

CURADORIA DE COLEÇÕES DE HIMENÓPTEROS PARASITÓIDES

MANUAL TÉCNICO

Valmir Antonio Costa

Elizabeth A. B. De Nardo

Embrapa

CNPq
DOC. 16

MA
7c
3
2006.01406

Curadoria de coleções de
1998 LV-2006.01406



37535-1

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente: Fernando Henrique Cardoso

Ministro da Agricultura e do Abastecimento: Francisco Sérgio Turra

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Presidente: Alberto Duque Portugal

Diretores: Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Elza Angela Battaglia Brito da Cunha

Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental - CNPMA

Chefe Geral: Bernardo van Raij

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento: Deise M. Fontana Capalbo

Chefe Adjunto Administrativo: Vander Roberto Bisinoto



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

CURADORIA DE COLEÇÕES DE HIMENÓPTEROS PARASITÓIDES

Manual Técnico

Coordenadores

Valmir Antonio Costa e Elizabeth A. Batista De Nardo

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Meio Ambiente

Rodovia SP-340 - km 127,5 - Bairro Tanquinho Velho

Caixa Postal 69 13820-000 - Jaguariúna, SP

Fone: (019) 867-8700 Fax: (019) 867-8740

e-mail: edis@cnpma.embrapa.br

Comitê de Publicações: Cláudia Conti Medugno

Deise M. Fontana Capalbo

João Fernandes Marques

José Flávio Dynia

Raquel Ghini

Maria Amélia de Toledo Leme

Maria Cristina Tordin

Edição: Regina Lucia Siewert Rodrigues e
Franco Ferreira de Moraes

Normalização: Maria Amélia de Toledo Leme

Tiragem: 500 exemplares

COSTA, V.A.; NARDO, E.A.B., coords. **Curadoria de coleções de himenópteros parasitóides:** manual técnico. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. 76p. (EMBRAPA-CNPMA. Documentos 16).

CDD 595.79074

©EMBRAPA-CNPMA, 1998

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	05
I. COLEÇÕES E CURADORIA: A SITUAÇÃO BRASILEIRA	07
Referência Bibliográfica.....	08
II. CURADORIA DE COLEÇÕES ENTOMOLÓGICAS, COM ÊNFASE EM HIMENÓPTEROS PARASITÓIDES.....	09
Captura ativa.....	09
Captura passiva.....	11
Criação de hospedeiros.....	12
Sacrifício de insetos.....	16
Armazenamento temporário.....	18
Preparo para montagem.....	20
Montagem de himenópteros parasitóides.....	24
Etiquetas entomológicas.	28
Preparo de lâminas.....	31
Preparo de lâminas de Chalcidoidea.....	34
Imaturos: sacrifício e preservação.....	38
Preparo de lâminas de imaturos.....	39
Tipos de coleções.....	40
Categorias de tipos.....	41
Identificação do material.....	43
Armazenamento de coleções via seca.....	44
Cuidados com as coleções via seca.....	47
Coleções via úmida.....	49
Coleções em lâminas (laminário)	49

Embalagem e remessa de espécimes.....	49
Referências bibliográficas.....	51
ANEXO I.....	55
ANEXO II.....	61
III. ESPÉCIMES "VOUCHER" E SUA IMPORTÂNCIA EM LABORATÓRIO DE QUARENTENA.....	65
Referências Bibliográficas.....	68
IV. A COLEÇÃO "VOUCHER" DO LABORATÓRIO DE QUARENTENA "COSTA LIMA".....	69
Referência Bibliográfica.....	71

CURADORIA DE COLEÇÕES DE HIMENÓPTEROS PARASITÓIDES

APRESENTAÇÃO

Parte deste manual foi originalmente preparada como apostila para um curso teórico-prático organizado pelo Laboratório de Quarentena "Costa Lima" sobre "CURADORIA DE MUSEU ENTOMOLÓGICO", no período de 22 a 24 de abril de 1997, sendo parte do trabalho da consultoria do Dr. Valmir A. Costa.

O objetivo principal do curso foi capacitar a equipe do Laboratório de Quarentena em técnicas referentes ao assunto, devido à importância desse tema representa para um Laboratório de Quarentena de inimigos naturais de insetos pragas.

O laboratório conta com uma coleção "voucher", constituída por espécimes "voucher" dos inimigos naturais introduzidos e exportados do Brasil, cujo objetivo é preservar e registrar todo o intercâmbio de agentes de controle biológico efetuado no país, assim como torná-lo de fácil acesso ao público.

Diante da carência bibliográfica especializada nesta área no Brasil, aliada à necessidade e demanda real de várias Instituições de ensino e pesquisa nacionais, optou-se pela publicação da apostila em forma de Manual Técnico, em colaboração com alguns pesquisadores da área, visando uma abordagem mais completa do assunto.

Acreditamos ter dado uma boa contribuição ao setor de ensino e pesquisa do país, a qual poderá ser aperfeiçoada com as críticas e sugestões advindas.

Agradecemos sinceramente aos colegas:

João Luiz da Silva, pelo auxílio prestado na organização do material do museu do Laboratório de Quarentena; Maria Amélia de Toledo Leme, pela revisão gráfica do texto; e Regina Lucia Siewert Rodrigues, pela ajuda na editoração deste Manual.

Os Coordenadores

I. COLEÇÕES E CURADORIA: A SITUAÇÃO BRASILEIRA

Valmir A. Costa ¹
Marcelo T. Tavares ²

Os espécimes guardados em museus, juntamente com seus dados associados, documentam a existência de espécies no tempo e no espaço. Assim, quando apropriadamente preservado, este material constitui a base para ampliar o conhecimento da biodiversidade.

Para alguns autores, a curadoria de coleções compreende as atividades de coleta, preservação, armazenamento e catalogação do material científico. Para outros, além destas tarefas, são incluídas a avaliação das necessidades e condições de empréstimo do material, procedimentos e adoção de métodos de catalogação, levantamentos e tombamentos, doações e permutas. De qualquer modo, o importante é manter indefinidamente as coleções em boas condições de preservação (Martins, 1994).

O uso de técnicas corretas de preparação de insetos para preservação pode reduzir os custos (tempo e dinheiro) destinados ao seu manuseio e armazenamento, assim como facilitar o seu estudo. Boas técnicas são mais eficientes e não tomam mais tempo do que as técnicas inadequadas. Um pouco de cuidado no momento do preparo do material irá beneficiar futuras gerações de pesquisadores, particularmente nas áreas da Sistemática e Taxonomia.

No Brasil existe um número pequeno de coleções entomológicas, quando comparado com alguns outros países com área ou diversidade de ecossistemas semelhantes. O desenvolvimento de novas coleções ou incremento das já existentes depende, muitas vezes, não só de recursos financeiros, mas também do aperfeiçoamento dos recursos humanos ligados às mesmas. Esse aperfeiçoamento é ainda mais importante quando se trata de grupos entomológicos especiais com grande importância científica e econômica, como é o caso dos himenópteros parasitóides, que necessitam de técnicas especiais de coleta e montagem.

¹ Eng^o Agr^o, Dr., Centro Experimental do Instituto Biológico/Laboratório de Controle Biológico. Cx. Postal 70, 13001-970, Campinas, SP.

² Biólogo, Dr., Consultor EMBRAPA/IICA-PROMOAGRO - Cx. Postal 69, 13820-000, Jaguariúna, SP.

Nas coleções brasileiras, existem poucos representantes destes grupos, em relação à enorme diversidade de formas que acredita-se existir em nossa fauna. Mesmo quando encontrados, são representados geralmente por exemplares de maior porte ou mais vistosos, principalmente icneumonóideos e calcidídeos, sendo que os exemplares de menor porte ou estão ausentes ou preservados em condições inadequadas. Como, de modo geral, estes himenópteros parasitóides são de grande interesse para o controle biológico, já que muitos de seus hospedeiros são considerados pragas agrícolas, é de vital importância um incremento no número de exemplares, devidamente etiquetados e processados, em coleções nacionais. Tal incremento permitirá maior conhecimento da diversidade destes insetos e, conseqüentemente, trará subsídios vitais para a avaliação de organismos que devem ou não ser empregados em programas de controle biológico.

Neste manual, são reunidos vários procedimentos e técnicas. Deste modo, espera-se que venha a contribuir para o desenvolvimento das coleções nacionais, principalmente de himenópteros parasitóides.

Referência Bibliográfica

MARTINS, U.R. A coleção taxonômica. In: PAPAVERO, N., org. **Fundamentos práticos de taxonomia zoológica**. 2. ed. São Paulo: Editora UNESP, 1994. p.19-43.

II. CURADORIA DE COLEÇÕES ENTOMOLÓGICAS, COM ÊNFASE EM HIMENÓPTEROS PARASITÓIDES

Valmir A. Costa¹
Nelson W. Perito²
Ana Eugênia de C. Campos-Farinha³
Sergio Ide⁴

Uma boa coleção de insetos começa pela metodologia adequada de coleta. De forma geral, a maioria dos métodos utilizados na coleta de insetos prestam-se para a captura dos himenópteros parasitóides, doravante citados apenas como parasitóides. Grissell & Schauff (1990) dividem os métodos de obtenção desses insetos em captura ativa, captura passiva e criação de hospedeiros.

Captura ativa

Nesse tipo de coleta, os parasitóides são capturados com redes entomológicas. Há vários modelos, dependendo da necessidade do coletor, com destaque para:

- Rede de “varredura”: é construída com material robusto, com aro de ferro e funil de algodão cru. Suas medidas aproximadas são: diâmetro: 45 cm; comprimento do funil: 55 cm. Esse tipo de rede é utilizado de modo semelhante ao de uma “vassoura”, “varrendo” os habitats de interesse do pesquisador. De forma geral, capturam um elevado número de parasitóides, mas apresentam a desvantagem de danificar grande parte do material coletado.

- Rede para captura na vegetação: este tipo de rede tem o diâmetro do aro de 20 a 25 cm e o comprimento de seu funil de aproximadamente 30 cm, sendo menor do que as normalmente utilizadas na captura de lepidópteros. O cabo, com aproximadamente 1,5 m de comprimento e o suporte do funil são feitos de alumínio ou outro material leve e resistente.

¹ Eng^o Agr^o, Dr., Centro Experimental do Instituto Biológico/Laboratório de Controle Biológico. Cx. Postal 70, 13001-970, Campinas, SP.

² Biólogo, Dr., Instituto Biológico/Laboratório de Sanidade Animal e Vegetal. R. Peru, 1472-A - 14075-310, Ribeirão Preto, SP.

³ Bióloga, Dr., Instituto Biológico/Laboratório de Entomologia - Cx. Postal 12.898 - 04010-970, São Paulo, SP.

⁴ Biólogo, MSc., Instituto Biológico/Laboratório de Entomologia - Cx. Postal 12.898 - 04010-970, São Paulo, SP.

Seu funil é confeccionado em "voil", com um reforço de algodão cru na porção onde aquele é preso ao aro. Devido ao pequeno tamanho, essas redes não são utilizadas na "varredura" da vegetação, mas são ideais para a captura de parasitóides em vôo ou daqueles pousados sobre a vegetação.

- Rede de Noyes: esta rede é semelhante à de captura na vegetação, acima descrita, diferenciando-se daquela pela forma do suporte do funil, que é triangular. Essa forma permite grande área de contato com o solo em cada lado do triângulo, aumentando bastante sua eficiência na coleta de parasitóides em vegetação rasteira. Noyes (1982) dá detalhes sobre a construção desse tipo de rede, que pode ser adquirida em lojas especializadas nos EUA.

A utilização de redes entomológicas, a despeito do grande número de exemplares que possibilitam capturar, apresenta como desvantagem a pouca informação biológica associada aos exemplares obtidos. Esse tipo de informação é importante para possíveis utilizações desses agentes biológicos em programas de controle de pragas, assim como em outras áreas do conhecimento. A utilização de redes entomológicas de forma seletiva, ou seja, restringindo seus golpes a apenas uma espécie de árvore ou arbusto por vez, minimiza a desvantagem acima citada, pois, após algumas coletas, pode-se associar alguns parasitóides às plantas amostradas, aumentando, também, as chances de coletar seus hospedeiros.

Para a retirada dos insetos capturados, é necessário agitar a rede de forma a forçar os insetos para o seu fundo, o qual deve ser colocado no interior de um frasco mortífero (ver Sacrifício de insetos). Após alguns minutos, muitos insetos estarão mortos, mas sempre haverá o risco de que alguns deles estejam apenas inconscientes. Por isto, a rede é esvaziada e seu conteúdo colocado no interior do frasco mortífero; deste modo, garante-se que todos os exemplares sejam sacrificados, enquanto que a rede fica disponível para a continuação da coleta.

Outra forma de retirar os insetos da rede entomológica é capturá-los com um aspirador entomológico (Figura 1), depois de forçá-los para o fundo do funil. Este método requer prática, caso contrário, muitos espécimes poderão fugir; contudo, apresenta a vantagem de poder selecionar os insetos a serem capturados, liberando-se aqueles de grupos não visados. O aspirador entomológico também pode ser utilizado para coletar pequenos insetos na vegetação e em outros locais. Não é aconselhável colocar qualquer fixador dentro do recipiente do aspirador, pois os gases podem ser aspirados e provocar mal-estar. Assim que o inseto cai no recipiente, é retirado e imediatamente fixado em etanol ou morto no frasco mortífero.

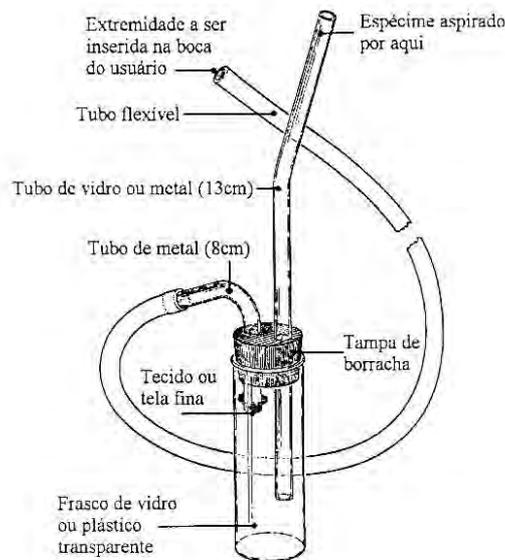


Figura 1. Aspirador entomológico (Fonte: Steyskal *et al.*, 1986)

Captura passiva

Compreende as coletas feitas com armadilhas. Há um grande número de armadilhas para a coleta de insetos que podem ser utilizadas na captura de parasitóides. De forma geral, as armadilhas de interceptação de vôo, tais como a de Malaise, são bastante eficientes para a captura desses insetos (Grissell & Schauff, 1990). Essa armadilha, entretanto, apresenta algumas desvantagens, como seu custo elevado e o fato de não ser portátil, o que inviabiliza seu uso quando da necessidade de se efetuar levantamentos em várias alturas do estrato vegetal. Uma boa alternativa à armadilha de Malaise é a armadilha suspensa concebida por Rafael & Gorayeb (1982) para a coleta de tabanídeos, dadas as suas características de portabilidade, baixo preço e facilidade de manuseio e conservação.

Perioto (1991) avaliou 5 tipos de armadilhas na captura de parasitóides em vegetação de cerrado próxima à cidade de São Carlos (SP). Dentre as armadilhas utilizadas, as que se destacaram na captura desses insetos foram a de Rafael & Gorayeb, com frasco coletor modificado por Perioto (1990), e a de Moericke (1950), responsáveis, respectivamente, por 58,7% e 31,0% das capturas de parasitóides.

Masner & Goulet (1981), Steyskal *et al.* (1986) e Maranhão (1976) apresentam outros tipos de armadilhas que podem ser utilizadas na captura de parasitóides.

Criação de hospedeiros

Este é o melhor método para coleta de parasitóides, possibilitando a associação com o hospedeiro e proporcionando uma série de informações sobre o hábitat, época de ocorrência, gama de hospedeiros e estágio de desenvolvimento do hospedeiro quando do ataque do parasitóide. Além disso, pode-se também associar machos e fêmeas e obter grande número de exemplares de uma mesma espécie, o que viabiliza o estudo da variação intra-específica. A associação com o hospedeiro, em si, já é uma grande ajuda na identificação de parasitóides (Grissell & Schauff, 1990).

Quando os potenciais hospedeiros dos parasitóides são coletados no campo, é necessário anotar o maior número possível de informações, tais como:

- Data e o local de coleta. O local de coleta deve ser o mais exato possível, possibilitando que seja facilmente encontrado por qualquer outra pessoa que deseje obter mais exemplares de um inseto ali capturado. Deve-se dar preferência a referências oficiais e permanentes, como por exemplo "Brasil - SP - Orlandia - Fazenda Sta. Mariana - Rod. SP-352, km 138 - cerrado - próximo ao córrego Água Limpa, 15 km ao Sul da sede do município". A utilização de coordenadas geográficas é altamente indicada. Tal informação pode, atualmente, ser obtida com grande precisão através da utilização de receptores GPS (Global Positioning System) portáteis, de custo relativamente baixo. Deve-se evitar informações do tipo "São Simão - Sítio São José - perto do ipê amarelo", pois existe mais de um município com essa denominação no país, o nome "Sítio São José" é extensivamente utilizado pela população e o ipê amarelo pode ser facilmente cortado ou atingido por um raio;

- Nome completo do coletor e, sempre que possível, o nome da instituição na qual ele trabalha;

- Nome popular e científico e parte da planta sobre a qual se desenvolve o hospedeiro. No caso de o nome científico da planta ser desconhecido, é imprescindível que sejam feitas exsiccatas e que essas sejam enviadas para identificação por especialistas. É sempre desejável que tais exsiccatas contenham órgãos reprodutivos da planta, tais como flores e frutos. No caso de a planta não estar em época de reprodução, esta deve ser marcada, para posterior coleta de material. Deve-se também anotar os dados a respeito do local onde a planta se desenvolve (como, por exemplo, "em charco", "na borda da mata"), de seu estágio de desenvolvimento, de sua abundância no local de coleta, etc.

Todas as informações devem acompanhar o material coletado até a obtenção dos parasitóides em laboratório. Deve-se evitar a anotação única e exclusiva de tais dados em caderneta

de campo e a utilização de etiquetas codificadas, pois sempre há o risco da perda dos dados ou da impossibilidade de decodificá-los.

Durante a coleta deve-se obter, sempre que viável, o maior número possível de potenciais hospedeiros. Com grandes amostras, aumentam as chances de obtenção tanto de hospedeiros adultos (cuja identificação, de forma geral, é muito mais fácil que a de estágios imaturos), quanto de um maior número de parasitóides.

Quando da não obtenção de formas adultas do hospedeiro, todas as informações a respeito de sua forma imatura e do ambiente na qual foi coletada devem ser preservadas e utilizadas na tentativa de se identificar sua espécie. A anotação "obtido de lagarta de noctuídeo em vegetação de cerrado", por exemplo, é muito melhor do que "lagarta desconhecida". As informações acima, quando conjugadas com a existência de indicações precisas do local de coleta, aumentam, sobremaneira, a possibilidade do encontro posterior do hospedeiro.

O transporte do material coletado para o laboratório deve ser realizado de maneira a se evitar a morte dos potenciais hospedeiros e, conseqüentemente, dos parasitóides a eles associados. A utilização de refrigeração, a coleta do material nas horas menos quentes do dia e o transporte do material para o laboratório no menor tempo possível, dentre outras práticas, podem reduzir a perda desse material.

De maneira geral, as larvas de lepidópteros podem ser acondicionadas em recipientes de vidro de tampa rosqueável ou de polietileno. Este é vantajoso em relação ao vidro em muitos aspectos, pois é leve, barato, à prova d'água e não quebra; além disso, permite alguma troca de gases, possibilitando, assim, que o inseto permaneça vivo por longos períodos. De preferência, a tampa deve ser telada, sendo este requisito obrigatório para frascos de vidro. É aconselhável usar telas relativamente reforçadas, uma vez que alguns grupos de insetos apresentam mandíbulas muito fortes, podendo facilmente cortar tecidos como "voil" e organza. No interior do recipiente, devem ser colocados a respectiva etiqueta de localidade e demais dados e uma pequena quantidade do vegetal do qual o inseto se alimenta. Este material, além de servir de alimento às lagartas, atua também como suporte, diminuindo as chances de danos durante o transporte.

Deve-se levar ao laboratório um suprimento suficiente de alimento para as lagartas, tendo em vista que algumas espécies têm um longo período de vida na sua forma imatura. Esse suprimento deve ser levemente umedecido logo após a coleta e acondicionado em sacos plásticos, os quais devem ser mantidos à sombra e, em dias de muito calor, preferencialmente em caixas de isopor, para melhor preservação do material. No laboratório, o estoque de alimento é mantido em geladeira, sendo retirado todo o ar possível do interior dos sacos plásticos. Com este procedimento, as partes vegetais

permanecem adequadas para alimentar os insetos por alguns dias, dependendo da espécie vegetal. Após isto, é importante fornecer alimento fresco.

Outra alternativa é fornecer dieta artificial, já que muitas espécies podem ser criadas nesse meio. A dieta pode ser colocada em copos descartáveis ou tubos de vidro e o inseto pode recebê-la já no campo, no momento de sua coleta, ou quando chegar ao laboratório.

É importante tomar cuidado na manipulação de lagartas, tendo em vista a possibilidade de ocorrência de acidentes com espécies urticantes. Nesse caso, é necessária a busca de socorro médico, preferencialmente levando-se uma amostra do agente causador, dada a possibilidade de graves reações ao veneno desses insetos.

As posturas e ootecas de insetos podem ser facilmente transportadas em tubos plásticos que embalam filmes fotográficos. As galhas (ou cecídias), assim como as folhas contendo insetos minadores, podem ser transportadas ao laboratório no interior de sacos plásticos umedecidos e, caso o tempo entre a coleta e a chegada ao laboratório seja longo, pode-se colocar algodão umedecido na base, evitando-se assim a dessecação.

Os frutos podem ser transportados no interior de sacos plásticos. Deve-se evitar a colheita de frutos muito maduros (a não ser que se busque parasitóides de insetos decompositores), pois, de forma geral, tem sido observado que a emergência de micro-himenópteros de frutos, tanto aqueles fitófagos quanto os associados a larvas de insetos que se desenvolvem no interior dos frutos, se dá quando esses ainda se encontram verdolengos ou "de vez".

Sacos plásticos, utilizados no transporte das amostras, devem ser relativamente resistentes. É importante evitar que ocorra excessiva condensação de água em suas paredes, o que, geralmente, danifica tanto os parasitóides quanto os pequenos hospedeiros. Para amenizar o problema, pode-se colocar pedaços de papel absorvente no interior dos sacos plásticos.

Como recomendação geral, recipientes contendo insetos vivos devem ser sempre mantidos em ambiente fresco e à sombra, uma vez que esses organismos morrem rapidamente quando expostos ao sol, em um espaço fechado. Também devem ser evitadas a superlotação e a agitação excessiva do material. O número de espécimes por recipiente é variável de acordo com a espécie. Predadores e espécies mais agressivas ou canibais devem ser mantidos isolados para evitar perdas e/ou danos.

A triagem do material coletado, antes de sua colocação nas gaiolas ou recipientes destinados à criação de parasitóides, deve ser criteriosa, evitando-se a manutenção conjunta de mais de uma espécie de hospedeiro em cada recipiente. A individualização dos hospedeiros deve ser tomada

como norma. Tal prática impede, ou dificulta sobremaneira, as associações incorretas entre hospedeiros e parasitóides. Estas associações errôneas devem ser evitadas a todo custo, pois podem permanecer despercebidas e representar uma fonte de confusão na literatura por longos períodos de tempo (Shaw¹ citado por Gauld & Bolton, 1988).

A individualização dos hospedeiros possibilita ainda que, quando um determinado parasitóide for obtido, este possa ser associado ao seu casulo, aos restos de sua exúvia, de seu mecônio e aos restos de seu hospedeiro. Permite ainda que informações importantes a respeito de seus hábitos possam ser obtidas, como por exemplo, se a espécie é solitária ou gregária. Todas estas informações podem ser úteis na identificação. Este material auxiliar é melhor armazenado a seco, em cápsulas de gelatina, que podem ser espetadas no mesmo alfinete em que está montado o parasitóide (preferível) ou então em um outro alfinete, com etiqueta idêntica, mas com alguma forma de associação com o adulto a que se refere.

Diversos tipos de gaiolas podem ser construídas para a criação de parasitóides, a partir de copos e recipientes de plástico, de vidro, etc. A dimensão e disposição de tais gaiolas são, geralmente, determinadas pelo tamanho da parte da planta ou outro substrato onde se desenvolve o hospedeiro potencial. Para promover a aeração desses recipientes, utilizam-se tampas teladas, preferencialmente empregando-se "voil"; este tecido apresenta malha bastante fina, que impede a fuga de parasitóides. Para a manutenção da umidade no interior dos recipientes, embebem-se chumaços de algodão em água, colocando-os no interior do recipiente ou externamente, por sobre o "voil".

As gaiolas ou recipientes utilizados na criação de parasitóides devem ser mantidas, preferencialmente, em salas com temperatura, umidade e luminosidade controladas. A manutenção destas condições é indicada, dada a necessidade de manter o desenvolvimento do hospedeiro potencial pelo tempo necessário até a emergência do parasitóide. Entretanto, a ausência de controle sobre todas estas condições não impede, na maioria dos casos, a criação destes insetos em condições de laboratório.

Após a emergência dos parasitóides adultos, tendo sido obtido um número satisfatório destes insetos para os fins aos quais se destinam (identificação, estudos de biologia, etc.), é interessante buscar nos hospedeiros restantes, exemplares de suas formas imaturas (larvas e pupas), que devem ser conservadas e, quando necessário, utilizadas em trabalhos de descrição dos

SHAW, M.R. Parasitic control. In: FELTWELL, J. **Large white butterfly**: the biology, biochemistry and physiology of *Pieris brassicae* (Linnaeus). The Hague, 1982. p.401-407.

estágios maduros, dentre outros. O sacrifício de hospedeiros e sua necropsia podem indicar os locais de desenvolvimento dos parasitóides e a forma pela qual causam a morte do hospedeiro. A coleta dos parasitóides que emergirem pode ser feita através da utilização de aspiradores entomológicos, nas gaiolas de maior tamanho, ou com um pincel fino embebido em água, nos recipientes e gaiolas menores.

Uma alternativa derivada da criação de hospedeiros é a exposição, no campo, de hospedeiros criados em laboratório. Pupas de mosca-doméstica, por exemplo, podem ser embaladas em saquinhos de "tule" ou de tela de nylon, os quais, por sua vez, são colocados no esterco de galinhas poedeiras, onde parasitóides podem atacar as pupas. Ovos de noctuídeos ou de pentatomídeos podem ser fixados em plantas e, deste modo, ser atacados por seus respectivos parasitóides. O período de exposição geralmente é menor do que a duração da fase do hospedeiro exposta.

Sacrifício de insetos

Os insetos geralmente são sacrificados em frascos ou tubos mortíferos, os quais podem ser facilmente montados a partir de um frasco de vidro de boca larga (aqueles com medidas aproximadas de 15 cm de altura por 7 cm de diâmetro são ideais), provido de tampa metálica rosqueável. No fundo do frasco deve ser fundida uma camada de gesso, com aproximadamente 2,5 cm de altura. É nesta camada de gesso que deve ser derramado um agente químico para matar os insetos. Vidros maiores que os acima especificados são de difícil manuseio durante as coletas, enquanto que os menores dificultam a introdução do fundo da rede entomológica em seu interior.

O sacrifício de parasitóides adultos que emergiram da criação de hospedeiros em laboratório também pode ser feito com frascos mortíferos, os quais podem ter um tamanho menor que o daqueles anteriormente descritos.

Borror & DeLong (1969) sugerem a utilização de cianureto para a morte dos insetos. Entretanto, esta substância representa um grande perigo ao entomologista durante seu manuseio, pois trata-se de um veneno potente, de ação rápida e sem antídoto conhecido. Deste modo, desaconselha-se o seu uso.

A utilização de acetato de etila é recomendada por muitos autores por "tontear" os insetos rapidamente, com a desvantagem da morte dos exemplares ser um pouco lenta. O acetato de etila é

um líquido altamente inflamável e transparente; segundo Bretherick (1981), seus vapores são explosivos em concentrações entre 2,5 - 11,5% no ar e sua inalação prolongada pode causar danos aos rins e ao fígado. Insetos mortos por vapores de acetato de etila permanecem relaxados por mais tempo (Oldroyd, 1958; Norris & Upton, 1974). Além disso, os micro-himenópteros não encarquilham tanto quando mortos por este produto (Boucek, 1988).

O clorofórmio também pode ser usado para matar insetos. É um líquido altamente volátil, transparente e de odor característico. Devido à sua alta volatilidade, deve ser repostado com maior frequência no frasco mortífero. Pode-se aumentar a sua duração colocando-se pequenos pedaços de borracha sob a camada de gesso.

De acordo com Bretherick (1981), os vapores de clorofórmio têm propriedades anestésicas, podendo causar tonturas, dores de cabeça e vômitos e, em altas concentrações, podem levar à inconsciência. É irritante aos olhos, podendo causar conjuntivites. Em estado líquido, é venenoso quando ingerido. Ainda, suspeita-se que seja carcinogênico. Segundo Steyskal et al. (1986), deve-se tomar cuidado quando da abertura de vidros que contêm clorofórmio, principalmente aqueles claros e expostos à luz, pois há a possibilidade da ocorrência de reações químicas no interior dos frascos, que originam o fosgênio (COCl_2), um gás extremamente tóxico.

Para aumentar a eficiência do frasco mortífero, há algumas recomendações a serem seguidas: deve-se deixá-lo aberto apenas o tempo suficiente para a introdução e retirada dos insetos, evitando-se que os gases escapem; seu interior deve ser mantido sempre seco, uma vez que a umidade porventura condensada na parede do frasco pode estragar os insetos mais delicados. A exposição do frasco ao sol acelera a perda dos gases venenosos e aumenta a condensação de água em seu interior. Para evitar este problema, deve-se manter no interior dos frascos mortíferos pedaços de papel absorvente, os quais precisam ser trocados frequentemente; esses servem, também, de apoio para os insetos coletados, prevenindo que os mesmos se danifiquem durante o transporte. Seu tamanho deve ser tal que fique firme no interior do frasco.

Um frasco que tenha sido usado no sacrifício de lepidópteros adultos não deve receber outros insetos, a não ser que antes seja criteriosamente limpo. Caso contrário, o tegumento dos espécimes nele colocados poderá ficar recoberto por escamas, o que dificultaria a sua limpeza e aumentaria o risco de danificar o exemplar. Além disso, insetos como os coleópteros podem dilacerar as asas dos lepidópteros antes de serem mortos pelos gases.

O tempo necessário para a morte dos insetos no interior dos frascos mortíferos depende de uma série de variáveis, como o tamanho do inseto e o seu grau de tolerância ao agente químico, a temperatura do ambiente, o agente químico utilizado, etc. Desta forma, a experiência do coletor irá

indicar a duração deste período. Ressalta-se que a permanência dos insetos no frasco mortífero deve se restringir ao mínimo necessário para que ocorra a morte dos exemplares, pois alguns agentes químicos podem alterar, ou mesmo descolorir os exemplares obtidos. É importante certificar-se da morte dos exemplares antes de seu preparo, pois a utilização de insetos ainda vivos pode por a perder todo o trabalho necessário à sua montagem.

Outra forma de sacrificar os parasitóides e demais insetos é colocá-los em congelador por algum tempo. Já a utilização de soluções de formalina não é recomendável, pois os insetos ficam muito enrijecidos (Steyskal et al., 1986). O gás carbônico pode ser utilizado em laboratório para anestesiá-los ou matá-los, com bons resultados.

O uso de etanol para o sacrifício de parasitóides é motivo de controvérsia. Steyskal et al. (1986) recomendam seu uso, afirmando que a utilização do etanol a 95% é uma forma de prevenir o encarquilhamento dos exemplares durante a secagem e também o efeito "ballooning" nas asas². Por outro lado, este procedimento é desaconselhado por outros, como Oldroyd (1958) e Noyes (1982), principalmente quando se trata de calcidóideos. No caso destes organismos terem sido mortos com etanol, como acontece em armadilhas de Malaise, por exemplo, devem ser retirados e secos o mais rápido possível.

Os parasitóides adultos não devem ser mortos logo após sua emergência e sim um a dois dias depois. Este tempo é necessário para que seu tegumento endureça e que sua coloração característica se fixe. Exemplares mortos prematuramente podem ficar encarquilhados após o processo de secagem, com a coloração diferente do padrão de cores da espécie; além disso, quando estes são armazenados em etanol, o risco de ocorrer o "ballooning" das asas é maior.

Armazenamento temporário

É sempre preferível efetuar a montagem dos parasitóides logo após o seu sacrifício, pois seus músculos ainda se encontram relaxados, o que facilita a operação. Entretanto, muitas vezes não é possível a montagem imediata dos exemplares obtidos, que devem então ser adequadamente estocados, evitando-se deste modo perdas de material.

² Efeito "ballooning": preenchimento das membranas que formam as asas pelo líquido conservante, que, por esse motivo, se tornam infladas.

Quando a montagem do material ocorrer um ou dois dias após seu sacrifício, este pode ser mantido sob refrigeração, no interior de um frasco com tampa de fechamento hermético, tomando-se o cuidado de forrar as paredes do frasco com papel absorvente, o que evita a condensação de água em seu interior. Neste caso, não há necessidade de secagem dos insetos.

Quando for preciso armazenar os insetos por períodos maiores, os espécimes devem necessariamente estar secos. Entretanto, muitos parasitóides têm o tegumento delicado e encarquilham bastante durante o processo de desidratação. Deste modo, certos cuidados devem ser tomados antes de sua secagem (*ver Preparo para montagem: Secagem*).

Uma boa técnica para armazenar um grande número de insetos a seco consiste em colocá-los entre camadas de papel absorvente, em recipiente de plástico que possa ser hermeticamente fechado (tipo "Tupperware"). No fundo deste, colocam-se folhas de papel toalha macio ou de lenços de papel; sobre estas, espalham-se os insetos, pondo-se a seguir outra camada de folhas de papel absorvente, formando assim um conjunto de camadas. Quando mais de uma camada de insetos for assentada, deve-se colocar uma folha de papel comum entre os conjuntos, para evitar perda de insetos quando um destes for retirado. Noyes (1982) recomenda o uso de recipientes pequenos, medindo cerca de 5x4x2cm, para facilitar exames subseqüentes; recipientes um pouco maiores, porém, medindo 10x10x4cm, também podem ser empregados com sucesso. A etiqueta entomológica pode ser colocada sobre a última camada de insetos, quando todos eles têm a mesma procedência, ou então prepara-se uma para cada camada, agrupando-se por camada os exemplares de procedência comum.

O grande problema neste tipo de armazenamento é o crescimento de fungos; para evitá-lo, pode-se colocar naftalina moída ou em pó no fundo da caixa. Além disso, os insetos devem estar secos antes desta ser fechada. O armazenamento nestas condições pode durar desde alguns dias até vários anos. Quando os exemplares precisarem ser examinados, a tampa é retirada e a caixa é colocada dentro de uma câmara de amolecimento, para diminuir os riscos de danos aos espécimes (*ver Preparo para montagem: Amolecimento*).

Quando até 300 insetos estão envolvidos, talvez o método mais rápido de armazenamento seja a sua colocação em bolsinhas ou bolas de lenços de papel, inseridas em tubos de vidro ou de plástico de 2,5 ou 1,2 cm de diâmetro. Para isto, coloca-se um lenço de papel na abertura do tubo, empurrando-o com um lápis, de modo a formar uma cavidade, onde os insetos são guardados. A seguir, o papel é enrolado, com o polegar e o indicador, até logo acima dos espécimes, sendo o excedente cortado e a bolsinha formada empurrada para o fundo do tubo; um pedaço de papel filtro ajudará a segurá-la no lugar. Junta-se naftalina moída para impedir o crescimento de fungos, a etiqueta

entomológica e fecha-se o tubo com sua tampa. No momento de examinar os insetos, deve-se destampar o tubo e colocá-lo em uma câmara de amolecimento (*ver Preparo para montagem*), para evitar danos aos espécimes (Noyes, 1982).

Para o armazenamento de pequenas quantidades de exemplares, pode-se empregar cápsulas de gelatina, que são utilizadas na embalagem de medicamentos. Estas cápsulas, preferencialmente transparentes, podem ser adquiridas em farmácias de manipulação. Também aqui, os espécimes devem estar completamente secos antes de serem armazenados. Estas cápsulas podem ser transfixadas por alfinetes entomológicos e armazenadas na coleção. As etiquetas entomológicas devem acompanhar as cápsulas, sendo fixadas no mesmo alfinete (Noyes, 1982). A utilização de algodão como forma de proteger os exemplares durante seu armazenamento é desaconselhada, pois suas fibras freqüentemente se enroscam nos seus apêndices, podendo danificar os exemplares.

Com relação ao armazenamento de parasitóides em etanol, Noyes (1982) considera que esta deve ser a última alternativa. O material em etanol degenera relativamente rápido, principalmente se mantido exposto à luz do dia e a temperaturas acima de 20°C. Segundo este taxonomista, insetos menores do que 1,5 mm, mantidos nestas condições, estarão imprestáveis após um ano ou dois. Mesmo mantidos no escuro e em locais mais frios, ficarão inúteis em apenas 10-15 anos. Espécimes mantidos sob a luz vão descorando e as nervuras das asas podem ficar transparentes. Quanto mais tempo permanecem no etanol, mais difícil fica para se prepararem boas lâminas. O principal motivo é a tendência de um colapso do espécime quando da sua transferência do agente clarificador para o bálsamo do Canadá (*ver Preparo de lâminas*). Porém, caso seja inevitável usar o etanol, o material deve ficar no escuro e de preferência em um congelador, para minimizar a sua deterioração, o que vai encarecer a manutenção de grandes coleções.

Preparo para montagem

Amolecimento

Os insetos preservados a seco necessitam ser amolecidos antes de seu manuseio. Noyes (1982) recomenda a utilização de câmaras com atmosfera de ácido acético glacial. Estas câmaras podem ser confeccionadas a partir de um recipiente (preferencialmente de vidro), provido de tampa de fecho hermético, de dimensões tais que possam abrigar em seu interior uma placa de Petri pequena. O

fundo do recipiente é coberto com uma camada grossa (aproximadamente 1cm) de tecido de algodão, que é embebido de ácido acético glacial na proporção de 0,67 a 1ml para cada 100ml de recipiente.

Os exemplares a serem amolecidos são colocados sobre papel filtro em uma placa de Petri, que é então levada à câmara de amolecimento. O tempo necessário para o amolecimento dos exemplares varia com o seu tamanho, grau de desidratação, etc., sendo no mínimo de 6 horas. O ácido acético deve ser repostado periodicamente no recipiente, sendo importante observar a proporção correta. Se houver pouco ácido, o inseto ainda permanecerá quebradiço; se houver excesso, as setas e as asas ficarão grudadas no corpo do mesmo. Esta câmara de amolecimento equivale a uma câmara úmida, só que não se utiliza água no seu interior, para evitar os mesmos problemas que ocorreriam no caso de excesso de ácido, além do crescimento de fungos.

Limpeza

Em sua grande maioria, os parasitóides são insetos bastante pequenos; deste modo, partículas estranhas, como gordura, muco ou qualquer outra impureza depositada sobre o seu tegumento podem recobrir estruturas importantes para a sua identificação. Quando necessária, a limpeza dos exemplares deve ser efetuada, preferencialmente, antes de sua montagem ou armazenamento. A limpeza mecânica, com pincéis finos e macios, só é possível naqueles de maior tamanho, devendo-se tomar cuidado para que estruturas como setas, antenas e palpos maxilares e labiais e pernas não sejam quebradas. A limpeza mecânica dos exemplares menores deve, preferencialmente, ser feita através de aparelhos de ultra-som. Quando os exemplares destinarem-se ao preparo de amostras para a microscopia eletrônica de varredura, a limpeza com ultra-som deve ser feita, não importando o tamanho do exemplar.

Estes aparelhos de ultra-som são comumente utilizados na limpeza de instrumentos cirúrgicos ou outros mecanismos delicados, como relógios, e são constituídos de uma pequena banheira de aço inoxidável montada sobre uma fonte de ultra-som. Os exemplares a serem limpos devem ser colocados em um pequeno frasco com etanol e depois na banheira. Eppendorfs (tubos para microcentrifuga, com tampa própria e fundo cônico) de 2,5 cm³ são ideais para esta operação. O tempo para limpeza dos exemplares pequenos é de aproximadamente 10 a 12 segundos, devendo o pesquisador fazer experimentos para determinar o tempo ideal. De forma geral, os exemplares obtidos em armadilhas, onde a deterioração dos tecidos moles é mais rápida, devem ser processados em tempos menores. A utilização de tempos mais longos de exposição ao ultra-som pode danificar seriamente os exemplares.

Vários solventes orgânicos, tais como clorofórmio e acetona, podem ser utilizados na limpeza de parasitóides, com resultados satisfatórios. Estes solventes, entretanto, solubilizam também as gorduras provenientes do próprio corpo do inseto que, com a evaporação do solvente, se depositam sobre o tegumento na forma de uma fina camada de gordura, podendo comprometer a visualização de detalhes estruturais.

A utilização de soluções detergentes para a limpeza de parasitóides, apesar do desconhecimento das conseqüências de seu uso a longo prazo, tem apresentado bons resultados. A técnica desenvolvida por M. T. Tavares (*UNIARA, comunicação pessoal*) consiste na utilização de uma solução aquosa de detergente concentrado (*tipo Veja Limpeza Pesada®*) a 50%, onde os exemplares são mergulhados por aproximadamente uma hora. Após este período, os exemplares são lavados em água e, a seguir, passam por soluções em concentrações crescentes de etanol até atingirem 100%, sendo secos em seguida.

Secagem

De forma geral, a secagem de espécimes biológicos, sem danos à sua estrutura, exige processos relativamente lentos e trabalhosos. No que se refere aos parasitóides, o principal problema enfrentado durante a sua secagem é o encarquilhamento. Este fenômeno resulta das forças de tensão superficial da água que, ao evaporar na superfície do tegumento dos exemplares, "puxa" as moléculas de água do interior do inseto, enquanto que aquelas próximas ao tegumento, por sua vez, "puxam-no" pelo seu lado interno, causando o enrugamento dos tecidos menos resistentes.

Os exemplares de tegumento mais resistente podem ser secos à temperatura ambiente, tomando-se o cuidado de distender adequadamente suas asas com o auxílio de um pincel macio. Quando preservados em etanol, os parasitóides devem ser retirados e colocados sobre papel cartão ou outro tipo de papel não muito absorvente, juntamente com uma gota de etanol. A seguir, as antenas e as asas, inclusive as posteriores, são complemente distendidas sobre a superfície do cartão, com um pincel fino e macio, umedecido em etanol. Deixa-se o líquido ir evaporando, até que o inseto esteja praticamente seco, quando então é retirado com um pincel seco. Pode ser necessário segurar o inseto na posição desejada enquanto o etanol evapora. Não se deve permitir que o espécime seque totalmente, pois há o risco de que suas antenas e asas fiquem aderidas ao papel. A montagem é feita logo a seguir (Noyes, 1982).

Se os espécimes tiverem o tegumento delicado, certamente vão encarquilhar se forem simplesmente secos ao ar. Na tentativa de minimizar o problema, podem ser utilizadas as seguintes técnicas:

- Secagem com HMDS: o HMDS, sigla de “hexamethyldisilane”, é um líquido altamente volátil (deve ser mantido sob refrigeração) e tóxico (deve ser manipulado em capelas com exaustão forçada), dificilmente encontrado no mercado nacional (pode ser importado via SARDI - Instituto Butantã) e bastante caro (aproximadamente R\$ 75,00/100 ml). Os exemplares são imersos nesta substância e, posteriormente, secos à temperatura ambiente. De forma geral, produz bons resultados. Entretanto, seu alto preço, a dificuldade de obtenção e a periculosidade associada a seu uso devem ser levados em conta;

- Secagem em refrigeradores tipo “frost-free”: o exemplar é mergulhado em uma solução fraca de etanol, em um recipiente aberto (uma pequena placa de Petri) que é colocada em um congelador “frost-free”. A solução etanol-água é então sublimada, num período que pode variar de alguns dias a uma semana, mantendo o exemplar a sua forma túrgida (Grissell & Schauff, 1990);

- Secagem em nitrogênio líquido (“freeze drying”): o espécime é rapidamente congelado em nitrogênio líquido e a água é posteriormente sublimada em condições de baixa temperatura e alto vácuo. É um método relativamente caro, sendo ainda necessário um longo tempo para a secagem de uma única amostra;

- Secagem ao ponto crítico: considerado o melhor método para a secagem de parasitóides (ver Gordh & Hall, 1979), apesar do alto custo inicial do equipamento, chamado secador de ponto crítico ou aparelho de secagem por ponto crítico. Esta técnica vem sendo cada vez mais utilizada, pois, quando a operação é conduzida corretamente, o inseto fica com o aspecto parecido com o que tinha quando vivo, ou seja, não encarquilha. Porém, apenas insetos mortos recentemente ou armazenados em etanol a 70% podem ser processados.

O método fundamenta-se no princípio de que, quando um líquido em equilíbrio com seu próprio vapor é aquecido em um ambiente fechado, as densidades das fases líquida e gasosa se igualam, a uma dada temperatura, que é chamada de temperatura crítica. A pressão crítica é aquela na qual uma dada substância pode existir como um gás em equilíbrio com o líquido na temperatura crítica. O ponto crítico é definido como aquele onde a pressão e a temperatura crítica ocorrem simultaneamente. Acima deste ponto, a tensão superficial deixa de atuar, dada a inexistência de distinção entre gás e líquido. Na realidade, neste ponto, observa-se a existência de um fluido de densidade variável. Com o controle simultâneo da temperatura, da pressão e da massa deste fluido em um dado volume, acima do ponto crítico, é possível transformá-lo de líquido em gás, na ausência

de forças de tensão superficial. Assim, caso uma amostra (um parasitóide, por exemplo) esteja imersa neste fluido, quando de seu retorno à temperatura e pressão ambiente, sua secagem terá ocorrido.

Em tese, poder-se-ia utilizar a própria água como solvente. Entretanto, devido à alta temperatura e pressão crítica da água (374,1°C e 218,3atm, respectivamente), que certamente danificariam o exemplar, esta é removida do interior da amostra e substituída por dióxido de carbono, cujas temperatura e pressão críticas são mais baixas (31°C e 72,9 atm, respectivamente).

Para secar insetos no secador de ponto crítico, é necessário que os mesmos passem por uma série de banhos em soluções de concentrações crescentes de etanol, para serem gradativamente desidratados. Parte-se de uma solução de etanol a 70%, onde geralmente os insetos estão armazenados. A seguir, são mergulhados em soluções de etanol a 80, 90 e 100%, sendo que no álcool absoluto o material sofre dois banhos. O tempo gasto em cada solução é de 10 a 30 minutos, sendo que, para insetos recém-coletados, este período pode se estender por duas horas. Após a última lavagem em álcool absoluto, os espécimes são colocados na câmara do secador de ponto crítico e processados conforme as instruções do aparelho.

Todas estas técnicas, porém, só funcionam se o inseto não estiver encarquilhado.

Montagem de himenópteros parasitóides

Existem divergências quanto ao melhor método de montagem de parasitóides adultos e estas divergências, muitas vezes, expressam preferências pessoais ou de grupos a respeito de determinadas técnicas. A montagem ideal deveria satisfazer aos seguintes atributos:

- Permitir que o maior número possível de detalhes estruturais do exemplar sejam prontamente visíveis;
- Permitir que o exemplar seja facilmente manipulado e examinado sob microscópio estereoscópico, com mínimo risco de danos;
- Que o método de montagem seja relativamente simples e de baixo custo, permitindo que grande número de exemplares seja preparado em pouco tempo e com qualidade satisfatória;
- Que a durabilidade da montagem seja a maior possível.

A partir de tais pressupostos, e tendo em vista que na rotina de laboratório muitas vezes há a necessidade de se trabalhar com grandes quantidades de espécimes, é necessário contrabalançar a utilização de métodos laboriosos, que dão origem a montagens quase perfeitas, com a necessidade de se preparar materiais numerosos (Boucek, 1988; Gauld & Bolton, 1988).

Os parasitóides são, em sua grande maioria, insetos bastante pequenos, o que inviabiliza a utilização do método de montagem mais utilizado pela maioria dos entomologistas: a transfixação dos exemplares com alfinetes entomológicos. Mesmo a montagem dupla (Figura 2A), onde são utilizados micro-alfinetes, é indicada apenas para uma pequena parcela destes insetos, quando então o micro-alfinete deve ser inserido em seu mesotórax, à direita da linha mediana.

A grande maioria dos parasitóides pode ser montada em triângulos de papel (deve-se dar preferência a papéis de coloração branca, de alta gramatura e livres de ácido), na extremidade dos quais os exemplares devem ser colados pela porção lateral ou ventral do tórax (Figura 2B). O melhor método para a obtenção de triângulos para a montagem é através de alicates apropriados (*freqüentemente utilizados para a picotagem de bilhetes de linhas férreas e rodoviárias*), dos quais existem modelos que cortam o papel na forma de triângulos ou de “gotas”, em diversas medidas. De um modo geral, triângulos de 3 mm de base por 8 mm de altura são ideais para a montagem de parasitóides.

Este método apresenta a vantagem de deixar à mostra grande parte do corpo do exemplar, incluindo sua face e mandíbula. Suas principais desvantagens são: a facilidade com que os exemplares podem se desprender do triângulo, devido à pequena quantidade de cola empregada e, principalmente, à pouca proteção oferecida pela montagem, principalmente às antenas, pernas e asas dos exemplares; estas estruturas podem facilmente ser danificadas no caso de uma queda ou de um toque acidental, enquanto o inseto está sendo examinado ou colocado nas gavetas entomológicas.

A montagem se inicia com o preparo dos triângulos, que devem ser transfixados por alfinetes entomológicos (número 0 ou 00) a aproximadamente 2 a 3mm da margem de sua base. Uma gotícula de cola, de tamanho equivalente a 50-75% do volume do tórax do inseto a ser montado, é então colocada na extremidade do triângulo. O exemplar a ser montado deve estar com o seu lado direito voltado para cima. Com o auxílio de microscópio estereoscópico, encosta-se, cuidadosamente, a extremidade do triângulo que contém a gota de cola no tórax do inseto, pelo seu lado direito (Figura 2C), corrigindo-se, se necessário, a sua posição. Logo após a colagem, o alfinete já pode ser fixado em uma base (isopor) enquanto se aguarda a secagem da cola. Quando da montagem de espécimes maiores, pode-se dobrar a extremidade do triângulo para cima ou para baixo, aumentando a área de adesão (Figura 2C).

Noyes (1982) e Boucek (1988) recomendam que a montagem de parasitóides seja feita em retângulos de papel cartão, de 14 x 4,5mm. Estes autores sustentam que este tipo de montagem proporciona melhor proteção aos exemplares e maior área de colagem, enquanto que a superfície branca do papel torna o exame dos exemplares mais fácil. Neste tipo de montagem, o exemplar é

colado de forma tal que o seu eixo vertical fica inclinado cerca de 30-45° em relação à superfície do cartão (Figura 3).

O inseto é colocado sob o microscópio estereoscópico, próximo do retângulo de papel cartão. Com um alfinete, colocar uma gotícula de cola no cartão, mais ou menos no ponto onde as bissetrizes imaginárias dos cantos da borda anterior do retângulo se cruzam (considera-se como borda posterior aquela onde o alfinete será espetado). A quantidade de cola deve ser equivalente a 1/2 ou 2/3 do volume do tórax do inseto. Umedecer levemente com saliva ou água a extremidade de um pincel fino e pegar com este o espécime, tocando-o preferencialmente na mesopleura e tomando muito cuidado para não encostar nas asas; levá-lo até o retângulo, posicionando-o com o lado ventral do tórax na cola, o seu eixo longitudinal ficando alinhado com o eixo maior do retângulo, a sua cabeça apontada para a borda anterior deste. A seguir, inclinar o inseto, de modo que fique apoiado pela sua parte lateral, a uns 30-45° da superfície do retângulo, pressionando-o levemente com o pincel, para melhorar a adesão da cola.

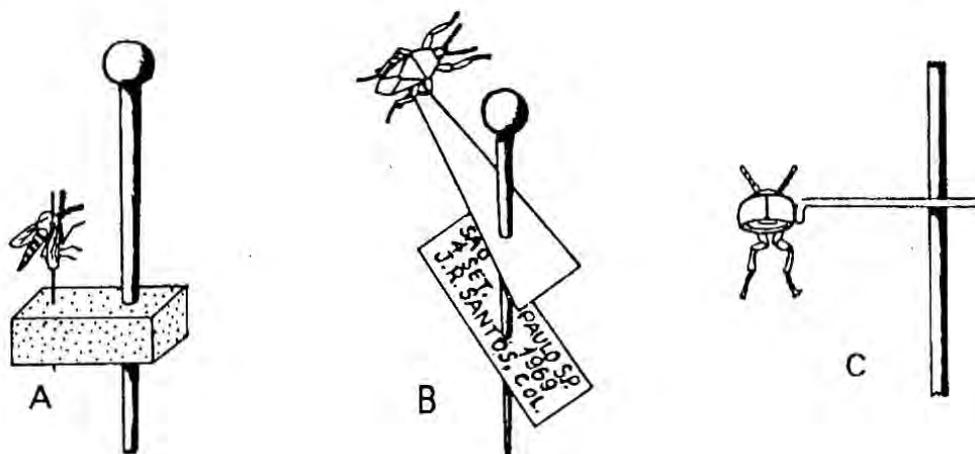


Figura 2. Montagem dupla de insetos. A, espécime em micro-alfinete; B-C, espécimes em triângulo (Fonte: Borror & Delong, 1969).

O tempo entre mergulhar o alfinete na cola e ter o inseto colado na posição correta não deve ser maior do que 6 segundos e só com muita prática isto é conseguido. Se a quantidade certa de saliva foi usada para umedecer o pincel, este deverá estar seco ao final da operação.

O inseto deverá estar devidamente amolecido antes da montagem. Muitas vezes é necessário abrir suas mandíbulas, o que é feito colocando-se o inseto com a região ventral para cima e inserindo um alfinete entomológico bem fino entre as mandíbulas. Depois de colado, o espécime

deverá ter as antenas e as pernas livres, facilitando a visualização da segmentação; as asas devem ser levantadas, de modo a permitir o exame das partes entre e abaixo das mesmas. As alterações nas posições são feitas com um pincel ou alfinete entomológico bem fino. Todos os exemplares devem estar devidamente etiquetados (*ver Etiquetas entomológicas*).

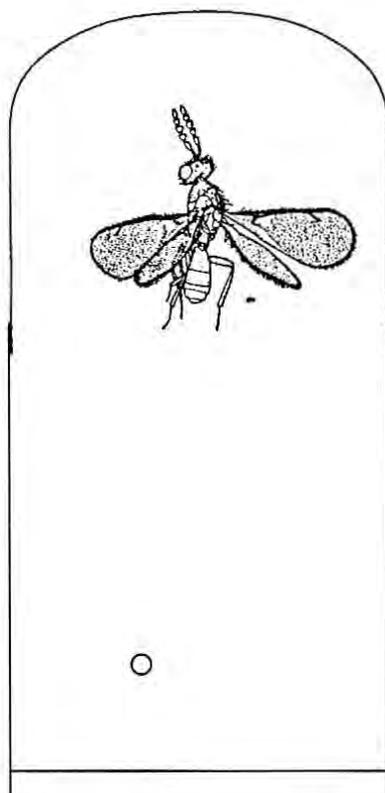


Figura 3. Montagem dupla de insetos: espécime colado em retângulo (Fonte: Noyes, 1982).

A cola a ser utilizada deve ser de preferência solúvel em água e a frio, mesmo depois de seca. Muitas são solúveis em água enquanto frescas, mas depois de secas tornam-se insolúveis ou deixam um resíduo insolúvel. Pode-se fazer um teste antes de usar uma determinada marca de cola e verificar estes aspectos.

A consistência da cola é muito importante. Se muito diluída, pode se espalhar e cobrir outras partes do inseto, o que dificulta o seu exame; além disso, pode ser necessário segurar o exemplar na posição desejada, enquanto a cola seca. Se muito grossa, o espécime pode não aderir bem, caindo com o tempo. A consistência vai depender das condições atmosféricas e do tamanho do

inseto: quanto maior o inseto e mais úmido o tempo, mais espessa precisa ser a cola. De acordo com Noyes (1982), uma boa medida para verificar se a consistência da cola está adequada é inverter o seu recipiente: a cola deve demorar uns 2 segundos para assentar na tampa (o recipiente usado pelo pesquisador media 5,0 x 2,5 cm).

De acordo com Gauld & Bolton (1988), parasitóides pequenos, como os das superfamílias Cynipoidea e Proctotrupeidea, são montados em triângulos, assim como os Ichneumonoidea (A. M. Pentead-Dias, comunicação pessoal). Calcidóideos, entretanto, são montados em retângulos (Boucek, 1988; Noyes, 1982).

Etiquetas entomológicas

As etiquetas entomológicas influenciam muito a aparência de uma coleção de insetos, valorizando-a bastante quando são pequenas, bem ordenadas e apropriadamente orientadas. Devem ser de papel branco, com pH neutro e relativamente duro. Bons resultados podem ser obtidos ao empregar o papel tipo linho, de gramatura igual a 180g/m² (M. T. Tavares, comunicação pessoal). Quanto ao tamanho, os pesquisadores variam um pouco nas suas opiniões, indo desde 6x18mm até 9x18mm. Todos, porém, concordam que deve ser o menor possível, desde que legível. A tinta utilizada deve ser de cor preta, à prova d'água. Tipos devem ser rotulados com etiquetas coloridas.

Todo espécime de uma coleção deve possuir uma etiqueta indicando pelo menos o local e a data de coleta e o nome do coletor. Não se deve colocar apenas uma etiqueta para uma série de insetos, uma vez que um exemplar não etiquetado, quando retirado da coleção para estudos, pode ser recolocado em local errado. As etiquetas devem ser auto-explicativas, evitando-se o uso de letras e números que se refiram a livros e fichários. Cedo ou tarde, estes se perderão e, junto com eles, o valor científico da coleção.

Os nomes de localidades são dispostos em ordem crescente de precisão e alguns pesquisadores sugerem que pelo menos os nomes do país e do estado sejam escritos em letras maiúsculas. As abreviaturas devem seguir algum sistema aceito ou trabalho de referência, sendo conveniente colocar um ponto nas mesmas. Coordenadas geográficas, e algumas vezes a altitude, também são úteis.

Informações biológicas, como tipo de hábitat e identificação do hospedeiro, são muito importantes e podem ser escritas em uma segunda etiqueta; alguns pesquisadores, porém, acham que

é melhor que todos os dados fiquem em uma só etiqueta. Não se escrevem informações no lado inferior das etiquetas. Plantas e insetos hospedeiros são referidos por seu nome científico, evitando-se a citação de nomes vulgares. A citação “ex” é usada para expressar que o exemplar foi observado se alimentando ou foi criado na planta, presa ou hospedeiro mencionado.

A data de coleta contribui para um índice de incidência sazonal. Para evitar confusão, o mês é abreviado com três letras ou expresso em algarismos romanos. O nome do coletor permite que outro pesquisador procure por informações adicionais posteriormente ou julgue se as informações da etiqueta são confiáveis; permite, também, que créditos sejam atribuídos, se o exemplar for de interesse especial.

As etiquetas devem estar em uma altura uniforme nos alfinetes. Para garantir isto, pode-se usar um bloco de montagem (Figura 4), que também pode servir para padronizar a distância do inseto à cabeça do alfinete, recomendada em 10mm.

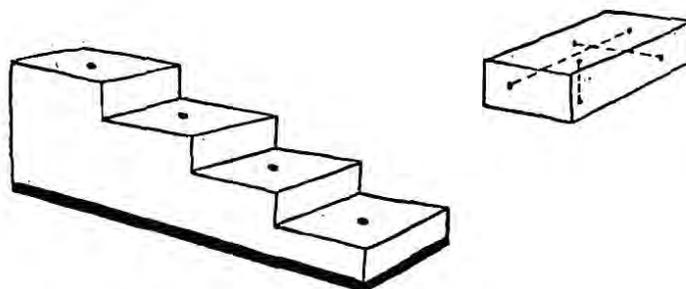


Figura 4. Blocos de montagem (Fonte: Oldroyd, 1958).

Além da uniformidade na altura, as etiquetas devem estar paralelas ao inseto. Quando os insetos são montados em triângulos ou retângulos, a etiqueta fica paralela a estes, sendo o alfinete espetado na sua metade direita. A orientação deve ser tal que todas sejam lidas do mesmo lado; alguns autores preferem que sejam lidas do lado esquerdo, enquanto que outros, do lado direito.

Se houver mais de uma etiqueta espetada num alfinete, a mais baixa deve tocar o fundo da gaveta; as demais são colocadas a intervalos regulares acima dela, de modo que seja possível lê-las sem ter que movê-las. Aliás, deve-se evitar ao máximo mover as etiquetas no alfinete, pois isto faz com que o orifício aumente e a etiqueta caia ou fique girando sem controle. Nunca espetar dois alfinetes em uma etiqueta, pois isto facilita danificar um dos insetos, ao precisar tirar um dos exemplares.

Atualmente, é comum as etiquetas serem feitas em computador. Para a obtenção de etiquetas de 0,9x1,8cm no programa Microsoft Word®, por exemplo, insere-se uma tabela com a

largura das colunas igual a 1,8 cm e espaço entre elas de 0,1cm, sendo a altura das linhas igual a 25 pontos. Se a fonte "Times New Roman" for utilizada, pode-se usar o tamanho 3,5 ou 4 pontos. Com a fonte "Arial Narrow", cabem mais letras por linha. Para melhorar a disposição das linhas nas células, considerando-se 4 linhas, formata-se o espaçamento entre linhas do parágrafo para 1 ponto depois (Figura 5). Pode-se também adicionar bordas às células; na Figura 5, estas têm 1½ ponto de espessura. Para coletas de quantidades elevadas de insetos em um mesmo local, pode-se imprimir um grande número de etiquetas, deixando-se apenas a data para ser completada à mão.

Etiquetas para material conservado em etanol devem ser escritas em papel vegetal, com tinta a prova d'água, sendo colocadas dentro dos frascos, junto com os espécimes. Para garantir que a tinta não se dissolva, é essencial deixá-la secar muito bem antes de colocar a etiqueta no etanol, o que pode ser agilizado colocando-se a etiqueta próxima de uma lâmpada acesa.

O problema em usar lápis é que as letras vão clareando com o tempo, podendo se tornar ilegíveis. Como medida de segurança, pode-se, ao inspecionar a coleção, para completar o nível da solução de etanol, olhar também o estado das etiquetas. Se estiverem se tornando mais claras, adiciona-se uma nova etiqueta, sem descartar a antiga. A etiqueta original deve ser mantida sempre! Se for uma etiqueta muito grande, deve ser dobrada. Se surgirem dúvidas a respeito do exemplar, muito tempo após a sua coleta, muitas vezes só poderão ser esclarecidas se a etiqueta original for consultada (Oldroyd, 1958).

De acordo com Steyskal et al. (1986), o material em fluido deve ser acompanhado por apenas uma etiqueta, de tamanho suficiente para incluir todos os dados e para que fique firme dentro do frasco. Se houver mais de uma etiqueta em um frasco ou se ficarem flutuando livremente, podem danificar o espécime; além disso, não podem ser lidas quando ficam face a face. Porém, segundo Stehr (1987), as etiquetas dos dados de coleta e as de determinação deveriam ser sempre separadas, uma vez que os dados de coleta são permanentes e os dados de identificação podem ser modificados. Para evitar os problemas que trariam por serem pequenas, deveriam medir aproximadamente 45x20mm.

No caso de imaturos, é aconselhável, também, escrever na etiqueta a técnica usada para sacrificar e o fluido empregado para preservar o imaturo. Deste modo, pode-se saber qual fluido adicionar ou em qual examinar o espécime e também possibilita que futuros pesquisadores determinem se os métodos empregados foram adequados para armazenamento a longo prazo.

O hidróxido de potássio (KOH) ou o hidróxido de sódio (NaOH), nas concentrações de 10 a 15% em água, são usados tanto para amolecer o espécime quanto para destruir os tecidos internos, fazendo com que reste apenas as partes quitinizadas do corpo e as partes membranosas entre os segmentos, as quais se tornam moles e transparentes. O espécime pode ser deixado em KOH ou NaOH à frio, até o dia seguinte, o que é melhor para insetos delicados. Insetos maiores e mais quitinizados podem ser fervidos por aproximadamente 5 minutos, sendo necessário, às vezes, fazer um pequeno corte na base de seu abdome, para o KOH ou o NaOH penetrar mais rapidamente.

O tubo de ensaio contendo a potassa ou a soda e o inseto pode ser colocado em um "beaker", no interior do qual há água. Um "beaker" pode conter vários tubos. O conjunto é colocado para aquecer no fogo ou aquecedor elétrico. O tempo de fervura do inseto é determinado pela experiência. O inseto deve afundar no KOH ou no NaOH. Se isso não ocorrer, é necessário fazer um furo no inseto com um alfinete, para que a potassa ou a soda penetrem, e deixar fervendo até que ele afunde.

A seguir, deve-se retirar todo o KOH ou o NaOH possível do exemplar, usando-se água para isso. Uma vez livre do KOH ou NaOH, o inseto passa pelas etapas de desidratação e clarificação. Estas operações são melhor conduzidas em vidros de relógio. Coloca-se ácido acético glacial em um e óleo de cravo em outro, cobrindo-os com uma tampa de vidro. Transferir o espécime com uma pinça fina, evitando levar junto uma gota muito grande de líquido (o excesso pode ser absorvido por papel filtro). Antes de desidratar, examinar o inseto no microscópio, para ver se os tecidos moles estão completamente dissolvidos. O espécime deve estar bem transparente e flácido. Se ainda estiver firme, com partes internas opacas, deve ser colocado em nova solução de KOH ou de NaOH e fervido novamente.

Se necessário, as partes muito transparentes do inseto podem ser coradas com uma solução de fucsina ácida em etanol 20%. O espécime é colocado em ácido acético glacial, em um vidro de relógio, e levado ao microscópio estereoscópio, com luz transmitida, adicionando-se algumas gotas do corante. Deve-se usar uma pequena quantidade de corante, para não haver risco de perda do espécime na solução, quando este absorver o corante. Quando o espécime estiver com o grau de coloração desejado, é retirado da solução e colocado em papel absorvente. A seguir, deve-se retirar toda a água do espécime, o que pode ser feito de duas formas: com ácido acético glacial por 5 minutos, para insetos mais quitinizados, ou em soluções de concentrações crescentes de etanol, para insetos mais moles.

Depois da desidratação, o inseto é transferido para o óleo de cravo e examinado sob microscópio estereoscópio. Se ainda houver água, aparecerão áreas de aspecto leitoso no espécime; neste caso, o mesmo deve retornar ao ácido acético glacial por mais 5 minutos. Ao ser transferido

novamente para o óleo de cravo, deverá estar limpo e a sua transparência aumentada. Para evitar que o óleo de cravo deixe o inseto muito quebradiço, ele deve permanecer neste meio apenas o tempo necessário para que seja clarificado.

O espécime é então colocado na lâmina, com um pouco de óleo de cravo, e sua posição arrumada. Quando estiver na posição desejada, retira-se o óleo de cravo com uma tira de papel absorvente e adiciona-se uma pequena gota de bálsamo do Canadá, com uma haste de vidro e, logo a seguir, a lamínula, a qual não deve ser colocada paralelamente sobre a lâmina; o melhor é encostar um dos lados na lâmina e apoiar o lado oposto em uma pinça ou alfinete e ir abaixando lentamente (Figura 6). Com isso, evita-se o aprisionamento de ar, o que resultaria em bolhas. O bálsamo deve ser coberto o mais rápido possível, para evitar que a sua superfície seque.

A consistência do bálsamo é muito importante: não deve ser muito grosso, de modo que o espécime vá junto com a haste quando esta for retirada, nem tão fino, de modo que o bálsamo se espalhe pela lâmina. Quando estiver muito espesso, pode ser diluído com xilol. Sempre adicionar menos xilol do que achar necessário, pois é mais fácil corrigir a consistência do bálsamo muito espesso do que do muito diluído. Se possível, deixar a diluição ocorrer por difusão, pois podem aparecer bolhas indesejáveis se o bálsamo for agitado.

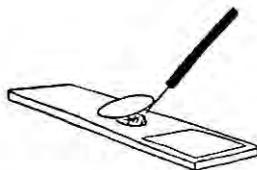


Figura 6. Colocação da lamínula na lâmina (Fonte: Oldroyd, 1958).

As asas não precisam ser tratadas com KOH ou NaOH, pois isso iria fazê-las encarquilhar. Antes de ferver um inseto, suas asas são retiradas e colocadas em xilol. Se houver algum traço de aspecto leitoso, podem ser transferidas para ácido acético glacial por alguns minutos. Caso já estejam boas, podem ser montadas em bálsamo. Se existirem bolhas de ar nas nervuras, estas são eliminadas por um aquecimento brando da asa no xilol, em banho-maria.

O bálsamo do Canadá demora diversas semanas para secar naturalmente. Enquanto isso, a lâmina deve ser mantida na posição horizontal. A secagem pode ser apressada se a lâmina for aquecida em estufa, o que deve ser feito brandamente, para evitar a formação de bolhas.

Preparo de lâminas de Chalcidoidea

De acordo com Noyes (1982), os meios de montagem solúveis em água não têm uma longevidade comprovada, mesmo quando estas são seladas. Já o bálsamo do Canadá proporciona maior duração dos espécimes. Assim, holótipos ou potenciais holótipos devem ser montados neste meio.

A metodologia descrita a seguir foi adaptada da técnica de Prinsloo³ por Noyes (1982). Para evitar o colapso das antenas e da cabeça, os espécimes armazenados em etanol devem ser tratados em KOH ou NaOH por mais tempo, o que pode levar a uma clarificação excessiva. O inseto tem suas antenas, cabeça, asas e abdome ou genitália destacados, os quais são montados em uma só lâmina, mas cobertos por cinco lamínulas diferentes (Figura 7).

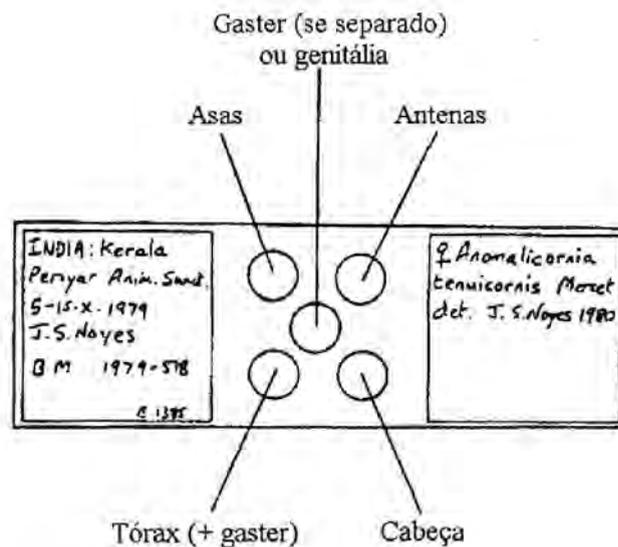


Figura 7. Arranjo das partes de um inseto em lâmina (Fonte: Noyes, 1982).

³ PRINSLOO, G.L. An illustrated guide to the families of African Chalcidoidea (Insecta: Hymenoptera). **Science Bulletin**. Department of Agriculture and Fisheries, Republic of South Africa, v. 395, p. 1-66, 1980.

Método:

1- Montar o espécime em cartão, com a cabeça e asas livres de cola e as antenas expostas. Se as asas estão com cola ou dobradas, mergulhar em KOH ou NaOH a 10% por alguns minutos, pois as asas precisam estar planas. Retirar do KOH ou NaOH e colocar em etanol 70% por alguns minutos, transferindo-se a seguir para o cartão.

2- Quando o espécime estiver seco, remover suas asas, uma de cada vez, e transferi-las para uma pequena gota de bálsamo do Canadá em uma lâmina. Se necessário, diluir o bálsamo com xilol.

3- Colocar uma pequena gota de bálsamo no tórax do espécime. Remover as antenas e grudá-las nesta gota de bálsamo, através do escapo. Fazer o mesmo com a cabeça, fixando-a através da região occipital. Para garantir que estas partes estejam bem coladas, mergulhar a cabeça de um alfinete em xilol e trazê-la o mais próximo do espécime, porém sem encostar nele. Os vapores do solvente irão diluir o bálsamo o suficiente para assegurar uma boa adesão das partes. O espécime é então mergulhado em água e transferido para solução de KOH ou NaOH a 10%, em um vidro de relógio.

4- Garantir que o espécime afundou na solução de KOH ou NaOH. Se as antenas ou cabeça de exemplares muito pequenos se desprenderem do tórax, podem ser fixadas no fundo do vidro de relógio com uma gotícula de bálsamo, usando-se a cabeça de um alfinete. O exemplar também deve ser preso à gota de bálsamo, através do tórax.

5- Se o espécime nunca esteve em etanol, deixá-lo em KOH ou NaOH a 10% por 48 horas, a 20°C ou 24 horas a 40°C. Se o espécime já esteve por qualquer tempo em etanol, deixar em KOH ou NaOH por 72 horas a 20°C ou 24 horas a 20°C seguido por 24 horas a 40°C. Isso é necessário para evitar o colapso da cabeça ou das antenas no momento da transferência para o bálsamo.

6- Após clarificar em KOH ou NaOH, pipetar esta substância e adicionar algumas gotas de ácido acético glacial

7- Após 10 minutos, pipetar o ácido acético glacial e colocar algumas gotas de água destilada.

8- Após 10 minutos, adicionar uma quantidade igual de etanol 70% à água destilada.

9- Após 10 minutos, pipetar o líquido e adicionar algumas gotas de etanol 70%.

10- Após 10 minutos, adicionar uma quantidade igual de etanol absoluto (ou 96%) ao etanol 70%.

Imaturos: sacrifício e preservação

As larvas de parasitóides podem ser encontradas dissecando-se os hospedeiros ou, quando se tratar de ectoparasitóides, simplesmente coletando-os de suas respectivas vítimas. O melhor método para sacrificar os imaturos de parasitóides e de outros insetos em geral é mergulhá-los em água fervendo, por um ou dois minutos. Deste modo, as reações enzimáticas são paralisadas e seus tecidos são coagulados. Além disso, os espécimes ficam distendidos, expondo caracteres importantes para sua identificação (Stehr, 1987).

No campo, geralmente não é possível empregar água fervendo. Visando solucionar este problema, foram desenvolvidas várias fórmulas para sacrificar os imaturos a frio. A maioria destas fórmulas contém água destilada, álcool, ácido acético e alguma outra substância. O álcool é o agente conservante e é empregado na concentração de 70 a 80%. O ácido acético tem as funções de paralisar as reações enzimáticas, o que detém o escurecimento, e ajudar a manter a flexibilidade do exemplar. O querosene é um agente que promove a penetração da fórmula no espécime. Porém, como não é miscível com o etanol, é necessário adicionar um emulsificante, que é a dioxana (Stehr, 1987).

Os himenópteros podem ser sacrificados em KAAD ou em Fórmula de Kahle (Stehr, 1987). O KAAD é uma mistura de querosene (1 parte), etanol 96% (7-9 partes), ácido acético glacial (1 parte) e dioxana (1 parte). De acordo com Sales (1980), a dioxana pode ser substituída pelo emulsificante Triton X-171, que é utilizado em formulações de inseticidas. A quantidade deste produto a ser empregada é de 0,1 parte, mantendo-se as demais quantidades para as outras substâncias. A Fórmula de Kahle é preparada com etanol 96% (15 partes), água destilada (30 partes), formalina (= formaldeído 40%) (6 partes) e ácido acético glacial (1 parte).

Depois de mortos, tanto por água quente como por métodos químicos, os espécimes devem ser preservados em etanol 70-80%; concentrações maiores podem fazer com que o espécime enrugue ou tornar difícil mover estruturas, como as peças bucais. O etanol é o produto mais empregado por ser de baixo custo, fácil aquisição, transparente, não tóxico (externamente) e seu odor não chega a constituir um problema. A desvantagem é a rapidez com que evapora em frascos mal vedados (Stehr 1987).

Existe ainda a possibilidade de armazenamento a seco. Pode-se efetuar a secagem de imaturos em secador de ponto crítico (já mencionado para secagem de adultos), em congelador do tipo "frost free" ou através de um processo químico.

Se for necessário examinar a genitália do macho, esta deve ser removida e montada separadamente no centro da lâmina. Geralmente, é melhor posicionar a genitália com a parte ventral para cima. Para impedir que role pela lâmina, pode-se mantê-la ligada ao esternito apical.

Passadas pelo menos três semanas da transferência das partes do inseto para gotas de bálsamo, estas podem ser cobertas com lamínulas circulares de 6 ou 7mm, sem risco de que as partes saiam da posição. Para as asas e antenas, adicionar bálsamo apenas o suficiente para cobrir a área da lamínula, que deve ser bem pressionada. Se ainda houver espaço vazio nos cantos, colocar uma pequena quantidade de bálsamo em um alfinete e tocar os lados da lamínula, de modo que o bálsamo penetre por capilaridade.

Se o abdome tiver sido dissecado, ele é coberto da mesma maneira que as antenas e asas; porém, se for montado na posição lateral, deve ser coberto como a cabeça ou tórax. Para estas duas estruturas, é essencial que a quantidade correta de bálsamo seja utilizada. Se houver excesso, a lamínula ficará muito alta, o que pode impossibilitar a focalização das partes inferiores, quando se usar objetivas de maior aumento. Se for usado muito pouco, o tórax e a cabeça podem ser esmagados conforme o bálsamo for se contraindo durante a secagem. Um pincel fino pode ser usado tanto para retirar bálsamo em excesso quanto para adicionar em caso de falta.

Com o método descrito a seguir, a quantidade de bálsamo a ser usada pode ser estimada com pouca prática. Primeiro, desenhar um círculo em um cartão, usando a lamínula como modelo. Posicionar a lâmina de tal modo que a parte do inseto a ser coberta esteja no centro do círculo. Colocar uma gota de bálsamo no espécime e espalhá-la com uma cabeça de alfinete, para que cubra exatamente o círculo. Adicionar ou retirar bálsamo, de modo que a sua espessura seja apenas levemente maior que o dobro da altura da parte a ser coberta. Assentar cuidadosamente a lamínula na gota, pressionando-a e mantendo-a o mais nivelado possível, até que o bálsamo chegue na borda por toda a circunferência da mesma. A lamínula deve ficar no mesmo plano da lâmina, o que é importante para que um microscópio de contraste de fase seja utilizado eficientemente. Nesta etapa, a consistência do bálsamo deve ser tal que um fio seja formado quando uma cabeça de alfinete é nele mergulhada e retirada.

As lâminas de microscópio geralmente recebem duas etiquetas adesivas: uma delas, fixada no lado direito da lâmina, é reservada para a identificação da espécie. Na outra, que fica no lado esquerdo, escrevem-se todos os dados possíveis, incluindo o meio usado na montagem (Figura 7).

Imaturos: sacrifício e preservação

As larvas de parasitóides podem ser encontradas dissecando-se os hospedeiros ou, quando se tratar de ectoparasitóides, simplesmente coletando-os de suas respectivas vítimas. O melhor método para sacrificar os imaturos de parasitóides e de outros insetos em geral é mergulhá-los em água fervendo, por um ou dois minutos. Deste modo, as reações enzimáticas são paralisadas e seus tecidos são coagulados. Além disso, os espécimes ficam distendidos, expondo caracteres importantes para sua identificação (Stehr, 1987).

No campo, geralmente não é possível empregar água fervendo. Visando solucionar este problema, foram desenvolvidas várias fórmulas para sacrificar os imaturos a frio. A maioria destas fórmulas contém água destilada, álcool, ácido acético e alguma outra substância. O álcool é o agente conservante e é empregado na concentração de 70 a 80%. O ácido acético tem as funções de paralisar as reações enzimáticas, o que detém o escurecimento, e ajudar a manter a flexibilidade do exemplar. O querosene é um agente que promove a penetração da fórmula no espécime. Porém, como não é miscível com o etanol, é necessário adicionar um emulsificante, que é a dioxana (Stehr, 1987).

Os himenópteros podem ser sacrificados em KAAD ou em Fórmula de Kahle (Stehr, 1987). O KAAD é uma mistura de querosene (1 parte), etanol 96% (7-9 partes), ácido acético glacial (1 parte) e dioxana (1 parte). De acordo com Sales (1980), a dioxana pode ser substituída pelo emulsificante Triton X-171, que é utilizado em formulações de inseticidas. A quantidade deste produto a ser empregada é de 0,1 parte, mantendo-se as demais quantidades para as outras substâncias. A Fórmula de Kahle é preparada com etanol 96% (15 partes), água destilada (30 partes), formalina (= formaldeído 40%) (6 partes) e ácido acético glacial (1 parte).

Depois de mortos, tanto por água quente como por métodos químicos, os espécimes devem ser preservados em etanol 70-80%; concentrações maiores podem fazer com que o espécime enrugue ou tornar difícil mover estruturas, como as peças bucais. O etanol é o produto mais empregado por ser de baixo custo, fácil aquisição, transparente, não tóxico (externamente) e seu odor não chega a constituir um problema. A desvantagem é a rapidez com que evapora em frascos mal vedados (Stehr 1987).

Existe ainda a possibilidade de armazenamento a seco. Pode-se efetuar a secagem de imaturos em secador de ponto crítico (já mencionado para secagem de adultos), em congelador do tipo "frost free" ou através de um processo químico.

Na secagem em congelador do tipo "frost free", os espécimes são congelados na posição desejada e a água que contém é retirada por sublimação, sob vácuo parcial. Roe & Clifford (1976) usaram equipamentos comerciais para construir um secador deste tipo e o empregaram para secar desde insetos imaturos até aranhas.

Na secagem por processo químico, o resultado é semelhante ao obtido no congelador. A técnica a seguir foi rescrita a partir de Stehr (1987). Pode-se partir de insetos vivos ou preservados sem álcool, mas neste último caso, os exemplares devem antes sofrer uma limpeza em solução de detergente, em aparelho de ultra-som (*ver Preparo para montagem: Limpeza*). Quando vivos, devem ser sacrificados em KAAD; para que atinjam o grau desejado de distensão, ficam neste meio por 5 a 30 minutos.

Ao serem retirados do KAAD, os exemplares são transferidos para etanol a 95% por 24 a 48 horas, dependendo do tamanho. A seguir, são colocados em álcool absoluto por mais 24 a 48 horas e, findo este período, o álcool absoluto é substituído, ficando os insetos neste meio por mais 24 horas, para que toda a água seja removida. Ao serem retirados do segundo banho de álcool absoluto, os exemplares são colocados em xileno por 24 horas. A seguir, são removidos e transferidos para toalhas de papel e secos em uma capela ou ao ar livre.

Estas técnicas de secagem servem, também, para imaturos de outras ordens e os exemplares obtidos podem ser montados como adultos, de acordo com seu tamanho. Há uma série de vantagens em armazenar imaturos a seco: eles podem ser colocados juntamente com os adultos associados; cada espécime possui sua etiqueta, a morfologia externa pode ser estudada mais facilmente, pode-se examinar rapidamente um número maior de exemplares, não é necessário se preocupar com a reposição de líquidos. Em compensação, há alguns problemas, como o risco de danos por pragas de museu e a necessidade de amolecer os espécimes, caso se deseje dissecar o inseto ou mover certas estruturas, como as suas peças bucais (Stehr, 1987).

Preparo de lâminas de imaturos

O exame dos imaturos de parasitóides pode ser feito com o material imerso no fluido no qual estão armazenados. Deve-se tomar o cuidado de submergir o material completamente na solução, durante o exame, para evitar distorções ou reflexos. Se ele flutuar, adicionar etanol 96% até que ele afunde. Porém, devido ao tamanho das larvas e redução de estruturas, é mais adequado preparar lâminas de microscopia.

Para o preparo de lâminas de imaturos de parasitóides, pode-se usar material fresco ou conservado em álcool. Quando a diagnose é feita a partir de exúvias contidas no interior de casulos, estes são abertos longitudinalmente, para retirada do mecônio e da exúvia da larva de último instar, a qual é tratada da mesma maneira que larvas frescas. A técnica a seguir, rescrita de Evans (1987), foi desenvolvida por Beirne (1941). A larva é aquecida a 65°C por aproximadamente 10 minutos, em KOH a 10%. Se o tamanho da larva permitir, faz-se uma incisão na parte ventral de sua região mediana. Depois do aquecimento, é lavada com água destilada e colocada em uma lâmina simples ou escavada, com glicerina, e coberta com uma lamínula. Após o estudo, é retirada da lâmina e armazenada em pequenos frascos. Também é possível montar lâminas com meio de Hoyer ou bálsamo do Canadá.

Wahl (1984) considerou que a técnica acima não é satisfatória e a aperfeiçoou: o casulo do qual o parasitóide emergiu é deixado por 12 a 24 horas em água destilada, com 1 a 2 gotas de detergente. A seguir, é transferido para etanol a 70% e aberto longitudinalmente, para retirada do mecônio e da exúvia larval; esta por sua vez, é colocada em um frasco com etanol a 70% e levada a um aparelho de ultra-som pequeno, onde fica por 1 a 2 minutos, para remover impurezas e desdobrá-la. Ainda em álcool a 70%, remove-se a cápsula cefálica, a qual é então clarificada em solução de Nesbitt por 1 a 5 horas, em uma lâmina escavada. Após a clarificação, a cápsula cefálica é montada em uma lâmina juntamente com o restante da exúvia larval, usando-se meio de Hoyer. A lâmina é seca por 3-5 dias a 40-50°C e selada (um bom produto para selar lâminas é o verniz cristal). Se for usado o bálsamo do Canadá, as estruturas precisam ser desidratadas antes da montagem.

Tipos de coleções

Martins (1994) cita os seguintes tipos de coleções:

Coleções didáticas: contêm material destinado a ensino, demonstrações e treinamento. Como este material é constantemente manuseado, está mais sujeito a danos, sendo curta a sua duração. Por este motivo, devem ser independentes das coleções de pesquisa. É comum as coleções didáticas receberem material inadequado para as coleções de pesquisa, como por exemplo, espécimes com os dados incompletos de procedência ou parcialmente danificados.

Coleções de pesquisa: possuem material zoológico de todos os grupos e, sempre que possível, em série e proveniente de várias partes do mundo. São consideradas patrimônio nacional e

internacional. Grandes coleções de pesquisa possibilitam valiosas contribuições à Taxonomia e à Biologia.

Coleções regionais: reúnem espécimes de determinada localidade, área ou região geográfica. São muito importantes, pois podem conter uma representação quase integral da fauna local, desde que se façam coletas constantes ao longo dos anos. De acordo com o autor, este tipo de coleção deveria receber maior atenção por parte das escolas superiores e técnicas, institutos e entidades de pesquisa. Infelizmente isto não ocorre, devido a uma série de fatores, como a falta de recursos, de interesse, de tempo, de apoio ou de orientação. O exame de muitas coleções regionais permitiria o estudo acurado da distribuição da fauna nacional ou mesmo continental.

Coleções especiais: reúnem material destinado a fundamentar estudos específicos, envolvendo aspectos médico-sanitários, agropecuários, alimentares, florestais, de vigilância aduaneira, etc. Podem servir, também, como base para levantamentos faunísticos de um determinado ecossistema. Um outro tipo de coleção especial são as coleções de identificação. Servem de apoio à rotina de identificação de material zoológico para as mais diversas finalidades. Pertencem a instituições voltadas principalmente a este tipo de prestação de serviços, como o “Systematic Entomology Laboratory”, do USDA (“United States Department of Agriculture”), em Washington. Nestas coleções, cada espécie pode ser representada por apenas um casal ou um pequeno número de exemplares que mostrem os diversos graus da variação intra-específica.

Categorias de tipos

A nomenclatura zoológica - sistema de nomes aplicados aos táxons animais - é regida pelo Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICNZ, 1985), um conjunto de regras e recomendações acerca da maneira correta de compor e aplicar os nomes científicos.

O objetivo do Código é “promover a estabilidade e universalidade dos nomes científicos animais e assegurar que o nome de cada táxon seja único e distinto”, isto é, pretende que cada táxon animal tenha um nome único, distinto, estável e universal (Bernardi, 1994). Para atingir este objetivo, o Código vale-se de alguns princípios gerais: i) princípio da prioridade e ii) princípio da tipificação.

i) Princípio da prioridade: no caso de homonímia (*o mesmo nome aplicado a dois ou mais táxons*) ou sinonímia (*dois ou mais nomes para o mesmo táxon*) vale o nome mais antigo. No caso de sinonímia, o sinônimo sênior é o nome válido e o sinônimo júnior deve ser descartado; no caso de homonímia, o táxon que tem o homônimo sênior é privilegiado e fica de posse do nome e o táxon que tem o homônimo júnior deve receber um novo nome.

ii) Princípio da tipificação: sempre que uma nova espécie ou outro grupo é descrito, o autor deve designar um “tipo”, o qual é usado como uma referência quando houver qualquer problema sobre o que aquela espécie ou grupo incluem. O tipo de uma espécie ou subespécie é um espécime (holótipo), o tipo de um gênero ou subgênero é uma espécie (espécie-tipo) e o tipo de uma família ou subfamília é um gênero (gênero-tipo) (Borror & DeLong, 1969).

Além do holótipo, o Código prevê as seguintes categorias de tipos:

Síntipos: se uma nova espécie nominal não tem holótipo, todos os espécimes da série-tipo são “síntipos” e têm igual valor em nomenclatura. Os síntipos podem compreender espécimes rotulados como “cótipo” (no sentido de síntipo); “tipo” ou algum outro termo, ou sem rótulo de identificação; ou espécimes não vistos pelo autor, mas que serviram de base para descrições; ou figuras previamente publicadas em que este autor, no todo ou em parte, fundou seu táxon;

Parátipos: depois de rotulado o holótipo, cada espécime remanescente (se houver) da série-tipo deve ser claramente rotulado como “parátipo”, de modo a identificar precisamente os componentes da série tipo original;

Lectótipos: se uma espécie nominal não tem holótipo, qualquer zoólogo pode designar um dos síntipos como “lectótipo”. A primeira designação publicada de um lectótipo fixa o estatuto do espécime, mas, caso se comprove que o espécime designado não é um síntipo, a designação é invalidada;

Paralectótipos: o zoólogo que designar um lectótipo deve rotular claramente os síntipos remanescentes com a designação “paralectótipo”;

Neótipos: um zoólogo pode designar um outro espécime para servir como “neótipo” da espécie se, por perda ou destruição, inexistir qualquer holótipo, lectótipo ou síntipo. Só deve ser designado um neótipo num trabalho de revisão e, mesmo assim, só em circunstâncias excepcionais, quando nos interesses da estabilidade da nomenclatura faz-se necessário um neótipo. As palavras “circunstâncias excepcionais” referem-se aos casos em que o neótipo é essencial para resolver um problema zoológico complexo, tal como identidade confusa ou duvidosa de espécies muito semelhantes, para uma ou mais das quais inexistir qualquer holótipo, lectótipo ou síntipo.

Tipos podem ser localizados com o auxílio das seguintes publicações: Horn & Kahle (1935, 1936, 1937), Carpenter (1945, 1953), Sachtleben (1961), Papavero (1971, 1973) e Arnett *et al.* (1993). Em Horn & Kahle (1935, 1936, 1937), com correções de Sachtleben (1961), podem ser encontrados os museus para onde foram transferidas coleções de muitos entomologistas. Esta literatura permite também checar a caligrafia dos entomólogos e confirmar se um exemplar pertence a uma determinada série-tipo. Carpenter (1945, 1953) compilou bibliografia referente a biografias de

entomologistas. Consultando-se as biografias, muitas vezes é possível localizar suas coleções. Papavero (1971, 1973) descreve roteiros de viagem de coletores pela região Neotropical entre 1750 e 1905, permitindo a elucidação de dúvidas sobre localidades de coleta que muitas vezes estão imprecisas no material antigo; fornece, também, dados biográficos em que estão mencionados o repositório do material coligido durante as viagens. Endereços de museus podem ser obtidos em Arnett *et al.* (1993); além disso, em muitos casos, estão relacionados os nomes dos curadores e quais coleções estão depositadas na instituição.

Identificação do material

Identificar ou determinar um espécime consiste em descobrir a denominação dos táxons aos quais ele pertence, ou seja, conhecer o nome científico dos táxons onde está classificado (Martins, 1994). O ideal é identificar o exemplar especificamente, ou seja, conhecer o seu nome específico. Infelizmente, nem sempre isto é possível, pois há uma série de fatores que limitam o trabalho de identificação, como grupos complexos ou muito numerosos, bibliografia confusa ou insuficiente e inexistência de material para comparações.

As identificações podem ser conseguidas através de remessa de material a especialistas, por comparação com o tipo (*ver Categorias de Tipos*), por comparação direta com exemplares já identificados, por meio de chaves analíticas ou por consulta bibliográfica.

Quando um inseto é identificado, seu nome é colocado em uma etiqueta totalmente branca ou com bordas, ficando numa posição baixa no alfinete do exemplar, contra o fundo da caixa. Nesta etiqueta, são colocados o nome científico completo do exemplar (*gênero, espécie, subespécie se houver e nome do autor*), o nome da pessoa que fez a determinação e o ano em que a mesma foi feita (Figura 8). Como no caso das etiquetas de procedência, aqui também não há consenso quanto às suas dimensões. Borror & DeLong (1969), por exemplo, recomendam 12,5x30mm, enquanto que Bland & Jaques (1978) usam 25x25mm. Quando uma série de insetos é identificada, é comum espetar a etiqueta de identificação apenas no primeiro e no último exemplar da série, ficando subentendido que os espécimes intermediários pertencem à mesma espécie. No entanto, como os insetos podem ser trocados de lugar durante o manuseio, recomenda-se etiquetar todos os exemplares da série.



Figura 8. Etiqueta de identificação (Fonte: Borror & DeLong, 1969).

Armazenamento de coleções via seca

Os insetos em alfinetes entomológicos são mantidos em caixas ou gavetas entomológicas com tampa de vidro, as quais devem ser fechadas o mais hermeticamente possível, para excluir a poeira e os insetos que se alimentam de insetos secos e preservar por mais tempo os fumigantes. Detalhes da sua construção podem ser encontrados em Maranhão (1976) e Oldroyd (1958).

As gavetas são dispostas em armários (Figura 9) de aço ou madeira ou em arquivos compactos deslizantes e devem ser intercambiáveis; as tampas, contudo, não o são e, por isso, devem ser numeradas. Cada tampa deve ser cuidadosamente ajustada para cada gaveta. Se forem trocadas, há o risco de não servirem bem, podendo permitir a entrada de pragas de museu. No fundo da gaveta, coloca-se isopor, de preferência de alta densidade, que segura com mais firmeza os espécimes alfinetados.

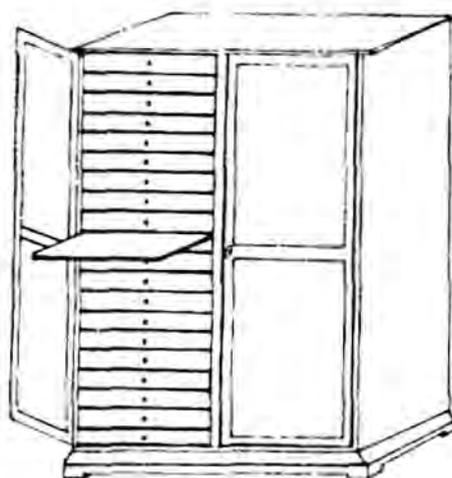


Figura 9. Armário com gavetas entomológicas (Fonte: Oldroyd, 1958).

Em grandes coleções de museus, as gavetas são geralmente subdivididas em pequenas caixas de papel cartão ou plástico, de vários tamanhos (Figura 10). O sistema de caixas facilita a rápida expansão e rearranjo da coleção sem a necessidade de manusear espécimes individuais, o que consome tempo e põe em risco a integridade dos espécimes. O uso de gavetas subdivididas por caixinhas de papel cartão ou plástico torna a adição de material novo bastante prática.

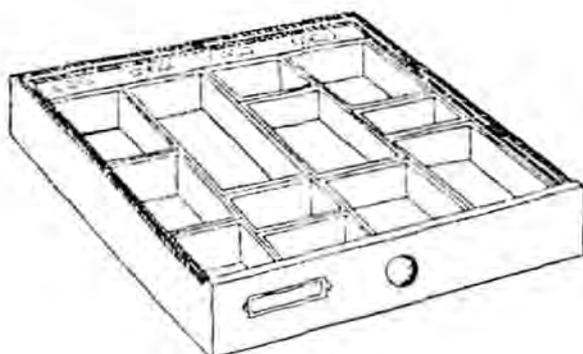


Figura 10. Gaveta entomológica com subdivisões (Fonte: Oldroyd, 1958).

Toda coleção deve ser ordenada de acordo com algum sistema. O mais comum é arranjar a coleção em ordens, famílias, gêneros e espécies. Há também outras formas, como "insetos fitófagos", "insetos aquáticos", "insetos coprófagos", etc. Gêneros e espécies são, freqüentemente, ordenados em ordem alfabética ou por ordem de catálogos.

Na gaveta coloca-se externamente uma etiqueta com o nome da ordem, em letras maiúsculas, e da família, podendo também ser incluído o nome do gênero. Dentro, geralmente usam-se

etiquetas retangulares, fixadas por alfinetes ao fundo da gaveta (rótulos de caixa). Nomes de famílias e gêneros, assim como qualquer categoria intermediária, como subfamílias e tribos, são colocados acima do espécime ao qual se referem; o nome da espécie é colocado abaixo (Figura 11 A, B). Quando um gênero ou espécie tiver sinonímias, o nome válido é colocado primeiro e as outras etiquetas com os outros nomes são colocados abaixo deles e levemente deslocadas para a direita, para indicar que não são válidos. Todos os rótulos de identificação do espécime, mesmo que a identificação tenha sido incorreta, são mantidos junto com o exemplar, preservando-se, assim, a história da coleção.

Os tipos devem ser claramente rotulados como tal e de forma a serem facilmente visualizados na coleção. Para isso, nos espécimes-tipo são postos rótulos coloridos indicando sua condição. Também é usual chamar a atenção para a caixa que contém tipo(s), acrescentado-se um sinal colorido no rótulo de caixa.

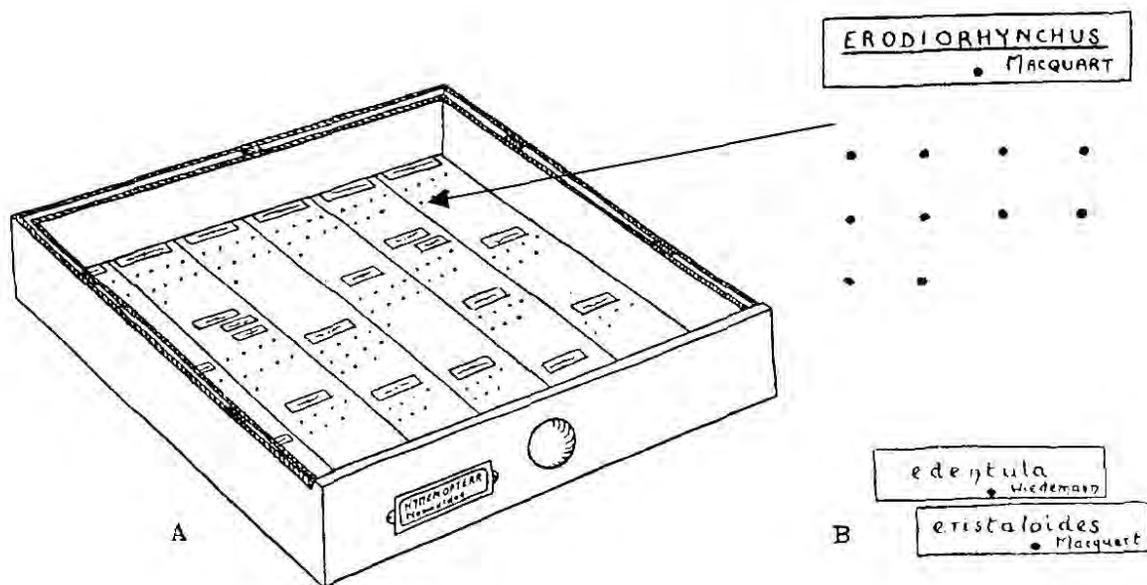


Figura 11. Disposição dos espécimes nas gavetas entomológicas. A, visão geral; B, detalhe de como as etiquetas são ordenadas (Fonte: Oldroyd, 1958).

Cuidados com as coleções via seca

Os espécimes em coleções devem ser protegidos contra luz, umidade e pragas de museu. Um dos pontos chave é o controle da umidade relativa do ar, que deve ser baixa. Geralmente, é necessário utilizar desumidificadores, que podem ter um sistema de drenagem que leva a água condensada diretamente para fora da sala, eliminando a necessidade de esvaziar seus reservatórios periodicamente.

A temperatura deve ser mantida entre 20 e 25°C, o que é conseguido através de aparelhos de ar condicionado. Janelas são desnecessárias, uma vez que a sala deve ser mantida no escuro; entretanto, pode ser conveniente a instalação de um exaustor para remoção de gases tóxicos, antes da entrada de pessoas na sala, caso haja necessidade do local ser expurgado. Este exaustor deve possuir uma tampa, que permanece fechada enquanto o aparelho estiver desligado.

As pragas de museu mais comuns pertencem às famílias Psocidae (Psocoptera), Dermestidae (Coleoptera), Formicidae (Hymenoptera) e Tineidae (Lepidoptera). Contra estas, os conservantes mais utilizados são a naftalina, geralmente comercializada em bolas, e o paraformaldeído, encontrado na forma de pastilhas. Estes agentes não podem ficar soltos pela gaveta, sob o risco de

danificar os exemplares. Se a caixa ou gaveta não tiver uma repartição interna para abrigá-los, um pequeno compartimento poderá ser construído, prendendo-se uma tira de papel cartão num dos cantos (Figura 12) ou então deixando-se um espaço entre o isopor do fundo (ou as caixinhas) e a parede lateral da gaveta. Uma outra alternativa para a naftalina é colocá-la em alfinetes, sendo então espetada do mesmo modo que os espécimes; isso é feito aquecendo-se bem a cabeça de um alfinete e inserindo-a em uma bolinha de naftalina.

Tanto a naftalina quanto o paraformaldeído precisam ser repostos periodicamente. Convém lembrar que estas substâncias são apenas repelentes. Se a coleção se encontrar infestada por alguma praga, deve ser expurgada, usando-se, por exemplo, fosfina. Coloca-se a gaveta infestada em um saco de plástico, juntamente com as pastilhas de fosfina, deixando-a lá por algum tempo. Esta substância é altamente tóxica e volátil, sendo necessário manuseá-la com extremo cuidado.

Os fungos podem aparecer em consequência da umidade do local ou do próprio corpo dos insetos. De acordo com Oldroyd (1958), podem ser removidos através de uma limpeza em solução de fenol glacial e benzeno, na proporção de 1:10. Outros autores, porém, como Steyskal et al. (1986), consideram que, uma vez que o inseto tenha sido coberto por fungo, nada pode ser feito para restaurá-lo. Por isso, o melhor que se pode fazer é prevenir o seu crescimento, secando bem os espécimes antes de colocá-los na coleção e alojando a coleção em uma sala onde a umidade relativa do ar é baixa.

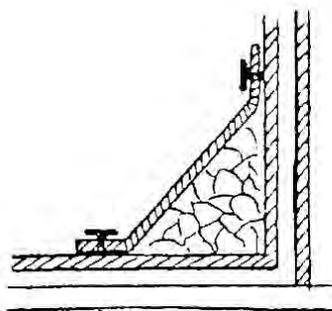


Figura 12. Compartimento para o agente conservante (Fonte: Oldroyd, 1958).

Coleções via úmida

Coleções via úmida são formadas para deposição de estágios imaturos ou para armazenamento temporário de parasitóides adultos em etanol; esta forma de armazenamento, porém, não é a mais adequada para adultos (*ver Armazenamento temporário*).

As coleções úmidas podem ser mantidas em armários de aço com gavetas do mesmo material. Os insetos podem ser organizados em lotes de frascos de vidro pequenos, que são acondicionados em frascos maiores, também de vidro. Estes recebem uma etiqueta escrita em papel vegetal, a nanquim, com os dados da coleta e identificação. Os lotes são depositados em caixas de papelão que recebem as etiquetas de caixa. Os frascos menores são tampados com chumaço de algodão e colocados com a abertura voltada para baixo. Deste modo, apenas o frasco maior necessita ter seu nível de etanol completado. A escolha do tipo de frasco é muito importante para a segurança do armazenamento. Os que possuem tampa rosqueável com batoque interno de plástico são os mais indicados. Estes devem ser periodicamente revisados, para reposição do etanol evaporado e de tampas com problemas.

Coleções em lâminas (laminário)

As lâminas são guardadas em caixas de madeira ou de plástico, cujo interior possui ranhuras onde as lâminas são encaixadas verticalmente, de modo a não se tocarem. Dependendo da posição das caixas, as lâminas podem ser armazenadas na posição vertical ou horizontal, em função do meio de montagem empregado. As lâminas também podem ser guardadas em armários especiais, chamados laminários, que possuem bandejas onde as lâminas são colocadas. Tanto nas caixas quanto nas bandejas, as lâminas são ordenadas por família. Tipos devem ser claramente indicados por etiquetas coloridas. Não se aconselha a numeração das lâminas nem a criação de um livro de registros, pois este pode se perder.

Embalagem e remessa de espécimes

Os espécimes devem ser embalados cuidadosamente, uma vez que embalagens inadequadas podem resultar em graves danos ou perda total dos mesmos. Os insetos alfinetados são

enviados em caixas de madeira ou papel cartão, com um fundo de cortiça ou outro material que prenda firmemente os alfinetes, como isopor de alta densidade.

Convém embalar os parasitóides e os espécimes menores e mais delicados de outras ordens separadamente dos espécimes maiores, pois os danos seriam grandes caso estes se desprendessem durante o transporte. Pela mesma razão, frascos ou bolas de naftalina não devem nunca ser incluídos em caixas com insetos alfinetados. É importante, ainda, no caso de espécimes grandes, prendê-los com alfinetes adicionais, para evitar que girem e estraguem os espécimes adjacentes. Para garantir que os alfinetes não se soltarão do fundo da caixa, deve-se colocar uma folha de papelão bem ajustada sobre os exemplares alfinetados, sendo o espaço entre esta folha e a tampa da caixa preenchido com algodão ou algodão de celulose.

Os frascos contendo espécimes em líquidos devem ser de material inquebrável e estar completamente cheios, pois as bolhas de ar podem danificar os espécimes. Para retirar todo o ar dos frascos com tampas de borracha, enche-se o mesmo até a boca com o líquido, colocando-se a seguir a tampa, na qual foi introduzida uma agulha hipodérmica. O excesso de líquido sai pela agulha e, quando esta é removida, a tampa se obtura, resultando em um frasco livre de bolhas de ar. Quando a tampa é de rosca e há um batoque de plástico internamente, enche-se o frasco até a boca, coloca-se um fio de náilon no frasco e introduz-se o batoque; o excesso de líquido sai pela fresta que se formou por causa do fio de náilon. A seguir, o fio é retirado e a tampa é rosqueada. Todos os frascos devem ser inspecionados quanto a vazamentos e, se necessário, selados com parafina derretida. A seguir, são envolvidos com algodão de celulose ou outro material macio e acondicionados em caixas resistentes ou latas.

Lâminas de microscópio devem ser enviadas em caixas com ranhuras no seu interior, nas quais são encaixadas, colocando-se ainda material de enchimento entre elas, para segurá-las na posição desejada. As caixas contendo exemplares alfinetados, frascos ou lâminas são então embaladas em caixas de papelão resistentes, com uma grossa camada (5 cm ou mais) de material de enchimento envolvendo-as por todos os lados, para absorver choques e vibrações que possam ocorrer durante o transporte.

Toda vez que um material é enviado pelo correio, uma carta deve ser enviada ao destinatário, em separado, notificando-o do despacho. As caixas contendo os exemplares devem ter externamente a inscrição "*INSETOS SECOS (ou CONSERVADOS) PARA ESTUDO CIENTÍFICO*" e "*FRÁGIL*". Quando a remessa é feita de um país para outro, a passagem pela alfândega é facilitada com a expressão "*SEM VALOR COMERCIAL*". Estes avisos devem ser escritos pelo menos em português e em inglês.

De acordo com as recomendações do “International Institute of Entomology” (International Institute of Entomology, 1994), os insetos devem ser mandados para o serviço de identificação da instituição e não para um taxonomista em especial, para evitar atrasos no processamento do material se o especialista estiver viajando. Esta instituição possui um formulário a ser preenchido, devendo este ser enviado juntamente com os espécimes (Anexo I). O mesmo procedimento é adotado para requisitar os serviços do USDA (Anexo II).

As remessas para instituições que não o “International Institute of Entomology” ou o USDA deverão ser acompanhadas de guias de remessa em três vias: uma para protocolo, uma para controle do pesquisador ou instituição para onde o material foi enviado e uma para o arquivo da instituição remetente. Normalmente, é estabelecido um período de 6 meses para devolução do material. O especialista e/ou instituição deve ser contactado previamente, a fim de autorizarem o envio do material e informarem a melhor forma em que este deve ser enviado.

Referências bibliográficas

- ARNETT, Jr., R.H.; SAMUELSON, G.A.; NISHIDA, G.M. **The insect and spider collections of the world**. Gainesville: Sandhill Crane Press, 1993. vi + 310p. (Fauna and Flora Handbook, 11).
- BEIRNE, B.P. A consideration of the cephalic structures and spiracles of the final instar larvae of the Ichneumonidae (Hym.). **Transactions Society of British Entomologists**.v. 7, p. 123-190. 1941.
- BERNARDI, N. Nomenclatura zoológica. In: PAPAVERO, N., org. **Fundamentos práticos de taxonomia zoológica**. 2.ed. São Paulo: Editora UNESP, 1994. p. 169-186.
- BLAND, R.; JAQUES, H.E. **How to know the insects**. 3.ed. Dubuque: Wm. C. Brown, 1978. p .3-29 (The Pictured Key Nature Series).
- BORROR, D. J. ; DELONG, D.M. **Introdução ao estudo dos insetos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1988. p. 545-570.
- BOUCEK, Z. **Australasian Chalcidoidea (Hymenoptera)**. Wallingford: CAB International, 1988. p. 9-10.
- BREThERICK, L., ed. **Hazards in the chemical laboratory**. 3.ed. London: The Royal Society of Chemistry, 1981.

- CARPENTER, M.M. Bibliography of biographies of entomologists. **The American Midland Naturalist**, v. 33, n. 1, p. 1-116, 1945.
- CARPENTER, M.M. Bibliography of biographies of entomologists (supplement). **The American Midland Naturalist**, v. 50, n. 2, p. 257-348, 1953.
- EVANS, H.E. Order Hymenoptera. In: STEHR, F.W., ed. **Immature insects**. Dubuque: Kendall/Hunt Publishing Company, 1987, p. 597-710.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B. **Manual de entomologia agrícola**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1978. 531 p.
- GAULD, I.D. Taxonomy, its limitations and its role in understanding parasitoid biology. In: WAAGE, J.; GREATHEAD, D., ed. **Insect parasitoids**. London: Academic Press, 1989. p. 1-21.
- GAULD, I.D. ; BOLTON, B. **The Hymenoptera**. Oxford: Oxford University Press, 1988. p. 48-57.
- GODFRAY, H.C.J. **Parasitoids, behavioral and evolutionary ecology**. Princeton: Princeton University Press, 1994. 473 p.
- GORDH, G.; HALL, J.C. A critical point drier used as a method of mounting insects from alcohol. **Entomological News**, v. 90, p. 57-59, 1979.
- GRISSELL, E.E.; SCHAUFF, M.E. **A handbook of the families of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera)**. Washington: The Entomological Society of Washington, 1990. 85 p.
- HORN, W.; KAHLE, I. Über entomologische Sammlungen (Ein Beitrag zur Geschichte der Entomomuseologie). **Entomologische Beihefte aus Berlin-Dahlem**, v. 2, t. i-xvi, p. 1-160, 1935.
- HORN, W.; KAHLE, I. Über entomologische Sammlungen (Ein Beitrag zur Geschichte der Entomomuseologie). **Entomologische Beihefte aus Berlin-Dahlem**, v. 3, t. xvii-xxvi, p. 161-296, 1936.
- HORN, W.; KAHLE, I. Über entomologische Sammlungen, Entomologen & Entomomuseologie (Ein Beitrag zur Geschichte der Entomomuseologie). **Entomologische Beihefte aus Berlin-Dahlem**, v. 4, t. xviii-xxxviii, p. 297-535, 1937.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON ZOOLOGICAL NOMENCLATURE. **International code of zoological nomenclature adopted by the XX General Assembly of The International Union of Biological Sciences**. London: International Trust for Zoological Nomenclature, 1985. xx + 338 p.

- INTERNATIONAL INSTITUTE OF ENTOMOLOGY. **Instructions for users of the identification service.** London: International Institute of Entomology, 1994. 19 p.
- MARANHÃO, Z.C. **Entomologia geral.** São Paulo: Nobel, 1976. p. 401-54.
- MARTINS, U.R. A coleção taxonômica. In: PAPAVERO, N., org. **Fundamentos práticos de taxonomia zoológica.** 2.ed. São Paulo: Editora UNESP, 1994. p. 19-43.
- MASNER, L.; GOULET, H. A new model of flight-interception trap for some hymenopterous insects. **Entomological News**, v. 92, n. 5, p. 199-202, 1981.
- MOERICKE, V. Über das Farbsehen der Pfirchblattlaus (*Mizodes persicae*). **Zeitschrift fuer Tiepsych.**, v. 7, n. 2, p. 265-274, 1950.
- NORRIS, K.R.; UPTON, M.S. **The collection and preservation of insects.** Brisbane: The Australian Entomological Society, 1974. 33p. (Miscellaneous Publication, n. 3).
- NOYES, J.S. Collecting and preserving chalcid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea). **Journal of Natural History**, v. 16, p. 315-34, 1982.
- OLDROYD, H. **Collecting, preserving and studying insects.** London: Hutchinson Scientific and Technical, 1958. 327 p.
- PAPAVERO, N. **Essays on the history of Neotropical dipterology.** São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 1971. v.1, p. 1-216.
- PAPAVERO, N. **Essays on the history of Neotropical dipterology.** São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 1973. v.2, p. 217-446.
- PERIOTO, N. W. Novo frasco coletor para armadilha suspensa modelo Rafael & Gorayeb (1982). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 17, 1990, Londrina, **Anais.** Londrina, SBZ, 1990. p. 95.
- PERIOTO, N. W. Perfil da fauna de Hymenoptera Parasitica, incluindo Chrysidoidea, do cerrado da Fazenda Canchim (EMBRAPA, São Carlos. SP). São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1991. 128 p. (Dissertação de Mestrado).
- RAFAEL, J.A.; GORAYEB, I.S. Uma nova armadilha suspensa e primeiros registros de mutucas de copas de árvores. **Acta amazônica**, v. 12, n. 1, p. 232-235, 1982.
- ROE, R.M.; CLIFFORD, C.W. Freeze-drying of spiders and immature insects using commercial equipment. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 69, p. 497-499, 1976.

SACHTLEBEN, H. Nachträge zu "Walther Horn & Ilze Kahle: Über Entomologische Sammlungen".
Beiträge zur Entomologie, v. 11, n. 5/6, p. 481-540, 1961.

SALES, F.M. Emulsão letal e preservativa para insetos imaturos. **Fitossanidade**, v. 4, n. 1, p. 32,
1980.

STEHR, F.W. Techniques for collecting, rearing, preserving, and studying immature insects. In:
STEHR, F.W., ed. **Immature insects**. Dubuque: Kendall/Hunt Publishing Company, 1987, p. 7-18.

STEYSKAL, G.C.; MURPHY, W.L. ; HOOVER, E.M., ed. **Insects and mites: techniques for collecting
and preservation**. Washington: U.S. Department of Agriculture, 1986. 103 p. (Miscellaneous
Publication, n. 443)

WAAGE, J.; GREATHEAD, D., ed. **Insect parasitoids**. London: Academic Press, 1989. p. xi-xii.

WAHL, D. An improved method for preparing exuviae of parasitic Hymenoptera. **Entomological News**,
v. 95, n. 2, p. 227-228; 1984.

ANEXO I

**REQUISIÇÃO PARA OS SERVIÇOS DE
IDENTIFICAÇÃO DE INSETOS PELO
“INTERNATIONAL INSTITUTE OF ENTOMOLOGY”**



INTERNATIONAL INSTITUTE OF ENTOMOLOGY

An Institute of CAB INTERNACIONAL

56 Queen's Gate, London SW7 5JR, UK
Tel: +44 (0) 71 584-0067/8 Fax: +44 (0) 71 581-1676

REQUEST FOR IDENTIFICATIONS

Please consult our *Instructions for Users of the Identification Service* booklet (available free on request) for details on the preparation and dispatch of specimens.

DETAILS OF SENDER (family name, initials, title)

NAME	DATE
------	------

ADDRESS

NAME AND ADDRESS FOR INVOICE (if different from above)

NAME

ADDRESS

REASON FOR IDENTIFICATION (please mark appropriate boxes)

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Pests of crops or other cultivated plants | <input type="checkbox"/> Pollinators of cultivated plants |
| <input type="checkbox"/> Pests of plant or animal stored products | <input type="checkbox"/> Phytophagous species attacking weeds |
| <input type="checkbox"/> Pests of livestock or domestic animals | <input type="checkbox"/> Plant quarantine interceptions |
| <input type="checkbox"/> Predators or parasitoids of pest species | <input type="checkbox"/> Other reasons (please specify in box below) |

--

LEVEL OF PRIORITY REQUESTED (please mark appropriate box)

- STANDARD** (*IDENTIFICATION AT EARLIEST DATE*) Collections assigned standard will be identified at the earliest possible time, usually within three months of receipt.
- PRIORITY** (*IDENTIFIED QUICKLY*) Adequate reasons **MUST** be given (below) before collections are assigned priority.

- TOP PRIORITY** (*IMMEDIATE IDENTIFICATION AND REPLY BY TELEPHONE, FAX OR TELEX*)
Please give your fax/telex/telephone no. (specify which):

NB. This top priority service is available at double the standard rate. However, in exceptional circumstances this level of service may be provided gratis solely at the discretion of the Director.

RETURN OF SPECIMENS (please mark appropriate box)

Specimens will only be returned if **SPECIFICALLY REQUESTED ON THIS FORM**. All other specimens will normally be held for two months after identification and may then be discarded. A charge is made on each collection where specimens are returned to cover posting and packing cost. We reserve the right to retain some or all of the specimens (see our *Instructions for Users* booklet).

- DO NOT RETURN ANY SPECIMENS**
- RETURN SPECIMENS LISTED BELOW BY SURFACE MAIL***
* Specimens will only be returned by airmail if this specifically requested.

SEND SPECIMENS TO:



DETAILS OF SPECIMENS SUBMITTED

Relevant biological data **must** be supplied with each specimen and in an accompanying letter. Unlabelled or badly damaged specimens will be rejected.

Please specify the chemicals used in preservation (UK Health & Safety requirements):

Order	Number of specimens dry/tubes/slides	Batch/tubes/specimen codes
COLEOPTERA		
HYMENOPTERA		
LEPIDOPTERA		
DIPTERA		
HEMIPTERA: HOMOPTERA		
HEMIPTERA:HETEROPTERA		
THYSANOPTERA		
ORTHOPTERA		
ARACHNIDA		
OTHERS (specify below)		

Continue overleaf if necessary

CHECK LIST FOR SENDER OF SPECIMENS:

1. Is the box into which the specimens are packed strong enough to prevent crushing?
2. Make sure the specimens are secured adequately, by cross-pinning if necessary.
3. Make sure no tubes or moth balls are in the same box as pinned specimens.
4. Is there any danger of pins projecting through the package?
5. Ensure there is adequate packing material (at least 5 cm) around the specimen box.
6. Make sure all microscope slides are dry.
7. Ensure information on preservative chemicals used has been supplied.

Collection Data continued.		
----------------------------	--	--

ANEXO II

**REQUISIÇÃO PARA OS SERVIÇOS DE
IDENTIFICAÇÃO DE INSETOS PELO
“SYSTEMATIC ENTOMOLOGY LABORATORY”**

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE
 AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE-PLANT SCIENCES INSTITUTE
 SYSTEMATIC ENTOMOLOGY LABORATORY-TAXONOMIC SERVICES UNIT

IDENTIFICATION REQUEST

NOTE

- Please type all information.
- Do not write in shaded areas.
- Give explanations where requested in "Remarks" section at bottom of form.
- Attach additional pages if (and only if) more space is needed.

TSU LOT NO.	TSU PRIORITY
DATE	Sender's Reference No.
DATE IDENTIFICATION REQUIRED (month, day, year) if less than two months, explain below.	
TOTAL NUMBER SENT Pinned: Vials: Slides: Other:	

NAME & COMPLETE MAILING ADDRESS OF SENDER (include Zip Code)

RETURN TO (if other than sender) (Include Zip Code)

SOURCE

- | | |
|---|---|
| AR <input type="checkbox"/> ARS | SU <input type="checkbox"/> State University |
| AP <input type="checkbox"/> AP | OS <input type="checkbox"/> Other State |
| AQ <input type="checkbox"/> APHIS-PPQ | PU <input type="checkbox"/> Private University |
| FS <input type="checkbox"/> FS | IN <input type="checkbox"/> Individual |
| DD <input type="checkbox"/> U.S. Military | CO <input type="checkbox"/> Commercial Organization |
| OF <input type="checkbox"/> Other Federal | FN <input type="checkbox"/> Non-U.S. |
| AS <input type="checkbox"/> State Agricultural Agency | CI <input type="checkbox"/> CICP |

REASON FOR IDENTIFICATION
(Check and complete as appropriate)

- a Biological control
- Scientific name of target pest;
 - General quarantine or biocontrol research
 - Identity of host of natural enemy
 - Recovery of released natural enemy
 - Suspected contaminant in culture
 - Quarantine reference collection
 - Voucher specimen of field release
 - Holding living material pending identification
- b Damaging crop, plants-identify host plants:
- c Suspected pest of regulatory concern-give details below
- d Stored product pest-commodity affected:
- e Livestock, wildlife, or domestic animal pest-host:
- f Danger to human health
- g Household pest-damage:
- h Possible immigrant-new to:
- i Reference collection-for:
- j Survey-explain in detail below
- k Thesis problem-describe project below M.S. Ph.D.
- l Other-explain below

LEVEL/TYPE OF IDENTIFICATION NEEDED

- Family Genus Species
- Positive or negative verification of ecological group:
- phytophagous parasitic predaceous
- saprophagous aphidophagous other

OTHER INFORMATION REQUESTED - Will be supplied as conditions allow, as determined by taxonomist. Note reasons information is needed.

SOURCE OF PROJECT SUPPORT

- | | | | | |
|--|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| <input type="checkbox"/> ARS | <input type="checkbox"/> APHIS | <input type="checkbox"/> FS | <input type="checkbox"/> CSRS | Regional project no: |
| <input type="checkbox"/> Hatch | <input type="checkbox"/> EPA | <input type="checkbox"/> DOI | <input type="checkbox"/> NIH | <input type="checkbox"/> NSF |
| <input type="checkbox"/> USAID | <input type="checkbox"/> FAO | | | |
| <input type="checkbox"/> Other (Specify) | | | | |

SPECIMEN DISPOSITION-See Instruction Sheet. If you wish specimens returned, please provide justification below. Duplicate specimens encouraged-see instruction sheet.
 Return Keep or discard

FTS2000, ASRR, INTERNET OR BITNET
 USER ID: or FAX # (including area code):

TELEPHONE REPORT REQUESTED
 If yes, give number - include area code and extension.
 Requests are handled at the discretion of SEL, TSU

DESCRIPTION OF PROJECT - Include Project Title and name of Project Leader. (Reference previous communications pertaining to this submittal)

REMARKS (Explanations, tentative identification, etc.)

FOR TSU USE DATE RECEIVED
Nº LABEL SORTED PREPARED
DATE ACCEPTED
CC's OR TEXT

III. ESPÉCIMES "VOUCHER" E SUA IMPORTÂNCIA EM LABORATÓRIO DE QUARENTENA

Marcelo Teixeira Tavares¹

Elizabeth A. B. De Nardo²

Espécimes "voucher" ou "vouchers" são exemplares designados para documentar a identidade de organismos utilizados em investigações científicas ou em programas envolvendo introduções de organismos benéficos. Estes exemplares devem ser apropriadamente etiquetados e preservados para que as informações a seu respeito possam ser resgatadas a qualquer momento. A falta de informações apropriadas para um "voucher" pode acarretar dúvidas sobre sua relação com um determinado estudo e, conseqüentemente, todo o estudo ou parte dele pode ter seus resultados perdidos por falta de confirmação da identidade dos organismos envolvidos.

Apesar da importância de se designar "vouchers" rotineiramente, existem várias situações em que estes devem ser especialmente designados. Knutson (1984) sugere as seguintes situações: quando os organismos envolvidos em um estudo não podem ser identificados no momento do estudo ou da publicação; quando há dúvidas quanto à identidade dos mesmos, e quando o material é destruído no decorrer do estudo.

Um caso especial, porém não mencionado por este autor, deve ser aqui ressaltado. Em estudos aplicados e em programas de liberação de organismos exóticos para fins de controle biológico, a designação de "vouchers" é recomendada e deve ser considerada como um procedimento operacional padrão de um laboratório de quarentena. Estes exemplares, além de comprovarem a identidade das espécies envolvidas neste tipo de programa, também permitem determinar, no futuro, quando e onde a espécie envolvida foi introduzida e liberada. No passado, devido à negligência na designação e preservação de espécimes "voucher", os resultados de pesquisas relacionadas a alguns programas de introdução e liberação de inimigos naturais não puderam ser confirmados, uma vez que a identidade das espécies envolvidas foi colocada em dúvida e "vouchers" não estavam à disposição para autenticar a identidade dos mesmos (Coulson *et al.*, 1991).

1 Biólogo, Dr., Consultor EMBRAPA/IICA-PROMOAGRO - Cx. Postal 69, 13820-000, Jaguariúna, SP.

2 Bióloga, Ph.D., Embrapa Meio Ambiente, Laboratório de Quarentena "Costa Lima", Cx. Postal 69, 13820-000, Jaguariúna, SP.

Várias são as categorias de "voucher" que podem ser designadas durante a realização de um programa de introdução de organismos exóticos para fins de controle biológico. Coulson *et al.* (*op. cit.*) lista 5 categorias de "voucher" que devem, idealmente, ser designadas neste tipo de processo, sendo que 4 das quais estão representadas na Fig. 14. A quinta categoria seria de exemplares dos hospedeiros ou presas originais, coletados no local de origem do inimigo natural. De todas estas categorias, ao menos aquelas que representam o material recebido e repassado pelo laboratório de quarentena, e o material liberado em campo devem ter "vouchers" designados. Outra categoria que, dependendo do caso, deve ter "vouchers" designados é aquela para a averiguação da integridade de criações de organismos que permanecem muitas gerações no laboratório. Os "vouchers" do material recuperado do campo após a liberação servem apenas como confirmadores do estabelecimento das espécies introduzidas.

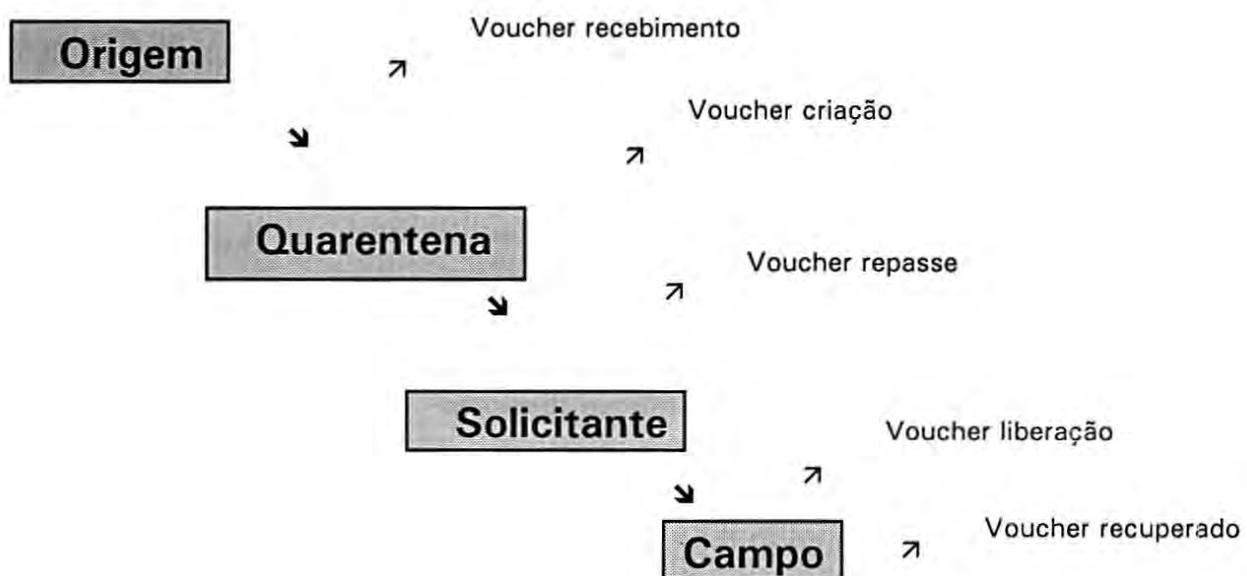


Figura 14: Fluxograma das etapas de introdução de inimigos naturais e as possíveis categorias de "vouchers". As categorias indicadas em negrito são consideradas as mais importantes.

Outra situação em que também é importante se designar "vouchers" é no caso de exportação de inimigos naturais para programas internacionais de controle biológico, sendo neste caso, o "voucher" constituído de exemplares do material exportado.

Existem princípios e procedimentos básicos necessários para se designar exemplares "voucher" e estes têm sido descritos em algumas publicações (Yoshimoto, 1978; Knutson, 1984; Coulson *et al.*, 1991). Primeiramente, são considerados exemplares "voucher" somente aqueles que receberam uma etiqueta de "voucher" no momento em que foram designados como tal. Qualquer

outro exemplar, pertencente à mesma amostragem ou não, ou com os mesmos dados de procedência, mas que não tenha recebido a etiqueta de "voucher" juntamente com os demais, não deve ser considerado com tal.

O processo de montagem de exemplares "voucher" deve ser o mesmo adotado para o grupo taxonômico em questão. As etiquetas de procedência, biologia e identificação também devem seguir os padrões já mencionados em capítulos anteriores. Já a etiqueta que indica que o exemplar é um "voucher" necessita de um padrão específico. Em primeiro lugar, é importante que esta etiqueta possua cor diferente das demais, o que facilita a localização dos "vouchers" quando depositados com os demais exemplares em uma coleção. A cor verde tem sido sugerida para a etiqueta de "voucher", porém em casos onde mais de uma categoria de "voucher" é designada, o uso de diversas cores é recomendado. Os dados a serem colocados na etiqueta de "voucher" variam de acordo com a categoria do exemplar em questão. Para "vouchers" de material recebido por laboratórios de quarentena, o nome da instituição envolvida, o número do processo e da remessa (caso mais de uma remessa seja realizada em um mesmo processo) devem ser citados. No caso de "vouchers" de material repassado por laboratórios de quarentena, devem ser citados: o número do processo, da remessa recebida e do repasse; local (e instituição, se proveniente de criação) de procedência do material original; local e instituição solicitante. Para "vouchers" de liberação no campo, a data e local de liberação, o nome e a filiação do liberador, o número do processo (mesmo que anteriores) e o organismo alvo, devem ser citados.

Todo "voucher" deve ser identificado por um sistemata ou taxonomista, ou no mínimo, por um profissional com algum conhecimento na sistemática do grupo em questão. Experiências passadas e recentes têm mostrado que a falta de pessoal especializado na identificação de determinados grupos de importância econômica pode levar a sérias conseqüências. Sarazin (1997) descreveu um caso recente, onde uma remessa de besouros, considerada como pura, foi enviada da Europa para o Canadá, com o objetivo de controle de uma erva-daninha. Quando recebida no Canadá, foi constatada algumas diferenças entre os exemplares, e estes foram enviados a especialistas que constataram a existência de 3 espécies diferentes na mesma remessa, sendo duas das quais ainda não descritas. Com isto se evitou que duas espécies, com potencial para se tornarem pragas agrícolas, fossem introduzidas naquele país. Este fato ilustra bem a necessidade de um vínculo permanente entre profissionais especializados em sistemática e taxonomia atuando em conjunto com laboratórios de quarentena de inimigo naturais.

Em um futuro próximo, as coleções "voucher" podem receber novos valores. Com o crescente interesse no melhor conhecimento da diversidade biológica, devido principalmente à

“Convenção sobre a Biodiversidade” e “Agenda 21”, e à possibilidade de se colocar valor econômico em recursos genéticos, as coleções "voucher" podem vir a servir como comprovação de direitos de propriedade de material biológico, já que constituem a testemunha de material intercambiado.

Referências Bibliográficas

- COULSON, J.R.; SOPER, S.R.; WILLIAMS, D.W. **Biological control quarantine: needs and procedures.** Beltsville: U.S. Department of Agriculture, Agriculture Research Service, 1991. 336p. (ARS-99)
- KNUTSON, L. "Voucher" material in entomology: a status report. **Bulletin of Entomological Society of America**, v. 30, n. 4, p. 8-11, 1984.
- SAZARIN, M. Taxonomy as a first line of defense in Biological control. **Pest Management News**, v. 9, n. 2, p. 9, 1997.
- YOSHIMOTO, C.M. Voucher specimens for entomology in North America. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v. 24, n. 2, p. 141-142, 1978.

IV. A COLEÇÃO "VOUCHER" DO LABORATÓRIO DE QUARENTENA "COSTA LIMA"

Marcelo Teixeira Tavares¹

Elizabeth A. B. De Nardo²

Fernando J. Tambasco²

Luís Alexandre N. de Sá²

Franco Lucchini²

Gilberto J. de Moraes³

O Laboratório de Quarentena "Costa Lima" (LQCL), situado no Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Ministério da Agricultura e Abastecimento (EMBRAPA-CNPMA/MAA), em Jaguariúna (SP), foi credenciado pela Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária do MAA, através da Portaria 106 (14-IX-91), como responsável pela introdução de organismos para controle biológico no Brasil. Também é sua competência: subsidiar a Coordenadoria de Defesa Sanitária Vegetal, através de pareceres técnicos sobre solicitações de introdução de inimigos naturais para o controle de pragas; manter equipe técnica necessária para a inspeção e quarentena de organismos para controle biológico, bem como para preservação da segurança das introduções; e manter um registro atualizado das mesmas.

Todo o processo de introdução e liberação de inimigos naturais da Quarentena é altamente dependente de um suporte taxonômico. Uma identificação precisa do material introduzido é uma operação chave nos procedimentos quarentenários, sem a qual o organismo não pode ser liberado de quarentena.

Do material introduzido, parte é amostrada como espécimes "voucher" que são montados, etiquetados e enviados a especialistas para uma determinação bastante rápida. Na maioria das vezes é preciso enviar amostras do material para especialistas em diferentes partes do Brasil e mesmo para o exterior. O restante do material introduzido continua em quarentena, sendo criado por 2 ou 3

1. Biólogo, Dr., Consultor EMBRAPA/IICA-PROMOAGRO - Cx. Postal 69, 13820-000, Jaguariúna, SP.

2. Embrapa Meio Ambiente, Laboratório de Quarentena "Costa Lima", Cx. Postal 69, 13820-000, Jaguariúna, SP.

3. Eng. Agro, PhD, Depto. de Zoologia - ESALQ-USP, 13.418-900, Piracicaba, SP.

gerações, no caso de artrópodes. Somente após uma identificação precisa, descontaminação, comprovação da especificidade hospedeira e da segurança ambiental e a saúde humana é que o organismo deve ser liberado de quarentena.

Os exemplares de "vouchers" de todos os organismos introduzidos e exportados pelo LQCL estão depositados em uma coleção mantida em uma sala com 25 m², que possui 3 desumidificadores, 2 aparelhos de ar condicionado e 11 armários com gavetas, o que garante as condições ideais para a preservação de exemplares de artrópodes a seco. A coleção "voucher" propriamente dita está armazenada em dois armários de 46 gavetas cada, as quais têm capacidade para abrigar 20 caixas porta-exemplares de 10 cm x 10 cm. *A priori*, um destes armários está destinado para abrigar os "vouchers" referentes aos processos de importação e outro para "vouchers" de exportação.

Dos exemplares "voucher" de insetos, ao menos metade das amostras são retidas na coleção "voucher" do LQCL; o restante da amostra é distribuído para o Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZSP – São Paulo, SP) e para a Coleção Entomológica do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná (DZPR, Curitiba, PR). Desde que haja interesse, parte destes exemplares "voucher" (máximo 10% do total) pode ser retida pelos pesquisadores que o identificaram, sendo então incorporada às coleções das instituições às quais eles pertencem.

No caso dos exemplares "voucher" de ácaros, que são montados em lâmina, parte está sendo mantida no Museu do LQCL em caixas porta-lâminas e parte será depositada na Coleção Zoológica "Luiz de Queiroz" (CZLQ), da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo (Piracicaba, SP).

Com relação aos microorganismos, seus "vouchers" são mantidos liofilizados ou em baixa temperatura, na Coleção de Culturas Tropical (CCT), da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello" (Campinas, SP), que possui a infra-estrutura necessária para abrigar este tipo de coleção.

No período de 1991 a 1996, o LQCL realizou 32 importações de inimigos naturais, entre artrópodes predadores e parasitóides, microrganismos e nematóides (TAMBASCO *et al.*, no prelo). Os "vouchers" de inimigos naturais designados nos processos de importação, realizados neste período, assim como as coleções depositárias, foram registrados no Quadro 1.

Todo o material "voucher" da Coleção do LQCL encontra-se disponível ao público interessado. Informações sobre as atividades e documentos do LQCL estão disponíveis no Sistema de Informação sobre Controle Biológico, que pode ser acessado via Internet, no endereço "<http://www.bdt.org.br/bdt/biocontrol>".

Referência Bibliográfica

TAMBASCO, F.J.; MORAES, G. J. de; SÁ, L. A. N. de; LUCCHINI, F.; NARDO, E. A. B. de, BERTI FILHO, E.; CIOCIOLA, A. I.; FONTES, E. M. G.; PARRA, J. R. P. **Intercâmbio Internacional e Quarentena de Agentes de Controle Biológico e Outros Organismos: 1991-1996**. Jaguariúna EMBRAPA-CNPMA, 1997. 85p.

Quadro 1. Relação de inimigos naturais exóticos recebidos pelo Laboratório de Quarentena Costa Lima e espécimes "voucher" depositados no período de 1991-97.

Organismos introduzidos	Número do Processo de Introdução	Quantidade de Espécimes "Voucher" (Coleção Depositária) ¹	Origem	Solicitante	Organismo alvo
<i>Xanthopimpla stemmator</i> (Thunberg) (Hymenoptera, Ichneumonidae)	02/91	20 (MQCL) 10 (MZSP) 10 (DZPR)	Texas A&M University, College Station, Texas, Estados Unidos da América	Cooperativa dos Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo Ltda. (COPERSUCAR), Piracicaba-SP	Broca da cana-de-açúcar, <i>Diatraea saccharalis</i> (Fab.) (Lepidoptera, Pyralidae)
* <i>Apanteles gelechiidivorus</i> Marsh (Hymenoptera, Braconidae)	01/92	20* (MQCL) 10* (MZSP) 10* (DZPR)	Instituto Colombiano de Pesquisas Agropecuárias (ICA), Palmira, Valle, Colômbia	Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP), Piracicaba-SP	Traça-do-tomateiro, <i>Tuta absoluta</i> (Meirick) (Lepidoptera, Gelechiidae)
<i>Phytoseiulus persimilis</i> Athias-Henriot (Acari, Phytoseiidae)	02/92	60/3 lâminas (MQCL) 44/2 lâminas (CZLQ)	Amsterdan, Holanda	Centro Nacional de Pesquisas de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (CNPMA), EMBRAPA, Jaguariúna-SP	Ácaro-rajado, <i>Tetranychus urticae</i> Koch (Acari, Tetranychidae)
<i>Typhlodromus pyri</i> (Scheuten) (Acari, Phytoseiidae)	01/93	60/3 lâminas (MQCL) 40/2 lâminas (CZLQ)	Nyon, Suíça	Agropastoril Rincão das Flores Ltda., Vacaria-RS	Ácaro vermelho da macieira, <i>Panonychus ulmi</i> (Koch) (Acari, Tetranychidae)
<i>Diachasmimorpha longicaudata</i> (Ashmead) (Hymenoptera, Braconidae)	03/93	20 (MQCL) 10 (MZSP) 10 (DZPR)	Division of Plant Industry, Gainesville, Florida, Estados Unidos da América	Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPMF), EMBRAPA, Cruz das Almas-BA	Mosca-das-frutas, <i>Anastrepha spp</i> (Diptera, Tephritidae)

continua

Continuação

Organismos introduzidos	Número do Processo de Introdução	Quantidade de Espécimes "Voucher" (Coleção Depositária) ¹	Origem	Solicitante	Organismo alvo
<i>Typhlodromalus tenuiscutus</i> (McMurtry & Moraes) (Acari, Phytoseiidae)	05/93	13/2 lâminas*; 7/2 lâm.**; 7/2 lâm.*** (MQCL) 12/2*; 4/1**; 5/1**** (CZLQ)	Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colômbia	Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), EMBRAPA, Cruz das Almas-BA	Ácaro verde da mandioca, <i>Mononychellus tanajoa</i> (Bondar) (Acari, Tetranychidae)
<i>Epidinocarsis diversicornis</i> Howard (Hymenoptera, Encyrtidae)	06/93a	20 (MQCL) 10 (MZSP) 10 (DZPR)	Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colômbia	Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), EMBRAPA, Cruz das Almas-BA	Cochonilha-da-mandioca, <i>Phenacoccus herreni</i> Cox & Williams (Hemiptera, Pseudococcidae)
<i>Acerophagus coccois</i> Smith (Hymenoptera, Encyrtidae)	06/93b	20*, 20** (MQCL) 10*, 10** (MZSP) 10*, 10** (DZPR)	Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colômbia	Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), EMBRAPA, Cruz das Almas-BA	Cochonilha-da-mandioca, <i>Phenacoccus herreni</i> Cox & Williams (Hemiptera, Pseudococcidae)
<i>Aenasius vexans</i> Kerrich (Hymenoptera, Encyrtidae)	06/93d	10*, 20** (MQCL) 5*, 10** (MZSP) 5*, 10** (DZPR)	Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colômbia	Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), EMBRAPA, Cruz das Almas-BA	Cochonilha-da-mandioca, <i>Phenacoccus herreni</i> Cox & Williams (Hemiptera, Pseudococcidae)
<i>Cephalonomia stephanoderis</i> (Beltrem) (Hymenoptera, Bethyridae)	08/93	20 (MQCL) 10 (MZSP) 10 (DZPR)	Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFÉ), Chinchiná, Caldas, Colômbia	Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária (EMCAPA), Linhares-ES	Broca-do-café, <i>Hypothenemus hampei</i> (Ferrari) (Coleoptera, Scolytidae)

continua

Continuação

Organismos introduzidos	Número do Processo de Introdução	Quantidade de Espécimes "Voucher" (Coleção Depositária) ¹	Origem	Solicitante	Organismo alvo
<i>Trichogramma atopovirilia</i> Oatman & Platner (Hymenoptera, Trichogrammatidae)	01/94	20 (MQCL) 10 (MZSP) 10 (DZPR)	Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira, Valle, Colômbia	Centro de Pesquisas Agropecuária do Trópico Semi-Árido (CPATSA), EMBRAPA, Petrolina-PE	Lagarta do cartucho do milho, <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) (Lepidoptera, Noctuidae)
<i>Pediobius furvus</i> (Gahan) (Hymenoptera, Eulophidae)	03/94	20*, 20**, 20*** (MQCL) 10*, 10**, 10*** (MZSP) 10*, 10**, 10*** (DZPR)	International Center for Insects Physiology and Ecology, Nairobi, Kenya	Cooperativa dos Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo Ltda. (COPERSUCAR), Piracicaba-SP	Broca da cana-de-açúcar, <i>Diatraea saccharalis</i> (Fab.) (Lepidoptera, Pyralidae)
<i>Amblyseius californicus</i> (McGregor) (Acari, Phytoseiidae)	11/94a	40/4 lâminas*; 15/3 lâm.** (MQCL) 40/4 lâm.*; 15/3 Lâm.** (CZLQ)	Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colômbia	Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), EMBRAPA, Cruz das Almas-BA	Ácaro verde da mandioca, <i>Mononychellus tanajoa</i> (Bondar) (Acari, Tetranychidae)
<i>Typhlodromalus tenuiscutus</i> (McMurtry & Moraes) (Acari, Phytoseiidae)	11/94b	43/4 lâminas*; 20/2 lâm.** (MQCL) 36/3 lâm.*; 10/1 lâm.** (CZLQ)	Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colômbia	Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), EMBRAPA, Cruz das Almas-BA	Ácaro verde da mandioca, <i>Mononychellus tanajoa</i> (Bondar) (Acari, Tetranychidae)

continua

Continuação

Organismos introduzidos	Número do Processo de Introdução	Quantidade de Espécimes "Voucher" (Coleção Depositária) ¹	Origem	Solicitante	Organismo alvo
<i>Acarophenax lacunatus</i> (Cross & Krantz) Prostigmata, Acarophenacidae	01/95	7/2 lâminas (MQCL)	Universidade Politécnica de Valência, Valência, Espanha.	Universidade Federal de Viçosa - Departamento de Engenharia Agrícola, Viçosa-MG	Besourinho-do-trigo, <i>Rhizopertha dominica</i> Fab. (Coleoptera, Bostrichidae)
<i>Podisus maculiventris</i> (Say) (Hemiptera, Pentatomidae)	07/95	16 (MQCL) 8 (MZSP) 8 (DZPR)	Universidade de West Lafayette, Estados Unidos da América	Pardue, Departamento de Entomologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), Piracicaba-SP	Traça-do-tomateiro, <i>Tuta absoluta</i> (Meirick) (Lepidoptera, Gelechiidae)
<i>Megarhyssa nortoni</i> (Cresson) (Hymenoptera, Ichneumonidae)	06/96	5*, 5**, 5*** (MQCL) 1*, 2*** (MZSP) 1*, 2*** (DZPR)	Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), Division of Entomology, Canberra, Austrália	Centro Nacional de Pesquisas de Florestas (CNPQ), EMBRAPA, Colombo-PR	Vespa-da-madeira, <i>Sirex noctilio</i> Fab. (Hymenoptera, Siricidae)

¹ **MQCL:** Museu do Laboratório de Quarentena Costa Lima, CNPMA-EMBRAPA, Jaguariúna, SP; **MZSP:** Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP; **DZPR:** Coleção do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR; **CZLQ:** Coleção Zoológica do Departamento de Zoologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-USP, Piracicaba, SP, *: 1ª remessa; **: 2ª remessa; ***: 3ª remessa.

² **MQCL:** Museu do Laboratório de Quarentena Costa Lima, CNPMA-EMBRAPA, Jaguariúna, SP; **MZSP:** Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP; **DZPR:** Coleção do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR; **CZLQ:** Coleção Zoológica do Departamento de Zoologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-USP, Piracicaba, SP, *: 1ª remessa; **: 2ª remessa; ***: 3ª remessa.

Embrapa

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*



Ministério da Agricultura e do Abastecimento