a manutenção de estoques de mudas, o método mais usado para simular a luz natural e controlar a sua intensidade é a combinação de focos incandescentes e fluorescentes. A relação de potências pode ser uma incandescente para cada três fluorescentes. Um banco de lâmpadas, para uma área de crescimento de plantas, pode ser construído utilizando-se, por exemplo, um total de 12 lâmpadas fluorescentes de 40 watts. O espaço recomendado entre as lâmpadas é de 7,5 a 6,75 cm, em espaços maiores a intensidade de luz diminuirá. A intensidade de luz, necessária para produzir os efeitos desejados, depende das exigências mínimas das espécies de plantas usadas. Uma iluminação excessiva não apresenta tantos problemas como uma iluminação deficiente. Se há luz em demasia, é possível controlar a sua intensidade afastando o banco de iluminação das plantas ou apagando algumas lâmpadas (Barthelemy *et al* 1975).

O ideal é poder contar com uma casa de vegetação provida de algum sistema de irrigação, ventilação e iluminação para manutenção de estoque de plantas com a garantia da ausência de inseticidas e segurança quanto ao vigor e qualidade.

Os materiais e equipamentos relativos a este item estão relacionados no Anexo 10.

5.1.3 – Ambientes climatizados para manutenção dos insetos

O estabelecimento e manejo da temperatura, umidade relativa, intensidade de luz e fotoperíodo precisam ser considerados da forma mais segura possível e projetados por especialistas.

Bons resultados são obtidos no controle da temperatura e fotoperíodo com as estufas tipo B.O.D. (Biological Oxigene Demand), especialmente em pequenas criações de larvas com dietas naturais ou artificiais. O mais indicado é o modelo vertical, com controle eletrônico de temperatura, termômetro de leitura digital, com resolução de 0,1°C equipada com programador eletrônico horário, para 24 horas e fotoperíodo. A umidade necessária pode ser oferecida de forma suplementar, acrescentando-se recipientes com água, ou algodões umedecidos, colocados dentro da própria arena.

Algumas vezes, o hospedeiro possui um tamanho incompatível com o espaço interno de uma estufa B.O.D. Nestes casos, a temperatura, o fotoperíodo e a umidade podem ser estabelecidas em salas, com as dimensões e equipamentos necessários, especialmente planejadas para oferecer a climatização requerida.

Defeitos que ocorrem nos equipamentos são um sério problema nos programas de criação. As unidades de controle ambiental devem ser, preferencialmente, equipadas com alarmes que operem de forma audível e visual, para que, em caso de acidente, as medidas cabíveis sejam tomadas a tempo.

5.1.4 – Local para a preparação de dietas artificiais ou semi-artificiais

A preparação das dietas deverá ser feita, preferencialmente, em uma sala separada, provida de um balcão com pia, torneira de água, fogão, geladeira e demais materiais e equipamentos listados no anexo 10.

A vidraria esterilizada (tubos com tampas de rosca autoclaváveis para acondicionar as dietas, copos de Becker, provetas graduadas, Erlenmeyers, etc) deverá ser guardada em armários com porta para uma melhor proteção.

Os reagentes em pó, dependendo da quantidade, deverão ser pesados em balança analítica e para maiores quantidades, em balanças comuns. Os pequenos volumes deverão ser medidos com pipetas volumétricas ou com micropipetas automáticas. Toda a água utilizada deverá ser destilada e esterilizada em autoclave e secos em estufa. A vidraria e material inoxidável necessários para preparar a dieta também, deverão ser previamente esterilizadas.

As cabinas de fluxo-laminar vertical são muito efetivas para prevenir contaminações em dietas, no momento de sua transferência para os frascos de vidro esterilizado, na transferência das larvas para a dieta e em operações que exigem ambiente asséptico.

5.1.5 – Controle de doenças entomopatogênicas

Na criação de insetos existe o perigo real da introdução no laboratório de fungos, vírus, bactérias patogênicas, ácaros, muitas vezes junto com o próprio espécime ou com seu hospedeiro. Tanada (1963) aborda vários aspectos relacionados a virulência e infectividade de patógenos em insetos, inclusive os aspectos relacionados a maneira de transmissão em criações de laboratório. Lysenko (1963) apresenta uma revisão sobre a taxonomia de bactérias entomógenas, propondo alguns critérios para serem utilizados na taxonomia. Madelin (1963) aborda vários aspectos relacionados a virulência e infectividade de patógenos em insetos, alguns destes, relacionados ao modo de transmissão em culturas de

laboratório e apresenta vários aspectos relacionados às doenças causadas por fungos pertencentes aos gêneros *Beauveira*, *Metarrhizium*, *Isaria*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Sorosporium*, *Aegerita*, *Hirsutella* e *Acrostalagmus*. Steinhaus (1963) fornece uma orientação, terminologia e os principais passos para a diagnose de doenças em insetos.

5.1.5.1 - Descontaminação, esterilização, desinfecção e assepsia

A contaminação de dietas artificiais e semiartificiais é muito comum, deve-se ter muito cuidado para evitá-la. Singh e Moore (1985) e Vesley e Lauer (1995) apresentam as práticas de laboratório recomendadas para garantir a descontaminação, esterilização, desinfecção e assepsia do ambiente laboratorial. Os últimos autores, esclarecem conceitos, terminologia e apresentam protocolos para manutenção de superfícies, limpeza de pisos, descontaminação e esterilização de vidrarias. Os métodos para este propósito variam desde a utilização de autoclave, luz ultravioleta até a esterilização química. Aço inoxidável é o material mais usado em superfícies, devido a sua durabilidade e resistência aos agentes de limpeza e sanitização. Em grandes superfícies (paredes, piso, pias, balcões) podem ser usados os compostos clorados. A efetividade destes compostos como agentes de sanitização depende de vários fatores, tais como: tipo e concentração do composto clorado utilizado; pH; temperatura; período de contato; tipo de microorganismo e presença de material orgânico. Os compostos clorados incluem o sódio, hipoclorito de cálcio e os sais de ácido isocianúrico. Outros produtos químicos usados para limpeza e sanitização dos equipamentos incluem: produtos quaternários do amônio, hipoclorito de sódio a 0,5 %, formaldeído 37 - 40%, fenol a 5% e derivados. O hipoclorito de sódio é bastante utilizado, pois além do custo ser pequeno, apresenta boa estabilidade, solubilidade e baixa toxicidade para mamíferos. Além dessas vantagens, por ser um forte oxidante, inativa proteínas e elimina vírus, bactérias, fungos, algas e protozoários. É interessante também que os pisos recebam um tratamento diário com estes produtos. O iodo com boas propriedades germicidas, é menos efetivo que o hipoclorito contra os esporos de bactérias. Compostos quaternários de amônio não são tão efetivos como os hipocloritos na destruição de esporos de bactérias ou bactérias gram negativas.

Deve-se, sempre, ter presente na escolha dos desinfetantes para uso rotineiro em laboratório, a importância de dar preferência àqueles que apresentem nenhuma ou baixa toxicidade, que sejam solúveis em água e ativos em baixas concentrações, que os produtos de decomposição não sejam perigosos para o homem e não prejudiquem o meio ambiente, que não sejam inativados pela matéria orgânica,

que não sejam corrosivos, que sejam ativos em temperatura ambiente e que atuem sobre uma ampla gama de microrganismos. Neste posto de vista, Block (1991), apresenta o peróxido de ácido acético (ácido peracético) como detentor de todas estas características, tem efeito bactericida em concentração de 0,001%, fungicida a 0,003% e esporicida a 0,3%. Segundo este mesmo autor, o ácido peracético é biodegradável e os resíduos de decomposição são ácido acético, oxigênio, água e ácido sulfúrico diluído. Recomenda o seu uso nas grandes superfícies como paredes, piso, pias e balcões bem como em material que não possa ser autoclavado.

Para descontaminação das salas de criação ou nas salas, onde ocorreram insetos com doenças contagiosas ocasionadas por fungos, viroses e protozoários podem ser utilizadas pastilhas de paraformaldeído (Paraformax formaldeído na forma de vapor). Para esta operação, as salas deverão ser vedadas colocando-se cinco pastilhas, por metro cúbico, sobre bico de bunsen ou lamparina para uma liberação mais rápida do paraformaldeído. A atividade ótima de descontaminação ocorre a 80 a 90 % de umidade relativa. A remoção do paraformaldeído é um processo lento, exigindo uma boa ventilação e 2 a 3 dias até a sala poder ser reutilizada. Deve-se ter toda a precaução e cuidado com a utilização de formaldeído, pois este composto é cancerígeno.

De acordo com o tipo de material, poderão ser utilizados os seguintes métodos de esterilização: calor seco, úmido (geralmente aceito como o mais efetivo agente para inativação dos microrganismos) e lâmpadas germicidas, Vesley e Lauer (1995).

Calor seco: é a chamada esterilização por altas temperaturas e é usado para tubos de vidros para dieta (já tampados por algodão), placas de Petry, copos de Becker, pipetas e demais materiais resistentes ao calor. Os mais usados são estufas, nas quais se introduz o material a ser esterilizado por 3 horas a 150°C. Este procedimento é adequado para a maioria dos microrganismos, inclusive na forma de esporos.

Calor úmido: o mais recomendado é a aplicação de vapor sob alta pressão em autoclave (Temperatura de 121°C, pressão 103,5 Kpa), durante certo tempo (15 a 45 minutos), destrói todos os organismos vivos.

Irradiação: instrumentos que não suportam altas temperaturas podem ser esterilizados através de lâmpadas germicidas, por períodos em torno de 1 hora. Os raios ultravioletas são eficientes contra bactérias, fungos e vírus.

5.1.5.2 - Descarte de resíduos

Os resíduos em geral, dos recipientes de criação, das vidrarias etc., devem ser retirados e acondicionados em sacos plásticos, em locais separados, uma vez que

constituem focos de contaminação. Este material deve ser incinerado tão logo quanto possível.

6 – MANUTENÇÃO DOS INDIVÍDUOS EM LABORATÓRIO

6.1 - Posturas

Quando a criação do inseto inicia-se no estágio de ovo, os cuidados devem ser redobrados, pois será necessário mais tempo em condições controladas até conseguir-se o adulto.

Os ovos devem ser manipulados delicadamente com o auxílio de um pincel, ou pinça, transferidos para arenas contendo algodão umedecido com água destilada, forradas por papel filtro e tampadas por filó. As condições de temperatura e umidade relativa, deverão ser mantidas dentro dos parâmetros citados na literatura, para espécies afins ao grupo em que o ovo foi taxonomicamente enquadrado.

Segundo Wigglesworth (1972), o fator mais importante na taxa de desenvolvimento dos ovos é a temperatura: dentro dos limites vitais de cada espécie, o desenvolvimento é acelerado pelas temperaturas mais altas e retardado pelas mais baixas. Em muitos insetos, o desenvolvimento também pode ser retardado pela baixa umidade do ar circundante.

O desenvolvimento dos ovos é especialmente sensível à umidade. Por isto, deve ser proporcionada uma adequada circulação de ar, não só no ambiente como também na própria arena onde se coloca o ovo. Níveis inadequados de umidade podem acarretar a cessação do desenvolvimento, baixos níveis podem causar dessecação e níveis altos demais, o desenvolvimento de fungos.

A contaminação dos ovos por patógenos é facilitada pela alta umidade e temperatura, devendo-se ter muito cuidado com a esterilização do material. Em alguns casos, os próprios ovos podem ser esterilizados, entretanto, o tipo e a concentração da droga utilizada para a esterilização dos ovos deve ser pesquisada, pois há casos em que a esterilização pode comprometer o desenvolvimento larval. Isto pode acontecer, por exemplo, quando os ovos são portadores de bactérias endo-simbiontes, localizadas externamente ao ovo, a exemplo de alguns besouros crisomelídeos onde pequenas estruturas, contendo bactérias endo-simbiontes ficam aderidas à membrana do ovo no momento da oviposição (Ferronato, 1988).

Segundo Parra (1996), para uma esterilização externa dos ovos podem ser usados como bactericidas, sais solúveis como Hg, Ag e Cu, sendo bastante conhecida a solução de White: HgCl_2 (0,25 g); NaCl (6,5 g) HCl (1,25 ml); álcool

etílico (250 ml); água destilada (750 ml). O mesmo autor acrescenta que os metais pesados podem ser usados isoladamente, como o HgCl_2 a 0,1%, por um período de exposição de quatro minutos.

6.2 - Larvas e ninfas

6.2.1 – Manutenção de larvas em partes destacáveis do vegetal

Para insetos que, no seu habitat natural, se alimentam de folhas, frutos, bulbos, tubérculos ou sementes, a manutenção da dieta das larvas em cativeiro não apresenta maiores problemas. Estas partes do vegetal são relativamente fáceis de serem obtidas e oferecidas como alimento para as larvas, desde que: isentas de agrotóxicos, devidamente limpas com água corrente; retirado todo o eventual excesso de água sem qualquer resquício de dano (por fungos, bactérias ou vírus), diariamente substituídas, acondicionadas em arenas adequadas e mantidas em condições controladas de temperatura e umidade relativa.

Deve-se tomar os seguintes cuidados:

1. Escolher a arena de tamanho adequado à forma imatura. Manter um estoque desta arena devidamente limpa, em número suficiente para possibilitar a sua substituição diária, evitando que a larva ou ninfa permaneça muito tempo em contato com seus dejetos e restos de alimento.
2. Manter as arenas em estufas incubadoras, fornecendo as condições de temperatura, umidade relativa e fotoperíodo na faixa ideal.
3. Manter um estoque disponível do vegetal hospedeiro, de acordo com suas exigências de conservação (geladeira, etc.), desde que: isentas de agrotóxicos, devidamente limpas com água corrente, retirado todo o eventual excesso de água sem qualquer resquício de dano (por fungos, bactérias ou vírus).
4. Substituir diariamente a parte do vegetal oferecida como alimento à larva ou ninfa, por outra em boas condições nutricionais.

6.2.2 – Manutenção de larvas nas próprias plantas hospedeiras

Os cuidados que devem ser observados para a manutenção de larvas e ninfas na própria planta hospedeira, são os a seguir relacionados:

1. Cobrir a planta com uma estrutura de proteção telada, para permitir a ventilação, a entrada de luz para fotossíntese e cuja malha não permita a fuga dos insetos. Substituir a planta, sempre que necessário, por outra

em boas condições nutricionais.

2. Manter a planta que contem os insetos dentro dos limites de temperatura, umidade relativa, luz e fotoperíodo, anteriormente previstos como os recomendados para o desenvolvimento de espécies afins.
3. Manter um estoque suficiente de plantas jovens em casa de vegetação. Monitorar a quantidade de plantas para poder descartar as plantas cujas dimensões não estejam adequadas ao espaço climatizado disponível para a criação dos insetos.

6.2.3 – Manutenção de larvas rizófagas

As larvas que se alimentam das raízes de árvores de grande porte, especialmente às de último estágio, podem ser criadas nas mudas da planta hospedeira. As mudas das plantas devem ser previamente semeadas e devem ser substituídas sempre que necessário. O substrato para a plantação das mudas deve ser investigado. Tentativas com vermiculita esterilizada e solução nutritiva podem ser interessantes. A larva deve ser individualmente introduzida no substrato (solo, vermiculita) próxima às raízes. O uso de sacos plásticos preto são muito práticos como recipiente de cultivo, pois poderão ser facilmente rompidos, quando houver necessidade de transferir a larva para outra planta hospedeira. A manipulação da larva deverá ser feita com pincel ou pinça flexível (ponta arredondada) para evitar danos e o solo deverá ser cuidadosamente desagregado com as mãos.

Alguns crisomelídeos, pragas de *Theobroma cacao*, ilustram muito bem as dificuldades relacionadas à criação de espécies rizófagas em laboratório. As larvas de Eumolpinae (Coleoptera: Chrysomelidae) utilizam como alimento as raízes mais finas dos cacauzeiros, sendo muito difícil, senão impraticável, simular este habitat em laboratório. Estes insetos contam com bactérias endo-simbiontes para realizarem a digestão da celulose. Crowson (1981) afirma que existem bactérias endo-simbiontes no intestino dos Eumolpinae. Ferronato (1988) constata que os ovos dos Eumolpinae são portadores de bactérias endo-simbiontes que, posteriormente, serão ingeridas pelas próprias larvas. Becker e Ferronato (1990), constataram a presença destas mesmas bactérias endo-simbiontes nos órgãos internos de reprodução Eumolpinae. Em situações como esta, o uso de dietas sintéticas ou semi-sintéticas pode comprometer o desenvolvimento do inseto, uma vez que, normalmente, para evitar o estabelecimento de agentes contaminantes são incluídas na sua formulação algumas substâncias bactericidas.

6.2.4 – Manutenção de larvas xilófagas

Xilófagos também são insetos de difícil manutenção em laboratório. Um exemplo, que pode ilustrar esta dificuldade, é a praga conhecida como “vespa da madeira” *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae). Este inseto mantém relações simbióticas com o fungo *Amylostereum areolatum*, que reduz a umidade de madeiras verdes a níveis mais favoráveis para a postura, facilita a atividade de escavação das larvas e as supre com os nutrientes essenciais (Neumann *et al.*, 1986). Carvalho (1992) manteve as larvas de *S. noctilio* em seu hospedeiro natural, toretes de *Pinus taeda*, com 50 cm de comprimento e obteve sucesso na criação de *S. noctilio*. O autor tomou alguns cuidados extras para diminuir a perda da umidade dos pedaços de madeira, mergulhando as extremidades em parafina quente.

6.2.5 - Uso de dietas artificiais ou semi-artificiais na alimentação dos estágios imaturos

A formulação, execução e monitoramento de insetos criados em dietas artificiais é um capítulo especial da entomologia. Inúmeras formulações de dietas artificiais estão disponíveis na literatura, entretanto a maioria delas é destinada a casos cuja identidade é previamente conhecida e, portanto, os hábitos alimentares, biologia e demais exigências do inseto podem ser antecipadamente estabelecidos. Ressalta-se, que as necessidades nutricionais especiais de espécies só podem ser determinadas pela experimentação. Tendo em vista este risco é aconselhável que se mantenham, concomitantemente, alguns indivíduos em dietas naturais, para uma maior segurança, caso a dieta não funcione.

Além das dietas artificiais testadas, existe ainda a possibilidade de adicionar à formulação original de uma dieta conhecida, algumas modificações, outras combinações ou parte natural do vegetal. Estas últimas preparações são as chamadas de dietas semi-artificiais onde percentagens do alimento natural do inseto, macerado ou liquidificado é acrescentado a dieta original. As combinações e quantidades a serem acrescentadas (agar, água, elemento natural da própria planta, etc.) dependerão do bom-senso do técnico, tendo em vista a consistência final do produto.

A literatura sobre dietas é vastíssima, indicaremos apenas algumas de caráter mais geral. Vanderzant (1966) apresenta formulações de dieta para insetos fitófagos. Singh (1985) faz uma revisão das dietas artificiais para criação de múltiplas espécies. Apresenta a composição, preparação, temperatura, umidade relativa, luz para cada caso e fornece uma lista de espécies satisfatoriamente criadas nestas dietas. Este

mesmo autor, acrescenta as referências bibliográficas para dietas formuladas para múltiplas ordens, múltiplas famílias e múltiplos gêneros. No caso de insetos polípagos, formulações e preparações de dietas para múltiplas-ordens podem ser interessantes. Algumas espécies de Diptera; Lepidoptera; Coleoptera; Dictyoptera e Orthoptera foram total ou parcialmente criadas ou mantidas neste tipo de dieta. Entre as espécies testadas com sucesso, constam *Cidia pomonella* (Linnaeus) e *Carposina adreptella* (Walker). Fiuza (1995) apresenta uma formulação específica para Lepidoptera. Singh e Moore (1985) apresentam formulações de dietas para Cerambycidae. No Brasil, Parra and Panizzi (1991) e Parra (1996) apresentam os princípios gerais de nutrição, as exigências físicas, químicas e biológicas para o crescimento de várias espécies de insetos em dietas artificiais e a terminologia comumente usada. Em Parra (1996) pode-se consultar a composição, a seqüência do preparo e os cuidados sanitários necessários para a criação de insetos em meios artificiais. Em termos de dieta artificial, Parra (1996), recomenda, entre outros autores, a leitura de: Smith (1966); Rodriguez (1972); Singh (1977), Dickerson et al. (1980), Edwards et al. (1987); King e Moore (1985).

Na situação objetiva deste trabalho, onde não se conhece previamente a identidade do indivíduo, uma alternativa seria a combinação de dietas formuladas para a criação de múltiplas espécies, ordens, famílias ou gêneros propostas, por exemplo, em Singh (1985) combinadas a elementos naturais da planta hospedeira. Esta estratégia poderá, eventualmente, prover a dieta de alguma exigência alimentar específica que não conste na composição original que esteja sendo utilizada.

6.3 - Manutenção das pupas

O bom desenvolvimento deste estágio, em condições de laboratório, depende de um cuidadoso estudo dos hábitos do inseto. Alguns insetos fazem casulos em frestas de tronco de árvores, outros enrolados em folhas, outros no solo protegidos por casulos, outros diretamente no solo sem qualquer cobertura.

Os principais cuidados com as pupas são:

1. O casulo não deve ser artificialmente removido do lugar onde ocorreu a pupação. O local onde se desenvolverá o último estágio larval deverá prever a superfície onde o inseto irá empupar. No caso da pupa ser transferida para outro local, por questões de limpeza e sanitização, a superfície onde ela está fixada deverá permanecer junto com a pupa.
2. A temperatura deve ser observada: calor muito alto pode fazer o inseto emergir precocemente, e muito frio pode matar a pupa. Temperaturas próximas a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ atende à maioria dos casos.

3. Umidade é fundamental: água em excesso aumenta a proliferação de fungos; falta de água resseca a pupa ocasionando a sua morte.
4. Para evitar a proliferação de agentes patogênicos, pode ser realizada uma esterilização da superfície da pupa com solução de hipoclorito de sódio, como por exemplo a 0,2 % por 15 minutos (Parra, 1996). A concentração do hipoclorito de sódio precisa ser determinada experimentalmente ou através de parâmetros fornecidos, para espécies afins, na literatura. Após a esterilização, a pupa deve ser mergulhada diversas vezes em água destilada e colocada sob papel filtro esterilizado para retirada do excesso de água.
5. O recipiente para criação das pupas, salvo exceções, deve ser forrado com algodão esterilizado, levemente umedecido com água destilada, recoberto por papel filtro. Sempre que necessário, deve-se acrescentar gotas de água destilada. Este recipiente deve possuir aberturas, recobertas por tecido ou tela, que proporcionem ventilação. No caso de larvas que empupam no solo, toda a porção de solo que envolve a pupa deve ser retirada e colocada na arena.
6. Os parâmetros para o estabelecimento da umidade relativa devem ser buscados em espécies afins, que ocorram no local de origem das pupas em questão.

7 - PONTOS CRÍTICOS DO MÉTODO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

O ponto crítico mais importante, para a criação de formas imaturas de insetos em dieta artificial é a presença de todos os requerimentos nutricionais essenciais da espécie em questão na dieta. Para a criação, em dieta natural, o ponto crítico é a obtenção da sincronia entre o desenvolvimento e manutenção da qualidade do alimento (planta hospedeira) e as sucessivas etapas de desenvolvimento larval.

O resultado pode ser avaliado, observando-se o aspecto das estruturas do exoesqueleto do inseto. O aparecimento de mal formações em asas, patas, tamanho reduzido, ausência de partes do corpo, etc. são indicativos de falhas no método.

8 - IDENTIFICAÇÃO DOS INSETOS E COLEÇÃO DE REFERÊNCIA

Os imagos, resultantes da criação em laboratório, deverão ser identificados por especialista. Na obra “Quem é quem em entomologia” (Vilella, 1995) estão listados os diversos especialistas brasileiros nos diferentes grupos de insetos.

Os indivíduos que morrerem no decorrer do processo de criação, deverão ser etiquetadas e preservados de acordo com o estágio de desenvolvimento e grupo taxonômico. Dependendo da quantidade disponível, alguns indivíduos poderão ser sacrificados. Estas formas imaturas e respectivos imagos emergidos, poderão iniciar uma coleção de referência para o próprio laboratório ou incorporados em coleção de insetos de outra Instituição. No futuro, estas coleções auxiliarão e agilizarão sobremaneira as tarefas de determinação das espécies de interesse agrícola, servindo também para a digitalização de imagens com características morfológicas importantes para determinação além do registro histórico de sua ocorrência.

Em Vanzolini e Papavero (1967), Papavero (1994) e Almeida et al. (1998) poderão ser obtidas informações sobre a conservação, montagem e remessa de insetos para identificação, bem como as bases para organização de coleções de insetos.

Para garantir a conservação das larvas, Costa et al. (1988) recomenda submergi-las em água fervente pura, ou em solução de partes iguais de água fervente e álcool e em seguida transferi-las para álcool 70%. Estes mesmos autores acrescentam que em alguns casos usam-se como fixador KAA (1 parte de querosene, 2 partes de ácido acético glacial, 10 partes de álcool isopropílico) e finalmente para álcool 70%.

Todas as informações sobre o material de apoio taxonômico deverão ser organizadas em fichários, disquetes ou CDs. Materiais e equipamentos para auxiliar nesta etapa do trabalho estão listados no Anexo 10.1.

9 - LITERATURA CITADA

- ALMEIDA, L. M. de; RIBEIRO-COSTA, C. S.; MARINONI, L. 1998. Manual de coleta, conservação, montagem e identificação de insetos. Riberão Preto. Ed. Holos. 78p. (Série Manuais Práticos em Biologia).
- ANDERSON, D.M. et al. 1996. Chaves ilustradas para coleópteros adultos e larvas (Coleoptera) encontrados associados com madeiras em portos de

- entrada. Brasília, CENAGRI. 24p. (Documento da série Técnica do DDIV – MA.).
- ANDREWARTHA, H. G.; BIRCH, L.C. 1974. The Distribution and abundance of animals. Illinois The University of Chicago. 782 p.
- BARTHELEMY, R. E.; DAWSON, J. R.; LEE, A.E. 1975. Técnicas para el laboratorio de biología. Mexico, The University of Texas Science Education. 148 p.
- BECKER, M.; FERRONATTO, E. M. de O. 1990. The female organs of reproduction and of symbiont transmission of Eumolpinae feeding on cacao trees in Brazil (Coleoptera: Chrysomelidae: Eumolpinae). *Revista Brasileira de Biologia* 50 (4): 1003-1016.
- BLOCK, S.S. 1991. Peroxygen compounds, *In*: Block, S.ed. Desinfection, Sterilization, and Preservation. 4th ed. London, Lea & Febiger. pp.176-181.
- BOLES, H. P.; MARZKE, F. O. 1966. Lepidoptera infesting stored products. *In*: Smith, C. N. ed. Insect colonization and mass production. New York, Academic Press. pp. 259-270 .
- BÖVING; CRAIGHEAD. 1953. An illustrated synopsis of the principal larval forms of the order Coleoptera. *Entomolog Annual* 11(1): 1-351.
- CARVALHO, A.G. de. 1992. Bioecologia de *Sirex noctilio* F., 1793 (Hymenoptera: Siricidae) em povoamentos de *Pinus taeda* L. Tese de Doutorado. Curitiba, Universidade Federal do Paraná. 131p.
- CHAPMAN, R. F. 1969. The Insects, structure and function. The English Universities Press. 819p.
- CHU, H.F. 1946. The immature insects. Iowa, E.U.A. W.M.C. Brown Company Publishers. 234 p.
- CORSEIUL, E.; CRUZ, F. Z. da. 1970. Insetos de produtos agrícolas armazenados. Porto Alegre, Editora Meridional EMMA. 20p.
- COSTA, C.; VANIN, S. A.; CASARI-CHEN, S.A. 1988. Larvas de Coleoptera do Brasil. São Paulo, Universidade de São Paulo. 282 p.
- CROWSON, R. A. 1981. The biology of the Coleoptera. New York, Academic Press. 802 p.
- DICKERSON, W. A. et al. 1980. Arthropod species in culture in the United States and other countries. Maryland, ESA. 93 p.

- EDWARDS, D. R.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. 1987. Arthropod species in culture. Maryland, ESA. 49p.
- FERRONATTO, E.M. de O. 1984. Abundância de larvas e pupas de *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758)(Lepidoptera: Plutellidae) em *Brassica oleracea* L. var. *Acephala* D.C., mortalidade causada por parasitóides e biologia de *Tetrastichus sokolowskii* Kurdjmov, 1912 (Hymenoptera: Eulophidae). Dissertação de Mestrado. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 215p.
- FERRONATTO, E.M. de O. 1988. Eumolpinae associated with cacao trees (*Theobroma cacao* L.) in Southeast Bahia. In: Jolivet, P.; Petitpierre, E. Hsiao, T. H. eds. Biology of Chrysomelidae. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. pp. 553-558.
- FERREIRA, C. 1996. Estudo da longevidade, fecundidade e fertilidade em fêmeas do gafanhoto-crioulo *Rhammatocerus conspersus* (Bruner, 1904) (Orthoptera: acrididae: Gomphocerinae) em condições de laboratório. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 134p.
- FIUZA, L. M. 1995. Étude des sites récepteurs et de la toxicité des d-endotoxines de *Bacillus thuriengiensis* Berliner chez les larves de la pyrale du riz *Chilo suppressalis* Walker. These Doctorat.Montpellier, École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier. xp.
- GALLO, D. et al. 1978. Manual de Entomologia agrícola. São Paulo, Ed. Agronômica CERES Ltda. 531p.
- HADDAD M. L.; PARRA, J.R.P. 1984. Métodos para estimar os limites térmicos e a faixa ótima de desenvolvimento das diferentes fases do ciclo evolutivo dos insetos. Piracicaba, FEALQ. 12 p.
- HAREIN, P. K.; SODERSTROM, E. L. 1966. Coleoptera infesting stored products. In: Smith, C. N. ed. Insect colonization and mass production. New York, Academic Press. pp.241-257.
- HAYHURST, H.; CHEM, A.M.I. 1942. Insect pests in stored products. Londres, Chapman and Hall Ltd. 108p.
- HINTON, H. E. 1946. On the homology and nomenclature of the setae of Lepidopterous larvae, with some notes on the phylogeny of the Lepidoptera. Transactions Research Entomology Society of the London 97: 1-37.

- IMMS, A.D. 1957. A General textbook of entomology. Including the anatomy, physiology, development and classification of insects. London. Methuen and Co. Ltda. 419 p.
- KING, E.G.; LEPPLA, N.C. eds. 1984. Advances and Challenges in insect Rearing, USDA, ARS. 306p.
- LAWSON, F.A. 1959. Identification of the Nymphs of Common families of Hemiptera. Journal of Kansas Entomological Society 32(2).
- LEES, A. D. 1955. The physiology of diapause in Arthropods. Cambridge, University Press. 150p.
- LYSENKO, O. 1963. The Taxonomy of Entomogenous Bacteria. *In*: Steinhaus, E. A. ed. Insect pathology an advanced treatise. London, Academic Press, v.2, pp. 1-20.
- MANDELIN, M.F. 1963. Diseases caused by Hyphomycetous Fungi. *In*: Steinhaus, E. A. ed. Insect pathology an advanced treatise. London, Academic Press, v.2, pp. 233-271.
- METCALF, C.L.; FLINT, R.L. 1965. Destructive and useful insects. Nova Deli, Tata McGraw-Hill. 1087p.
- NEUMAN, F.G.; MOREY, J.L.; MCKIMM, R.J. 1986. The sirex wasp in Victoria. Victoria, Lands and Forest Division, Department of Conservation. 41p.
- PAPAVERO, N. 1994. Fundamentos práticos de taxonomia zoológica: coleções, bibliografia, nomenclatura. São Paulo, UNESP. 285p.
- PARRA, J. R. 1996. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. 3ed. Piracicaba, ESALQ. 137p.
- PARRA, J. R.; PANIZZI, A. R. 1991. Ecologia Nutricional de insetos e suas implicações ao manejo de pragas. São Paulo, Ed. PAN. 359p.
- PETERSON, A. 1960 Larval of insects. Columbus, Ohio, v.1, 315p., v.2, 416p.
- RODRIGUEZ, J. G. ed. 1972. Insect and mite nutrition. Significance and implications in ecology and pest management. Amsterdam, North Holland Publishing Company. 702 p.
- STEHR, F. 1987. Immature Insects. Michigan, Hunt Publishing Company. 754 p. v.1.

- STEHR, F. 1991. Immature insects. Michigan, Hunt Publishing Company. 975p. v.2.
- SINGH, P. 1983. A general purpose laboratory diet mixture for rearing insects. *Insect Science Applied* 4: 357-362.
- SINGH, P. 1985. Multiple-species rearing diets. In: Singh, P.; Moore, R.F. eds. *Handbook of insect rearing*. Amsterdam, Elsevier Science. Publishing Company Inc., pp 19-44 .
- SINGH, P.; ASHBY, M.D. 1985. Insect rearing management. In: Singh, P.; Moore, R.F. Eds. *Handbook of Insect Rearing*. Amsterdam, Elsevier Science. Publishing Company Inc. pp.185-215.
- SINGH, P.; MOORE, R.F. 1985. *Handbook of insect rearing*. Amsterdam, Elsevier. Science Publishing Company Inc. 488p. v.1.
- SMITH, C.N. 1966. *Insect Colonization and massal production*. New York, Academic Press. 612p.
- SNODGRASS, R. E. 1935. *Principles of insect morphology*. New York, Mc Graw-Hill. 667p.
- STEINHAUS, E. A. 1963. Background for the Diagnosis of Insect Diseases. In: Steinhaus, E. A. ed. *Insect Pathology An Advanced Treatise*. London, Academic Press. pp.549-589. v.2.
- TANADA, Y. 1959. Microbial diseases of insects. *Annual Review Microbiology* 11: 165-182.
- VANDERZANT, E.S. 1966. Defined diets for phytopagenus insects. In: Smith, C. N. ed. *Insect colonization and mass production*. New York, Academic Press. pp.273-303.
- VANZOLINI, P. E.; PAPAVERO, N. 1967. *Manual de coleta e preparação de animais terrestres e de água doce*. São Paulo, SAESP. 223p.
- VESLEY, D.; LAUER, J.L. 1995. Decontamination, sterilization, disinfection, and antisepsis. In: *Laboratory Safety. 2nd. Principles and practices*. pp. 219-237.
- VILLELA, E. F. 1995. Quem é quem em entomologia. Catálogo dos entomólogos Brasileiros. Sociedade Entomológica do Brasil. (publicação avulsa).
- WIGGLESWORTH, V. B. 1938. *Insect physiology*. London, Methuen of Co. Ltd. 134 p.

- WIGGLESWORTH, V. B. 1954. The Physiology of insect metamorphosis. Cambridge, University Press. 151p.
- WIGGLESWORTH, V. B. 1972. The Principles of insect physiology. London, Chapman and Hall Ltd. 741p.
- WEISMAN, D. M. 1996. Chaves para identificação de algumas lagartas de Lepidópteros freqüentemente interceptadas. Brasília, CENAGRI. 63p.
- 

10 – ANEXOS

10.1 – Materiais e equipamentos

Recepção e triagem das amostras

- câmara de triagem (Figura 1);
- aspirador de insetos;
- bandejas de plástico brancas;
- pinças entomológicas, pincéis;
- potes plásticos transparentes com tampas;
- sacos plásticos transparentes de diversos tamanhos;
- gaiolas entomológicas.

Manutenção de plantas hospedeiras

- bancadas para apoiar os vasos com plantas;
- armações com telas ou celulóides para fixar nos vasos e proteger as plantas contra ataque de insetos, gaiolas entomológicas;
- estoque de solo peneirado;
- sacos plásticos pretos, de variados tamanhos, para plantar e transplantar mudas da planta hospedeira quando necessário; vasos para plantar mudas de variados tamanhos;
- peneiras para solo, pás, enxadas, colher de jardineiro, regadores, serrote, tesoura de podar, machado pequeno;
- vaporizadores de água, mangueiras;
- bandejas de plástico branco;
- luvas plásticas;
- armadilhas de luz;
- sementes selecionadas.

Preparação de dietas artificiais

- seringas descartáveis, bicetas;
- espátulas, colheres, pinças entomológicas retas e curtas;
- etiquetas, pincéis;
- erlenmeyer (50 a 1000 ml); provetas graduadas (10 a 1000 ml), pipetas graduadas (1, 5 e 10 ml), micropipetas automáticas (10 a 1000 microlitros), pipetas volumétricas, copos de Becker (100 a 2000 mL);
- balança de precisão - para pesagem dos ingredientes da dieta;
- balança comum;
- fogão - para cozimento do meio;
- destilador de água;
- pia e prateleiras;
- freezer, refrigerador;
- autoclave, estufas;
- liquidificador, triturador de grãos;
- câmara asséptica (fluxo laminar), câmara com lâmpada germicida;
- bandejas plásticas e inoxidáveis, almofariz;
- potenciômetro para medição de pH.

Consulta bibliográfica, exame, preparação e coleção de insetos

- equipamento para captura de imagens (produzidas no próprio laboratório ou adquirida de outras fontes) acoplado a computador, Cds, disquetes;
- fichários com a relação da literatura do laboratório e demais informações relevantes dos procedimentos e resultados;
- listas de insetos registrados nas culturas vegetais (de interesse do laboratório);
- bibliografia atualizada referentes a identificação, biologia, fisiologia, comportamento e ecologia, hospedeiras dos insetos, por local de origem;
- prateleiras com caixas entomológicas, vidros de diversos tamanhos e

móveis para organizar a coleção de insetos e literatura;

- microscópio estereoscópico binocular: oculares de 15 x e 20 x e ocular adicional com retículo micrométrico; objetivas de 0,7 x a 4-5 x; Câmara fotográfica acoplável;

- microscópio binocular, com contraste de fase, 200x, com oculares de 15 x, com objetivas de 4 x, 10 x, 40 x e 100 x e com ocular adicional com retículo micrométrico (1mm com 200 divisões). Câmara fotográfica acoplável;

- lâminas e lamínulas; alfinetes entomológicos; bisturis; pincéis finos (0, 00, 000); agulhas histológicas, placas de Petry; vidros relógio;

- lupas de mão.

