

Campina Grande, PB / Abril, 2024

Produção de *Jaliscoa (Catolaccus) grandis* e *Bracon vulgaris* (Hymenoptera), parasitoides do bicudo-do-algodoeiro¹

Raul Porfirio de Almeida⁽¹⁾, Carlos Alberto Domingues da Silva⁽¹⁾ e José Geraldo di Stefano⁽²⁾⁽¹⁾Pesquisadores, Embrapa Algodão, Campina Grande, PB. ⁽²⁾Analista, Embrapa Algodão, Campina Grande, PB.

Introdução

Uma criação bem-sucedida de inimigos naturais depende, entre muitos aspectos, da utilização de hospedeiro que favoreça o desenvolvimento e reprodução dos insetos e, ao mesmo tempo, que suas características biológicas e ecológicas sejam semelhantes às condições encontradas na natureza, de forma a exercer o controle biológico eficientemente (Lenteren et al., 2003).

De preferência, para criação dos parasitoides, devem-se escolher hospedeiros comumente encontrados como suas presas nos agroecossistemas. Entretanto, esses hospedeiros nem sempre são fáceis de serem criados em condições laboratoriais, quer seja por não se encontrarem os recursos alimentares prontamente disponíveis e em quantidade adequada para suprir as necessidades nutricionais, quer ainda pela dificuldade de manipulação e uso intenso de mão de obra exigida para sua produção. Assim, a utilização de dietas artificiais (Parra, 2012) em substituição às dietas naturais pode atender esse requisito por assegurar, em vários casos, a facilidade de manipulação, assepsia e qualidade nutricional, para o desenvolvimento adequado do inseto hospedeiro e consequentemente dos parasitoides.

Na cultura algodoeira, o bicudo *Anthonomus grandis* Boheman, 1834 (Coleoptera: Curculionidae) é o principal inseto-praga no Brasil desde seu surgimento em 1983, podendo atingir altos níveis de infestação e causar, conseqüentemente, sérias injúrias e perdas de produção, culminando em prejuízos econômicos capazes de inviabilizar a lavoura (Barbosa et al., 1983; Araújo et al., 1990; Ramalho; Santos, 1994; Almeida, 2000).

A fim de evitar tais prejuízos, agricultores têm feito uso principalmente de medidas de controle químico, que nem sempre respondem com eficácia desejada, podendo induzir à ocorrência de efeitos indesejados, tais como a resistência a moléculas inseticidas, desequilíbrio biológico por eliminação de inimigos naturais, ressurgência de insetos-praga e surgimento de pragas secundárias (Almeida, 2000; Ramalho et al., 2000; Almeida et al., 2008).

Entre os parasitoides do bicudo-do-algodoeiro, destacam por sua importância *Jaliscoa grandis* Burks, 1954 (= *Catolaccus grandis*) (Hymenoptera: Pteromalidae) (Gibson, 2013) e *Bracon vulgaris* Ashmead, 1894 (Hymenoptera: Braconidae) (Cate et al., 1990; Morales-Ramos; Cate, 1992a; Araújo et al., 1993; Pierozzi Junior; Habib, 1993a; Wanderley;

¹Os recursos financeiros para o custeio das ações deste Acordo de Cooperação Técnica foram provenientes da Amipa, por intermédio do Fundo Algominas.

Ramalho, 1996; Ramalho; Dias, 2003; Wanderley et al., 2007; Cardoso et al., 2009; Ramalho et al., 2011; Alves et al., 2015), cuja ocorrência foi registrada no Brasil na década de 1980 (Pierozzi Junior et al., 1985; Ramalho et al., 1986; Bleicher; Broglio-Micheletti, 1988).

Esses himenópteros parasitam as larvas do bicudo-do-algodoeiro em botões florais e/ou maçãs, reduzindo a taxa de emergência dos insetos adultos na lavoura (Cross; Mitchell, 1969; Ramalho; Silva, 1993; Summy et al., 1997; Ramalho et al., 2000) e se constituem em uma das principais causas de mortalidade do inseto-praga (Pierozzi Junior; Habib, 1993b; Ramalho et al., 1993; Cardoso et al., 2009), com potencial de serem utilizados de forma simultânea e complementar (Ramalho et al., 2007).

Com a utilização de drones – ou veículo aéreo não tripulado (Vant) – e sua aplicação na liberação de inimigos naturais (Almeida, 2020; Almeida et al., 2021), o controle biológico aplicado tem se consolidado como uma ferramenta indispensável nos programas de manejo integrado de pragas (MIP), assumindo a verdadeira importância, que havia sido relegada há pelo menos quatro décadas, apesar de ser reconhecido como uma das táticas mais importantes do MIP. Além disso, o controle biológico pode ser considerado um dos principais componentes indutores da manutenção do equilíbrio biológico dos agroecossistemas.

A eficácia de *J. grandis* sobre infestações do bicudo em algodoeiros foi demonstrada no Mississippi (Johnson et al., 1973), Texas central (Cate et al., 1990), Alabama (Morales-Ramos et al., 1994), região do Baixo Vale do Rio Grande (Summy et al., 1992, 1994; King et al., 1995a,b) e sul do Texas (Summy et al., 1995, 1997). Liberações semanais de 1.250 fêmeas aca-saladas por hectare, por seis semanas consecutivas, foram suficientes para obter um excelente controle do bicudo, eliminando seus danos econômicos (Coleman et al., 1996; King et al., 1995a, b; Summy et al., 1995). No Brasil, liberações de *J. grandis* reduziram a infestação do bicudo-do-algodoeiro em até 83% (Ramalho et al., 2000).

Na metodologia de produção dos parasitoides *J. grandis* e *B. vulgaris* aqui apresentada, se utilizou como hospedeiro o bicudo-do-algodoeiro, criado em dieta artificial. Neste trabalho, os procedimentos foram gerados a partir de adaptações/desenvolvimento de processos de produção dos parasitoides/hospedeiro, com a realização do projeto de cooperação Embrapa Algodão / Associação Mineira dos Produtores de Algodão (Amipa) (Almeida et al., 2023). A publicação está alinhada à agenda 2030 por meio do Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 2 - Fome Zero e Agricultura Sustentável.

Produção do bicudo-do-algodoeiro

Para a criação e multiplicação do bicudo-do-algodoeiro *A. grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), recomenda-se a utilização de dieta artificial. Quatro etapas devem ser consideradas para sua criação, descritas a seguir:

Etapa 1. Preparo de dieta artificial para criação de bicudo (larvas e adultos)

O preparo é baseado na dieta descrita por Monnerat et al. (2000) e Schmidt et al. (2001), com algumas modificações. O procedimento consiste, inicialmente, na pesagem dos ingredientes, que são depositados na sequência de 1 a 6 (Tabela 1) em saco de plástico termorresistente para utilização em autoclave. Devem ser utilizados dois sacos sobrepostos para prevenir o vazamento da dieta em caso de perfuração de um dos sacos.

Em seguida é adicionada água destilada conforme o montante desejado. Os sacos com os ingredientes devem ser fechados e acondicionados em um becker para ser autoclavado (processo de cozimento da dieta).

Para esterilização dos ingredientes, deve-se utilizar, de preferência, autoclave com programação automática. Caso contrário, fazer a regulação da autoclave para: (1) pressão de 1 ATM; (2) temperatura: 120 °C; e (3) duração de 20 minutos após ser atingida a temperatura de esterilização. O tempo para finalização da esterilização tem duração de cerca de 1 hora e 45 minutos.

Ao término da esterilização, os sacos contendo os ingredientes são retirados da autoclave e agitados, para dissolver os grumos e homogeneizar a dieta líquida cozida. Em seguida, a dieta é transferida para o béquer. Os ácidos ascórbico e sórbico, os sais de Wesson e o metil paraidroxibenzoato (nipagin) são adicionados aos ingredientes no béquer e misturados com colher de pau, para dissolução. Antes de serem adicionados à dieta líquida, os ácidos ascórbico e sórbico, já pesados, podem ser acondicionados no mesmo recipiente, mas os sais de Wesson e o nipagin devem ser mantidos individualizados antes de misturá-los. O nipagin é dissolvido separadamente em álcool etílico 92,8° (10,0 mL) para facilitar sua incorporação na dieta.

Por último, adiciona-se a solução vitamínica à dieta, agitando-se novamente seu conteúdo. A solução vitamínica somente deverá ser adicionada à dieta quando ela estiver a uma temperatura abaixo de 60 °C. O preparo da solução vitamínica é realizado com os ingredientes descritos na Tabela 2, dependendo do volume de água destilada requerido.

Tabela 1. Ingredientes (em g) da dieta artificial do bicudo-do-algodoeiro para três volumes de água destilada.

Ingredientes	Água destilada (mL)		
	500	1.000	1.500
1 - Proteína de soja ^(1,2)	33,33	66,67	100,00
2 - Germe de trigo ^(1,2)	20,00	40,00	60,00
3 - Levedo de cerveja ⁽¹⁾	20,00	40,00	60,00
4 - Açúcar cristal	20,00	40,00	60,00
5 - Ágar	13,33	26,67	40,00
6 - Pharmamédia ⁽¹⁾	13,33	26,67	40,00
7 - Ácido ascórbico	6,67	13,33	20,00
8 - Ácido sórbico	0,80	1,60	2,40
9 - Sais de Wesson	3,33	6,67	10,00
10 - Nipagin ⁽³⁾	0,67	1,33	2,00
Nº de placas de Petri produzidas	20	40	60

⁽¹⁾ Ingredientes conservados em geladeira.⁽²⁾ Ingredientes triturados em moinho para homogeneização antes de seu uso.⁽³⁾ Metil parahidroxibenzoato.**Tabela 2.** Ingredientes (em g) para o preparo de solução vitamínica⁽¹⁾.

Ingredientes	Água destilada (mL)		
	500	1.000	1.500
1 - Ácido ascórbico	6,00	12,00	18,00
2 - Pantotenato de cálcio	0,15	0,30	0,45
3 - Ácido nicotínico (Niacina)	0,075	0,150	0,225
4 - Riboflavina	0,040	0,080	0,120
5 - Tiamina HCL	0,020	0,040	0,060
6 - Piridoxina HBC (B6)	0,020	0,040	0,060
7 - Ácido fólico	0,040	0,080	0,120

⁽¹⁾ A solução vitamínica deve ser conservada em geladeira.

Após o preparo, a dieta será utilizada para criação e multiplicação de larvas (1) e de adultos (2) do bicudo-do-algodoeiro. Em câmara de fluxo laminar (Figura 1A), a dieta, ainda em estado líquido, mas resfriada, é vertida em placas de Petri (9,0 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) (Figura 1B) ou recipientes de plástico (Figura 1C) para solidificação. A dieta contida nas placas de Petri e nos recipientes de plástico será destinada à criação de larvas e de adultos do bicudo, respectivamente. Esses recipientes devem estar devidamente limpos e higienizados antes de receber a dieta.

Para conservação da dieta, tanto as placas de Petri como os recipientes devem ser acondicionados em refrigerador por um período máximo entre 30 e 40 dias. As placas com dieta devem ser mantidas

emborçadas, a fim de evitar a condensação de líquidos sobre a dieta. Cada litro e meio de dieta produz aproximadamente 60 placas de Petri (Tabela 1).

Etapa 2. Criação e multiplicação do bicudo-do-algodoeiro adulto em dieta artificial

A criação e multiplicação do bicudo deve ser iniciada com uma população previamente adaptada à dieta artificial e mantida no laboratório em condições controladas. Os insetos adultos devem ser criados em temperatura de $25,0 \pm 2,0$ °C; umidade relativa do ar de $70,0 \pm 5,0\%$ e fotoperíodo 12h:12h (foto-fase: escotofase). Nas salas climatizadas, devem ser utilizados, caso necessário, umidificadores para

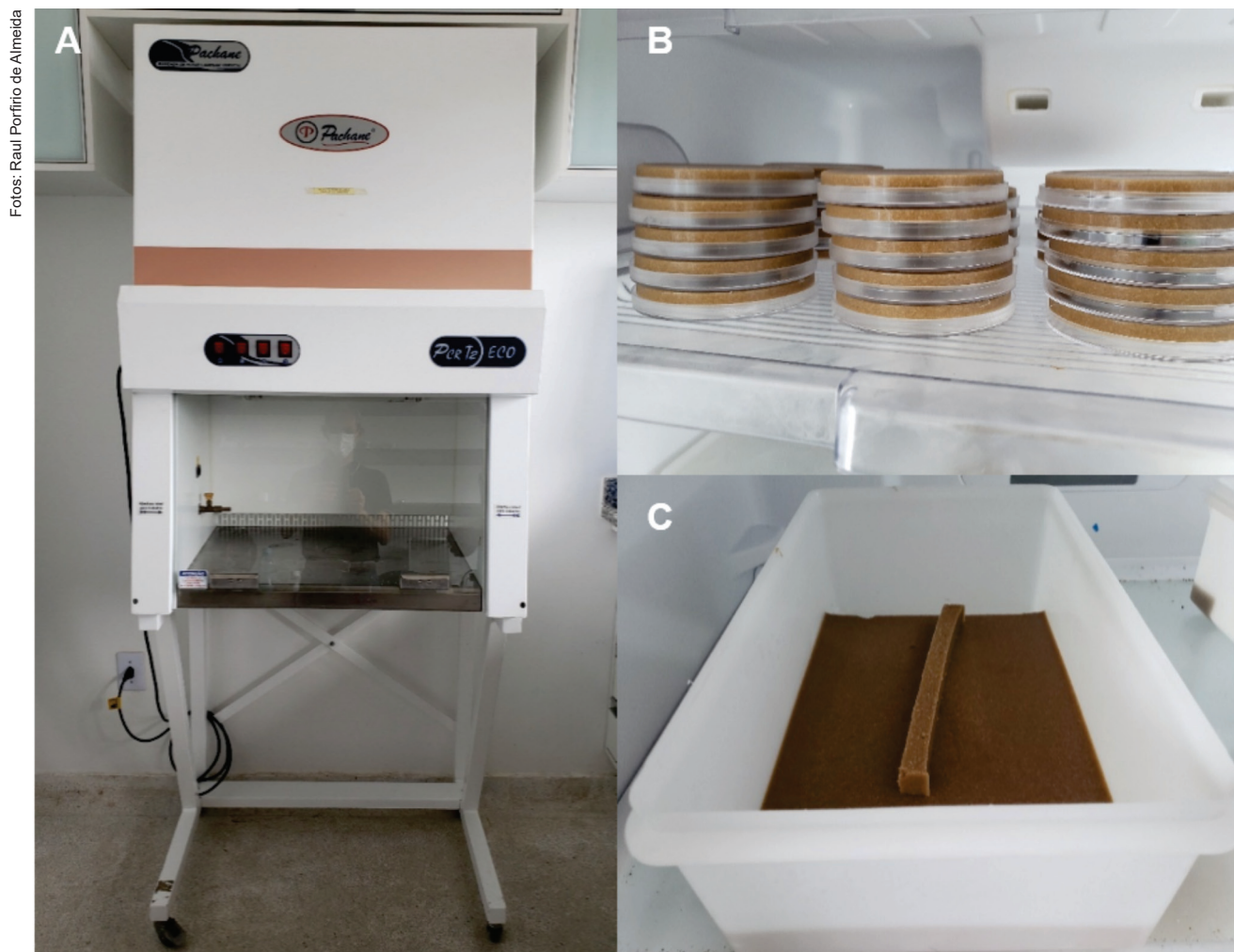


Figura 1. Acondicionamento de dieta artificial utilizada para criação de larvas e adultos do bicudo-do-algodoeiro: câmara fluxo laminar (A); placas de Petri com dieta para larvas (B); recipientes com dieta para adultos do bicudo (C).

manter o ambiente nas condições ideais ao desenvolvimento dos insetos.

Os insetos devem ser criados em unidades de produção, ou seja, gaiolas (Figura 2A), que são constituídas por dois recipientes de plástico, medindo 27,5 cm de comprimento, 17,0 de largura e 9,5 cm de altura, sendo um sem fundo, substituído por tela de plástico (Mesh 80) para passagem de ovos e excrementos do bicudo; e outro com fundo, de igual tamanho, que recebe o primeiro, para recepção dos ovos e excrementos (Figura 2B).

Um saco de tecido do tipo *voile*, medindo 31,0 cm de comprimento e 48,0 cm de largura, é utilizado para revestir os dois recipientes mencionados acima. Esse saco é fechado com a utilização de ligas de borracha (duas), para evitar o acesso à insetos oportunistas (dípteros), possibilitando, como consequência, a contaminação por microrganismos. Cada gaiola deve conter 750 casais. O dimorfismo sexual do bicudo deve ser verificado pela avaliação da

genitália de machos e fêmeas na parte final ventral do abdômen (Figuras 2C e 2D).

Para dificultar a saída dos bicudos das gaiolas, deve-se utilizar vaselina sólida (Figura 2E) aplicada com pincel, com uma faixa de 1,0 a 2,0 cm de largura na parte mediana interna da parede do recipiente com tela.

Antes da montagem de novas gaiolas para criação e multiplicação do bicudo, estas devem ser previamente limpas com hipoclorito de sódio (10%), enxaguadas e deixadas para secar antes de serem utilizadas.

Para alimentação dos bicudos adultos, são colocados dois filetes de dieta (17,0 cm de comprimento x 1,0 cm de largura x 1,5 cm de altura) (Figuras 2F e 2G). A cada 2–3 dias, os filetes devem ser substituídos por outros novos, para evitar que os insetos fiquem sem alimento, prejudicando sua longevidade e reprodução. Os insetos são mantidos em postura nas gaiolas de criação por um período de $40,0 \pm 5,0$ dias.



Fotos: Raul Porfírio de Almeida

Figura 2. Criação e sexagem de adultos do bicudo-do-algodoeiro: gaiolas de criação do bicudo (A); recipientes constituintes da gaiola (B); genitália da fêmea do bicudo (C); genitália do macho do bicudo (D); vaselina sólida (E); gaiolas com filetes de dieta artificial (F e G).

Etapas 3. Coleta, assepsia e inoculação de ovos do bicudo em dieta artificial

A cada 2 dias, ovos do bicudo-do-algodoeiro são coletados de cada gaiola de criação e multiplicação de adultos, conjuntamente com os restos de dieta, fezes e partes do corpo dos insetos eventualmente mortos. Com auxílio de pisseta, os ovos, restos de dieta e parte do corpo do inseto são removidos da gaiola com água destilada (opcional) e transferidos para um béquer (Figura 3A). Em seguida, todo o conteúdo é transferido para peneira (abertura 600 micros) sobreposta em uma outra peneira (abertura 300 micros), para recepção dos ovos do bicudo (Figura 3B). A primeira peneira retém as partículas maiores (restos de dietas, fezes e partes de insetos mortos), enquanto a parte mais fina (resíduos), juntamente com os ovos, ficará retida na segunda peneira. O conteúdo da segunda peneira é submetido à água corrente para dissolver parte da dieta ainda não dissolvida. Com auxílio de pincel e com movimentos suaves, os grumos da dieta são dissolvidos, restando os ovos do bicudo-do-algodoeiro, porém, com uma menor quantidade de impurezas (Figura 3C).

O material da peneira (abertura 300 micros) é, então, transferido com água destilada para outro béquer (Figura 3D), para decantação e separação das impurezas localizadas na porção sobrenadante. As impurezas são retiradas com pipeta de Pasteur ou simplesmente despejadas, e na medida que o volume de água diminui é completado com água para facilitar a retirada das impurezas. Durante esse procedimento, deve-se ter o cuidado para não eliminar os ovos que se encontram no fundo do recipiente, juntamente com a parte que não foi dissolvida. Esse processo deverá ser repetido algumas vezes até eliminar a maior quantidade de impurezas sobrenadantes.

Após a retirada do máximo possível de impurezas, os ovos são transferidos novamente para peneira (abertura 300 micros) para escoamento e remoção da água com papel-toalha (absorvente) retido no fundo (parte externa) da peneira (Figura 3E). Ainda na peneira e com auxílio de uma pisseta, aplica-se uma solução de sulfato de cobre a 20% e transfere-se para um novo béquer, adicionando-se um pouco mais da solução (Figura 3F). Com essa solução, os ovos do bicudo migram para superfície (sobrenadante), e a parte de dieta não dissolvida, sedimenta. Os ovos são vertidos juntamente com a solução de sulfato de cobre na peneira (abertura de 300 micros).

A solução de sulfato de cobre utilizada não deve ser desprezada, podendo ser reutilizada para esse procedimento por diversas vezes, até que comece a perder suas propriedades para separação dos ovos, quando então deverá ser descartada e substituída por uma solução nova.

Na peneira, os ovos são lavados com água corrente ou destilada para remover o resíduo da solução de sulfato de cobre (Figura 3G). Em seguida, transferem-se os ovos com água destilada para um béquer ou outro recipiente e, com uma pipeta de Pasteur, são retirados os detritos que persistiram (Figura 3H).

Para dimensionar o número de placas de Petri a serem inoculadas com ovos do bicudo, deve-se medir o volume do líquido coletado com auxílio de uma proveta de 10,0 mL (Figura 3I). O volume obtido desse líquido, composto por ovos e água destilada dividido por 0,15 (mL), corresponderá ao número de placas de Petri com dieta que serão necessários para inoculação dos ovos e desenvolvimento das larvas do bicudo. Após a medição do volume, os ovos são separados do líquido em peneira (abertura 300 micros) e lavados com solução de cloreto de benzalcônio a 0,3% (Figura 3H), sendo transferidos para um béquer (50 mL) até completar 15 mL dessa solução (Figura 4A). Os ovos devem permanecer nessa solução por um período mínimo de 30 minutos para desinfecção.

Antes de inocular os ovos do bicudo na dieta contida nas placas de Petri, estas devem ficar emborcadadas, ou seja, com a tampa voltada para baixo, para evitar a formação de umidade sobre a dieta durante o processo de resfriamento (Figura 4B).

Com todas as placas de Petri na posição correta, as tampas são retiradas. Com escova de plástico (masculina), são feitas perfurações na dieta, girando-se a placa para que os orifícios sejam feitos de forma homogênea em toda a superfície da dieta (Figura 4C). Isso facilita a penetração dos ovos na dieta e, conseqüentemente, das larvas ao eclodirem.

A inoculação dos ovos do bicudo na dieta deve ser feita em câmara de fluxo laminar, para evitar contaminação com microrganismos (Figura 4D). Uma alíquota (1,0 mL) de ovos + cloreto de benzalcônio é depositada na superfície da dieta com uma pipeta de Pasteur.

Com movimentos de inclinação e rotação da placa de Petri, os ovos na solução são espalhados e distribuídos em toda a superfície da dieta contida na placa. A solução excedente (ovos + cloreto de benzalcônio) deve ser utilizada na placa seguinte e assim sucessivamente. Caso necessário, pode-se adicionar mais solução pura para facilitar a



Figura 3. Coleta e assepsia de ovos do bicudo-do-algodoeiro em dieta artificial: coleta de ovos do bicudo (A); transferência de ovos para peneira (B); dissolução de dieta com pincel (C); transferência de ovos para béquer (D); remoção do excesso de água dos ovos com papel-toalha (E); aplicação de sulfato de cobre (F); remoção de sulfato de cobre (G); remoção de detritos com pipeta de Pasteur (H); medição do volume de ovos (I); lavagem de ovos com cloreto de benzalcônio (J).

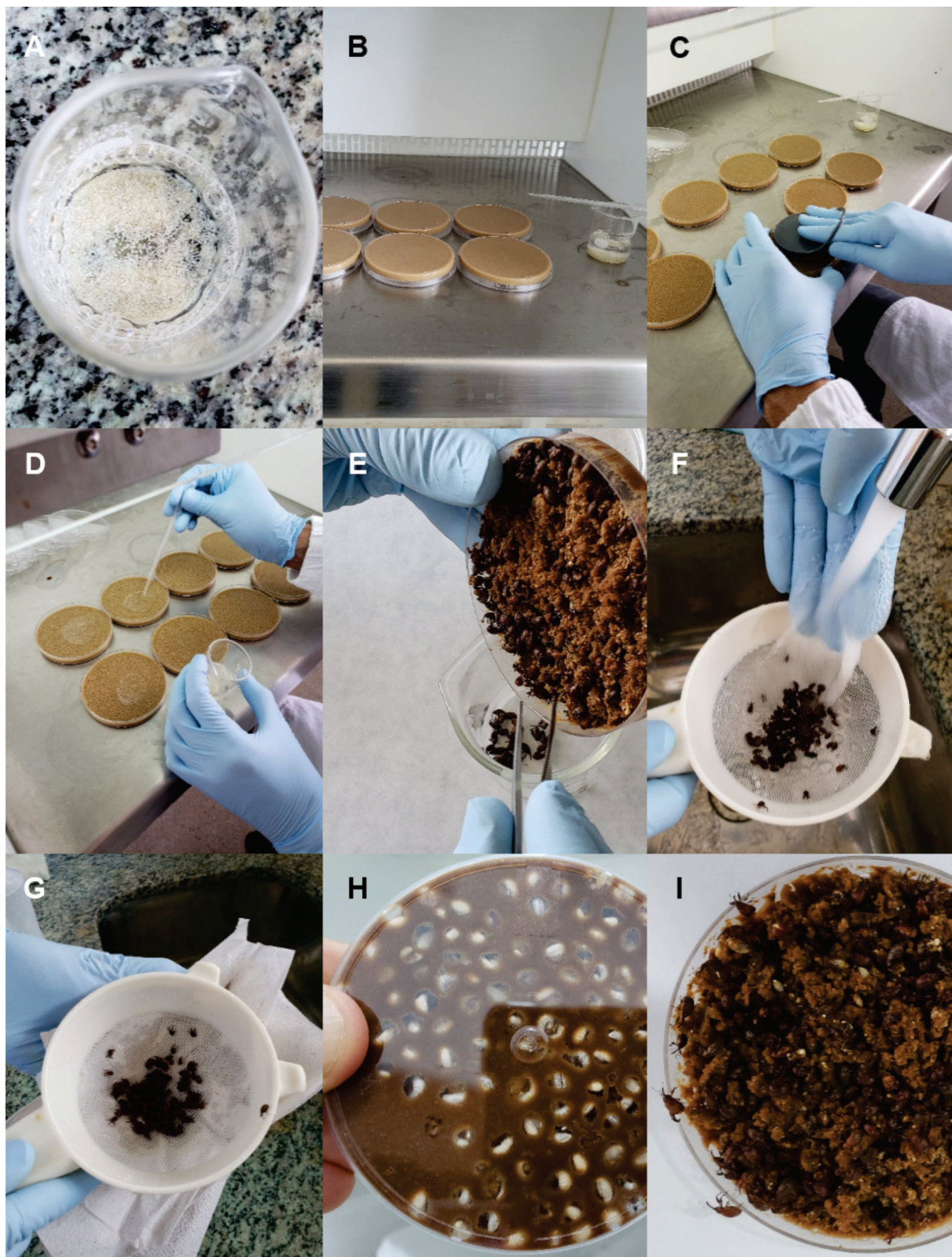


Figura 4. Inoculação de ovos em dieta artificial e assepsia de adultos do bicudo-do-algodoeiro para criação em laboratório: transferência de ovos para béquer com cloreto de benzalcônico (A); prevenção de umidade nas placas de Petri com dieta (B); perfuração de dieta com escova de plástico (C); inoculação de ovos do bicudo em dieta (D); coleta de adultos de placas de Petri (E); remoção de detritos de adultos do bicudo (F); remoção do excesso de umidade dos adultos (G); larvas do bicudo em dieta (H); adultos do bicudo em dieta (I).

distribuição dos ovos nas placas. Os ovos devem ser distribuídos uniformemente sobre a superfície da dieta na placa de Petri.

Ao término do processo de distribuição dos ovos do bicudo, o excesso de solução nas placas deve ser retirado, vertendo-se o conteúdo em um recipiente a ser descartado posteriormente. As placas devem permanecer destampadas na câmara de fluxo laminar por cerca de 40–50 minutos para a completa evaporação da solução sobre a dieta. Por fim, as placas são tampadas, datadas e armazenadas em sala apropriada para criação de larvas do bicudo.

Etapas 4. Emergência, coleta e assepsia de adultos do bicudo de placas de Petri

Os adultos do bicudo são coletados das placas de Petri após o desenvolvimento das larvas, pré-pupas e pupas na sala de criação e multiplicação, com auxílio de pinça e depositados em recipiente (erlenmeyer ou béquer) (Figura 4E). No recipiente, os adultos do bicudo são lavados em água corrente para retirada de resíduos (dieta + partes do corpo dos insetos mortos) provenientes da dieta em que foram criados. Esse procedimento deve ser repetido alguns segundos depois, para em seguida enxaguar os adultos com água destilada (Figura 4F). O excesso de água é removido com papel-toalha, pressionando-o ao fundo da peneira (Figura 4G). Após secagem, os insetos são transferidos para as gaiolas de criação, para acasalamento e postura.

Cada placa de Petri com dieta produz $180,0 \pm 20,0$ larvas (Figura 4H) do bicudo-do-algodoeiro e cerca de $45,0 \pm 5,0\%$ dessas larvas emergem em adultos (Figura 4I). Três placas de Petri suprem aproximadamente 3,0 gaiolas de *J. grandis* e 9,0 com *B. vulgaris* em criação por dia, ambas espécies com 60 casais dos parasitoides por gaiola. Para confecção de uma gaiola para criação de adultos do bicudo, são necessárias, aproximadamente, 18,0 placas com larvas (emergência de adultos de 45%).

Os equipamentos necessários para compor a infraestrutura mínima para produção de dieta do bicudo são: microscópio estereoscópico; balança digital; câmara de fluxo laminar; refrigerador; autoclave; destilador; e moinho.

Produção de parasitoides do bicudo-do-algodoeiro

Para a criação dos parasitoides do bicudo-do-algodoeiro, *J. grandis* e *B. vulgaris*, as condições de

temperatura, umidade relativa do ar e luminosidade devem ser, respectivamente, de $25,0 \pm 2$ °C, $70,0 \pm 5,0\%$ com fotoperíodo 12h:12h (fotofase: escotofase).

Larvas do bicudo criadas em dieta artificial são encapsuladas em celas de parafilme (Parafilm M) (Figura 5A) (Cate, 1987), onde são depositados os ovos dos parasitoides, possibilitando seu desenvolvimento o mais próximo da realidade sob condições de campo, ao parasitarem seu hospedeiro original nas estruturas de frutificação (botões florais e maçãs) das plantas de algodão (Morales-Ramos; King, 1991; Morales-Ramos; Cate, 1992a; Pierozzi Junior; Habib, 1993; Ramalho; Wanderley, 1996).

Para o encapsulamento das larvas do bicudo, placas de alumínio (Figura 5B) (Ramalho; Malaquias, 2015) são utilizadas para modelagem de celas no parafilme. O tamanho das placas deve, de preferência, se ajustar à largura do parafilme (10 cm) e ter altura de 1,0 cm. A placa deve conter orifícios circulares distribuídos na largura da placa. Cada orifício tem 0,9 cm de diâmetro e profundidade de 1,0 cm, ou seja, com vão de um lado ao outro da placa. Os orifícios são equidistantes com 0,3 cm de distância entre si. A placa pode ter comprimento variável para se ajustar à necessidade de confecção de cartelas de parafilme.

Para modelagem das celas, utiliza-se um bastão de extremidade arredondada (Figura 5C), que será pressionado a uma profundidade de aproximadamente 0,5 cm sobre a folha de parafilme em cada orifício da placa de alumínio. Essa profundidade é suficiente para acondicionamento das larvas do bicudo. O ajuste do orifício de cada cela pode ser feito com as cerdas de um pincel redondo 121-04 (Figura 5D) por meio de movimentos circulares.

Outra forma de confeccionar as celas da cartela de parafilme é utilizando-se uma placa de mesma dimensão com pinos, que é pressionada sobre a folha de parafilme (Ramalho; Malaquias, 2015).

O processo de encapsulamento consiste inicialmente em colocar larvas do bicudo em celas, cobrindo-as com outra folha de parafilme. As larvas do bicudo a serem encapsuladas são coletadas de placas de Petri com dieta artificial. Em média, as larvas ficam aptas para o parasitismo após 10 a 12 dias do período de incubação dos ovos, respectivamente, às temperaturas de 28 e 25 °C, o que corresponde a larvas do terceiro estágio (Cross et al., 1969; Johnson et al., 1973; Wanderley; Ramalho, 1996; Summy et al., 1997), que são preferidas para multiplicação dos parasitoides (Araújo; Azevedo, 1997; Summy et al., 1997; Wanderley et al., 2007).

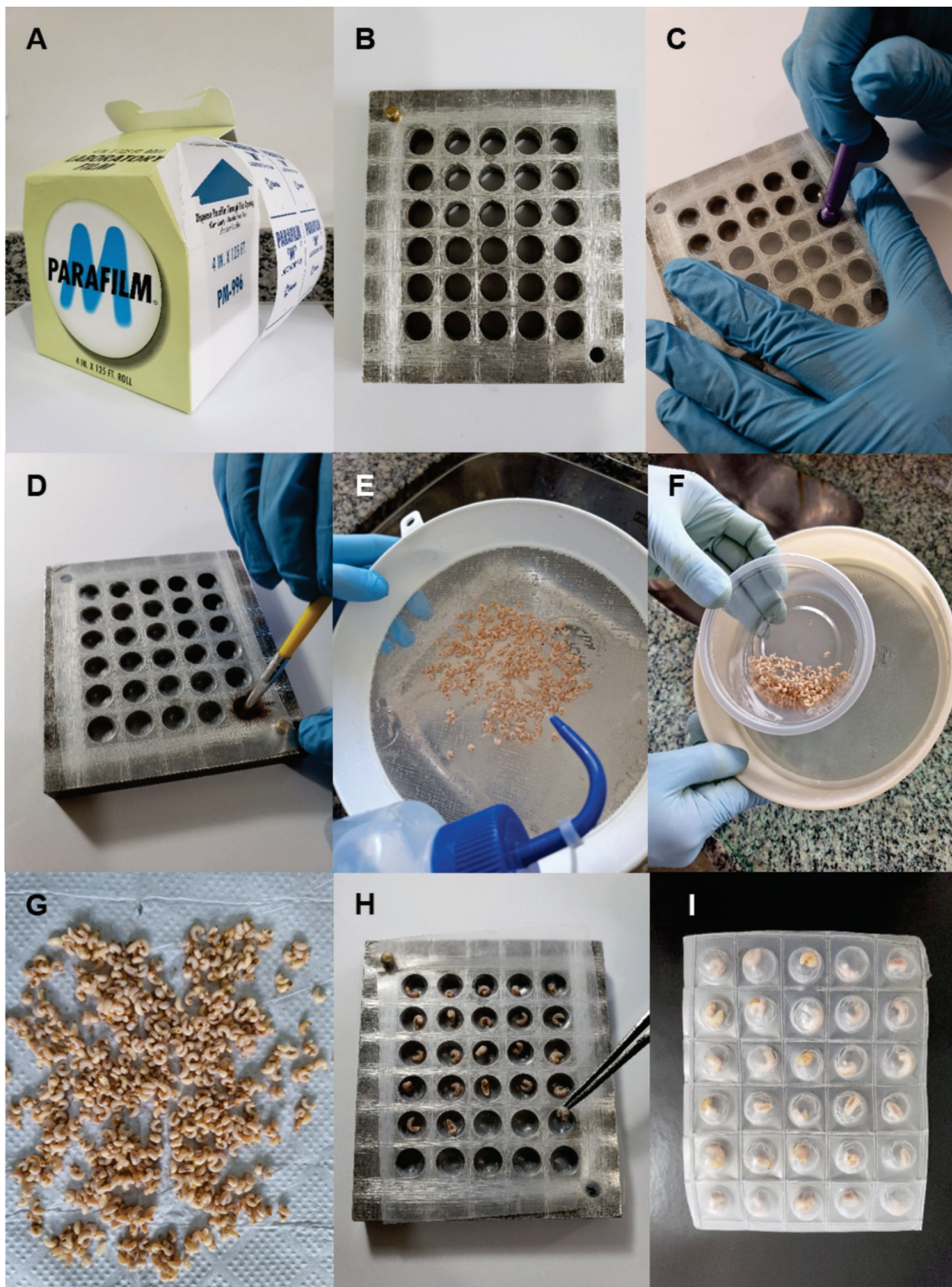


Figura 5. Preparo de celas, assepsia e inoculação de larvas do bicudo-do-algodoeiro: parafilme (A); placas de alumínio (B); bastão de plástico (C); ajuste do orifício das celas (D); ajuste do orifício das celas (D); limpeza de larvas do bicudo (E); larvas em hipoclorito de sódio + água destilada (F); remoção do excesso de água (G); introdução de larvas nas celas de parafilme (H); larvas encapsuladas (I).

Antes da introdução das larvas nas celas na cartela de parafilme, estas são lavadas com água destilada sobre peneira para retirar os resíduos da dieta (Figura 5E). Após serem lavadas, as larvas são colocadas em recipiente com água destilada mais hipoclorito de sódio, na proporção de 9:1, por um período de 10 minutos (Figura 5F). Posteriormente, as larvas são transferidas para peneira, enxaguadas com água destilada e, em seguida, depositadas sobre folhas de papel filtro, em bandeja de plástico por 30 minutos para retirada do excesso de umidade (Figura 5G).

As larvas do bicudo são acondicionadas individualmente em cada cela, com o auxílio de pinça de ponta arredondada, para evitar que sejam danificadas por ação mecânica (Figura 5H). O fechamento das celas é feito passando-se a extremidade de uma pinça ou uma carretilha entre as celas na folha sobreposta de parafilme para encapsulamento das larvas do bicudo no seu interior (Figura 5I).

Na criação dos adultos, são utilizadas gaiolas (unidades de produção) de criação e multiplicação dos parasitoides (30 cm de diâmetro maior x 25 cm de diâmetro menor x 27 cm de altura) (Figura 6A). Essas gaiolas são de plástico transparente, com abertura feita pela parte inferior (tampa do recipiente). Isso facilita o manuseio dos parasitoides, ao se colocar a parte superior voltada para a luz artificial ou natural.

Na parte central da parte superior da gaiola, é afixado um tubo de ensaio (2,5 cm de diâmetro x 10,0 cm de comprimento) com a saída voltada para baixo, preenchido com água destilada e tamponado com algodão hidrófilo, de modo a manter a umidade dentro da gaiola acima de 60% e fornecer água aos parasitoides (Morales-Ramos et al., 2000; Ramalho; Dias, 2003). Outro recipiente de plástico, do tipo copo de café (50 mL), também com algodão hidrófilo umedecido, deve ser colocado no piso da gaiola, para auxiliar na manutenção da umidade dentro da gaiola (Morales-Ramos; Cate, 1992b).

Para alimentação dos adultos, gotas de mel (Araújo et al., 1997) silvestre puro (100%) (Wanderley et al., 2004; Ramalho et al., 2011) devem ser depositadas, com auxílio de seringa de plástico descartável (10 mL), adaptada com ponteira (Tipo Universal Vol. 0–200 µL - Amarela) (Figura 6B), na parede da gaiola.

Nessas gaiolas, as cartelas de parafilme com larvas do bicudo são afixadas nas paredes laterais, para o parasitismo de fêmeas acasaladas de *B. vulgaris* e, no piso da gaiola para fêmeas de *J. grandis* (Ramalho et al., 2007), por um período

de 24 horas. Os adultos, machos e fêmeas, são coletados com auxílio de aspirador (Reyes-Rosas et al., 2007) de insetos (Figura 6C) e introduzidos nas gaiolas na proporção de 1:1.

As cartelas com as larvas parasitadas são transferidas para caixas de emergência dos parasitoides, confeccionadas com acrílico transparente (39 cm de largura x 39 cm de comprimento e 28 cm de altura), com duas perfurações circulares de 10 cm de diâmetro em um dos lados da caixa (Figura 6D).

Para criação e multiplicação de *J. grandis* (Figura 6E) é recomendado o fornecimento de 150 larvas do bicudo para 60 fêmeas acasaladas. Estima-se que essa proporção (2,5:1) propiciará taxas de postura de, aproximadamente, 2,0 ovos do parasitoide por larva do bicudo, razão sexual de 0,5 e índices de emergência de adultos de 50%. Para manutenção contínua da produção de *J. grandis*, 6% da produção por geração deve ser destinada à multiplicação da população dos parasitoides em laboratório.

Para criação e multiplicação de *B. vulgaris* é recomendado o fornecimento de 60 larvas do bicudo para 60 fêmeas acasaladas. Estima-se que esta proporção (1:1) propiciará taxas médias de postura de, aproximadamente, 1,0 ovo do parasitoide por larva do bicudo, razão sexual de 0,21 e índices de emergência de adultos de 62%. Para manutenção contínua da produção de *B. vulgaris*, 6% da produção, por geração, devem ser destinados à multiplicação da população dos parasitoides em laboratório.

Ilustração das etapas da produção do bicudo-do-algodoeiro e dos parasitoides *J. grandis* e de *B. vulgaris*, seguidas, respectivamente, de indicação do controle de qualidade, e da liberação dos parasitoides, são apresentadas em fluxograma (Figura 7).

Agradecimentos

A Eduardo Domingos Vasconcelos (técnico da Embrapa Algodão) e Eliane Pereira Cristina (bolsista cooperação Embrapa Algodão/Amipa), responsáveis pela criação do bicudo-do-algodoeiro (*A. grandis*) e dos parasitoides (*J. grandis* e *B. vulgaris*), respectivamente, pela importante colaboração técnica durante a execução do Projeto de Cooperação Embrapa Algodão/Amipa, intitulado Aprimoramento do Manejo Integrado de Pragas do Algodoeiro com Ênfase para o Controle Biológico (processo SEI nº 21156.000091/2021-12 e SAIC nº 20100.21/0008-5).

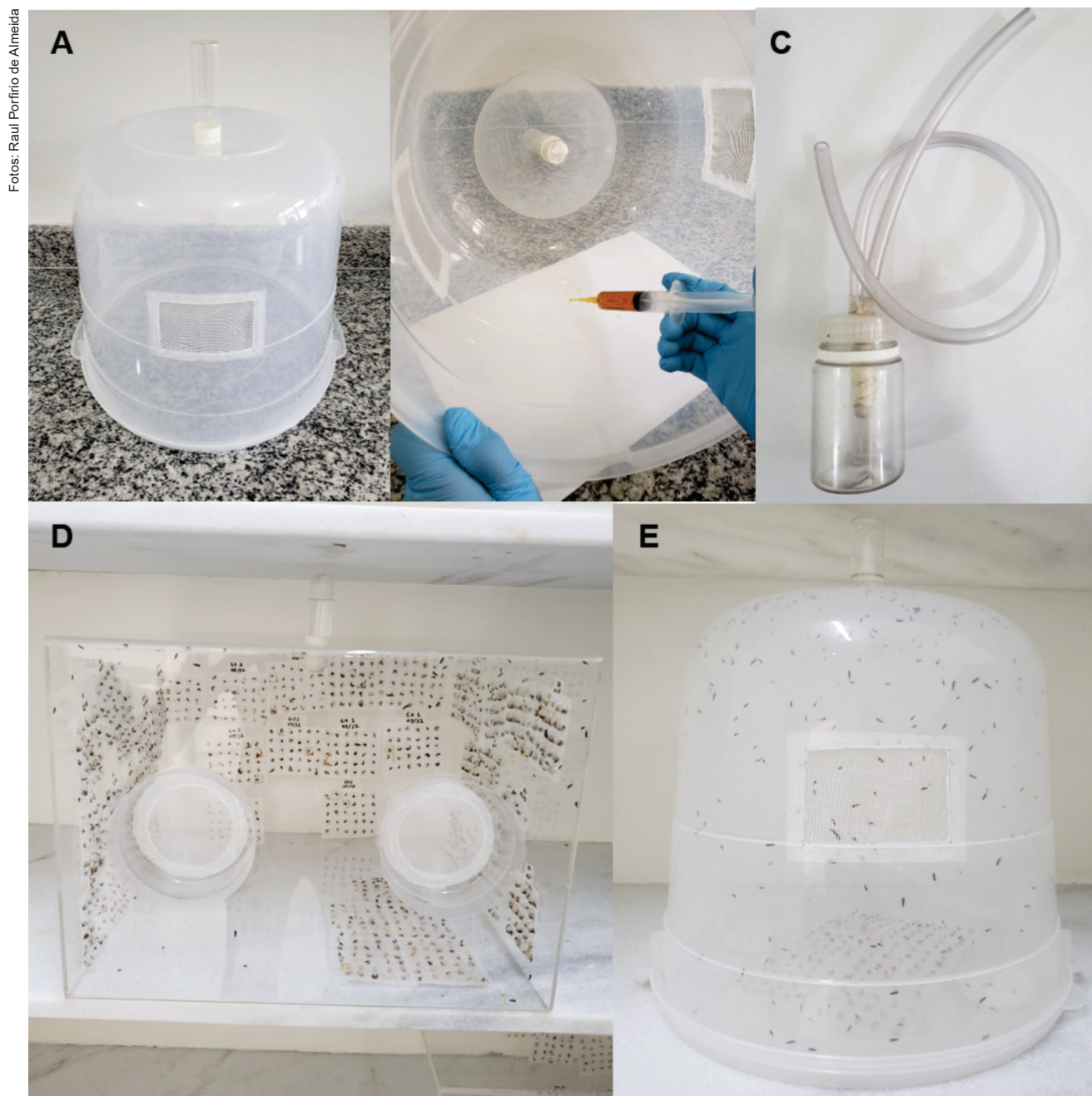


Figura 6. Criação, coleta e emergência de adultos dos parasitoides do bicudo-do-algodoeiro: gaiola de criação dos parasitoides (A); deposição de mel na parede das gaiolas (B); aspirador/coletor de insetos (C); caixa de emergência de parasitoides (D);gaiolas de criação dos parasitoides (E).



Figura 7. Fluxograma de produção de parasitoides do bicudo-do-algodoeiro.

Referências

- ALMEIDA, R. P. de. Economic threshold for the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) control. **Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology**, v. 11, p. 97-101, 2000.
- ALMEIDA, R. P. de. **Táticas agroecológicas para o manejo de insetos-praga da cultura do algodoeiro**. Campina Grande: Embrapa algodão, 2020. 69 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 283).
- ALMEIDA, R. P. de; SILVA, C. A. D. da; RAMALHO, F. de S. Manejo integrado de pragas do algodão. In: BELTRÃO, N. E. de M.; AZEVEDO, D. M. P. de (ed.).

O agronegócio do algodão no Brasil. 2. ed. rev. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. v. 2, p.1034-1098.

ALMEIDA, R. P. de; SAIRRE, F. E. P. de; STEFANO, J. G. DI. Controle qualitativo. **Revista Cultivar – Grandes Culturas**, n. 267, p. 38-40, 2021.

ALMEIDA, R. P. de; SILVA, C. A. D. da; DI STEFANO, J. G. **Relatório técnico da cooperação Embrapa Algodão/Amipa - aprimoramento do manejo integrado de pragas do algodoeiro com ênfase para o controle biológico**. Campina Grande: Embrapa algodão, 2023. 27 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 295).

- ALVES, T. J. S.; SILVA-TORRES, C. S. A.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; ÁLVARO A. C. TEIXEIRA, A. A. C.; TORRES, J. B.; LIMA, T. A.; RAMALHO, F. S. Behavioral studies of the parasitoid *Bracon vulgaris* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Insect Behavior**, v. 28, p. 604-617, 2015.
- ARAÚJO, L. H. A.; ALMEIDA, R. P.; DIAS, J. M. Tabela de esperança de vida para adultos de *Bracon* sp. (Hymenoptera: Braconidae) parasitóide do bicudo do algodoeiro. **Scientia Agricola**, v. 54, p. 247-250, 1997.
- ARAÚJO, L. H. A.; BRAGA SOBRINHO, R.; ALMEIDA, R. P. de; MESQUITA, C. K. de. Biological control of the boll weevil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 257-261, 1993.
- ARAÚJO, L. H. A.; BRAGA SOBRINHO, R.; MESQUITA, C. K.; ALMEIDA, R. P. de. Aspectos preliminares de comportamento de parasitoides do bicudo do algodoeiro. In: REUNIÃO NACIONAL DO ALGODÃO, 6., 1989, Campina Grande. **Resumos...** Campina Grande: EMBRAPA - CNPA, 1990. p. 32.
- BARBOSA, S.; BRAGA SOBRINHO, R.; LUKEFAHR, M. J.; BENGOLA, O. G. **Relatório sobre ocorrência do bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis* Boheman, "Boll Weevil" no Brasil e recomendações para sua erradicação.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 1983. 12 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 21).
- BLEICHER, E.; BROGLIO-MICHELETTI, S. M. Parasitoides e predadores do bicudo do algodoeiro no Nordeste do Brasil. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa do Algodão. **Relatório Técnico Anual - 1985 - 1986.** Campina Grande, 1988. p. 130.
- CARDOSO, U. P.; CASTELLANI, M. A.; FORTI, L. C.; MENEZES JÚNIOR, A. de O.; MOREIRA, A. A.; COLMENAREZ, Y. C.; OLIVEIRA, M. E. C. R. de; BITTENCOURT, M. A. L. Índice de infestação e fatores de mortalidade do bicudo-do-algodoeiro (Coleoptera: Curculionidae) no semi-árido do sudoeste da Bahia, Brasil. **Entomotópica**, v. 24, n. 3, p. 111-122, 2009.
- CATE, J. R. A method of rearing parasitoids of boll weevil without the host plant. **Southwestern Entomologists**, v. 12, p. 211-215, 1987.
- CATE, J. R.; KRAUTER, P. C.; GODFREY, K. E. Pests of cotton. In: HABECK, D. H.; BENNETT, F. D.; FRANK, J. H. (ed.). **Classical biological control in the southern United States.** Texas: Southern Cooperation Serie, 1990. p. 17-29 (Bulletin, 355).
- COLEMAN, R. J.; MORALES-RAMOS, J. A.; KING, E. G.; WOOD, L. A. Suppression of the boll weevil in organic cotton by release of *Catolaccus grandis* as part of the Southern Rolling Plain boll weevil eradication program. In: PROCEEDINGS Beltwide Cotton Conference. Memphis: National Cotton Council of America, 1996. v. 2, p. 1094-1095.
- CROSS, W. H.; MITCHELL, H. C. Distribution and importance of *Heterolaccus grandis* as a parasite of the boll weevil. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 62, n. 1, p. 235-236, 1969.
- CROSS, W. H.; MCGOVERN, W. L.; MITCHELL, H. C. Biology of *Bracon kirkpatrickii* and field releases of the parasite for control of the boll weevil. **Journal of Economic Entomology**, v. 62, p. 448-54, 1969.
- GIBSON, G. A. P. Revision of the species of *Jaliscoa* Bouček within a review of the identity, relationships and membership of *Jaliscoa*, *Catolaccus* Thomson, *Eurydinoteloides* Girault, *Lyrcus* Walker and *Trimeromicrus* Gahan (Hymenoptera: Pteromalidae). **Zootaxa**, v. 3612, n. 1, p. 1-85, 2013.
- JOHNSON, W. L.; CROSS, W. H.; MCGOVERN, W. L.; MITCHELL, H. C. Biology of *Heterolaccus grandis* in a laboratory culture and its potential as an introduced parasite of the boll weevil in the United States. **Environmental Entomology**, v. 1, n. 1, p. 112-118, 1973.
- LENTEREN, J. C. van; HALE, A.; KLAPWIJK, J. N.; SCHELT, J. van; STEINBERG, S. **Guidelines for quality control of commercially produced natural enemies.** In: LENTEREN, J. C. van (ed.). Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures. Wallingford: CABI Publishing, 2003. p. 265-303.
- MONNERAT, R. G.; DIAS, S. C.; OLIVEIRA NETO, O. B. de; NOBRE, S. D.; SILVA-WERNECK, J. O.; SÁ, M. F. G. de. **Criação massal do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em laboratório.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 4 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 46).
- MORALES-RAMOS, J. A.; CATE, J. R. Laboratory determination of age-dependent fecundity, development, and rate of increase of *Catolaccus grandis* (Burks) (Hymenoptera: Pteromalidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 85, n. 4, p. 469-476, 1992a.
- MORALES-RAMOS, J. A.; CATE, J. R. Rate of Increase and Adult Longevity of *Catolaccus grandis* (Burks) (Hymenoptera: Pteromalidae) in the Laboratory at Four Temperatures. **Environmental Entomology**, v. 21, n. 3, p. 620-627, 1992b.
- MORALES-RAMOS, J. A.; KING, E. G. Evaluation of *Catolaccus grandis* (Burks) as a biological control agent against the cotton boll weevil. In: BELTWISE COTTON CONFERENCE, 44., 1991, Memphis. **Proceedings...** Memphis: National Cotton Council of America, 1991. p. 724.
- MORALES-RAMOS, J. A.; SUMMY, K. R.; KING, E. G. Estimating parasitism by *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae) after inundative releases against the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, v. 24, n. 6, p. 1718-1725, 1995.

MORALES-RAMOS, J. A.; ROJAS, M. G.; KING, E. G. Differences in reproductive potential of two populations of *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae) and their hybrids. **Florida Entomologist**, v. 83, n. 2, p. 137-145, 2000.

MORALES-RAMOS, J. A.; ROJAS, M. G.; ROBERSON, J.; JONES, R. G.; KING, E. G.; SUMMY, K. R.; BRAZZEL, J. R. Suppression of boll weevil first generation by augmentative releases of *Catolaccus grandis* in Aliceville, Alabama. In: PROCEEDINGS of the Beltwide Cotton Conferences. Memphis: National Cotton Council of America, 1994. v. 2, p. 958-964.

PARRA, J. R. P. The evolution of artificial diets and their interactions in science and technology. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (ed.). **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**. Boca Ratón: CRC Press, 2012. p. 51- 92.

PIEROZZI JUNIOR, I.; HABIB, M. E. M. Aspectos biológicos e de comportamento dos principais parasitos de *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae), em Campinas, SP. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 22, n. 2, p. 317-323, 1993a.

PIEROZZI JUNIOR, I.; HABIB, M. E. M. Identificação de fatores de mortalidade natural dos estágios imaturos de *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae), na região de Campinas, SP. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 22, n. 2, p. 325-332, 1993b.

PIEROZZI JUNIOR, I.; HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Primeiro registro de ocorrência no Brasil de *Catolaccus grandis* (Burks) (Hymenoptera, Pteromalidae), parasito de *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera, Curculionidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 12., 1985, Campinas. **Resumos...** Campinas: Editora da Unicamp, 1985. p. 135.

RAMALHO, F. S.; DIAS, J. M. Efeitos de Hospedeiros Alternativos na Biologia de *Catolaccus grandis* (Burks) (Hymenoptera: Pteromalidae), parasitoide de *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 2, p. 305-310, 2003.

RAMALHO, F. S.; JESUS, F. M. M. de; GONZAGA, J. V. Hymenopteros parasitos do bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* Boheman. In: REUNIÃO NACIONAL DO ALGODÃO, 4., 1986, Belém. **Resumos...** Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1986. p. 97.

RAMALHO, F. S.; GONZAGA, J. V.; SILVA, J. R. B. método para determinação das causas de mortalidade natural do bicudo-do-algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n.8, p. 877-887, 1993.

RAMALHO, F. S.; MALAQUIAS, J. B. **O controle biológico do bicudo-do-algodoeiro**. In: Belot. J. L.

O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boh., 1843) nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle. Cuiabá: Instituto Mato-Grossense do Algodão, 2015. p. 151-177.

RAMALHO, F. S.; MEDEIROS, R. S.; LEMOS, W. P.; WANDERLEY, P. A.; DIAS, J. M.; ZANUNCIO, J. C. Evaluation of *Catolaccus grandis* (Burks) (Hym., Pteromalidae) as a biological control agent against cotton boll weevil. **Journal of Applied Entomology**, v. 124, p. 359-364, 2000.

RAMALHO, F. S.; SANTOS, R. F. Impact of the introduction of the cotton boll weevil in Brazil. In: CONSTABLE, G. A.; FORRESTER, N. W. (ed.). **Challenging the future**. Brisbane: CSIRO, 1994. p. 466-474.

RAMALHO, F. S.; SILVA, J. R. B. Período de emergência e mortalidade natural do bicudo-do-algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 11, p. 1221-1231, 1993.

RAMALHO, F. S.; SILVA, A. M. C. da; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Competition between *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae) and *Bracon vulgaris* (Hymenoptera: Braconidae), parasitoids of the boll weevil. **Brazilian Archives of Biology And Technology**, v. 50, n. 3, p. 371-378, 2007.

RAMALHO, F. S.; WANDERLEY, P. A. Ecology and management of cotton boll weevil in South American Cotton. **American Entomologist**, v. 42, 41-47, 1996.

RAMALHO, F. S.; WANDERLEY, P. A.; MALAQUIAS, J. B.; FERNANDES, F. S.; NASCIMENTO, A. R. B.; ZANUNCIO, J. C. Effect of temperature on the reproduction of *Bracon vulgaris* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the cotton boll weevil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 3, p. 1021-1029, 2011.

REYES-ROSAS, M. A.; LOERA-GALLARDO, J.; LOPEZ-ARROYO, VARGAS-CAMPLIS, J. Parasitoides hime-nópteros de *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) em el Norte de Tamaulipas, México. **Southwestern Entomologist**, v. 32, n. 1, p. 53-64, 2007.

SHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R. G.; BORGES, M.; CARVALHO, R. da SILVA. **Metodologia de criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 20 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular técnica, 11).

SUMMY, K. R.; GREENBERG, S. M.; MORALES-RAMOS, J. A.; KING, E. G. Suppression of boll weevil infestations (Coleoptera: Curculionidae) occurring on fallow-season cotton in Southern Texas by augmentative releases of *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae). **Biological Control**, v. 9, p. 209-215, 1997.

SUMMY, K. R.; MORALES-RAMOS, J. A.; KING, E. G. Suppression of boll weevil infestations on South Texas cotton by augmentative releases of the exotic parasite *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae). **Biological Control**, v. 5, p. 523-529, 1995.

WANDERLEY, P. A.; WANDERLEY, M. J. A.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; PAVAN JÚNIOR, A. Efeito de quatro tipos de mel na longevidade e reprodução de *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae). **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 979-983, 2004.

WANDERLEY, P.; RAMALHO, F. S. Biologia e exigências térmicas de *Catolaccus grandis* (Burks) (Hymenoptera: Pteromalidae), parasitoide do bicudo do algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 237-247, 1996.

WANDERLEY, P. A.; RAMALHO, F. S.; ZANÚNCIO, J. C.; LEITE, G. L. D. Thermal Requirements and Development of *Bracon vulgaris*, a Parasitoid of the Cotton Boll Weevil. **Phytoparasitica**, v. 35, n. 4, p. 336-345, 2007.

Embrapa Algodão

Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário
58428-095, Campina Grande, PB
www.embrapa.br/algodao
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Daniel da Silva Ferreira*

Secretária-executiva: *Magna Maria Macedo Nunes Costa*

Membros: *Francisco José Correia Farias, Luiz Paulo de Carvalho, Nair Helena Castro Arriel, Rita de Cássia Cunha Saboya e Geraldo Fernandes de Sousa Filho*

Parceria



Ministério da Agricultura
e Pecuária

Circular Técnica 144

e-ISSN 0000-0000

Abril, 2024

Edição executiva: *Geraldo Fernandes de S. Filho*

Revisão de texto: *Marcela Bravo Esteves*

Normalização bibliográfica: *Enyomara Lourenço Silva* (CRB-4/1569)

Projeto gráfico: *Leandro Sousa Fazio*

Diagramação: *Geraldo Fernandes de S. Filho*

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.