

# Metodologia de Criação de Insetos para Avaliação de Agentes Entomopatogênicos

## Introdução

Para a realização de estudos nos vários campos da entomologia, faz-se necessária a criação de insetos sob condições controladas. Informações básicas da biologia e comportamento de insetos têm servido como guia para o desenvolvimento de estratégias de controle de insetos pragas.

O desenvolvimento de estudos de patogenicidade com organismos entomopatogênicos é facilitado através de insetos criados em laboratório, uma vez que independem da planta hospedeira, e há um suprimento contínuo de insetos padronizados, criados em condições físicas, químicas e biológicas conhecidas.

Os insetos podem ser criados em dietas naturais ou artificiais. Entretanto, além das vantagens de independer da planta hospedeira, os meios artificiais possibilitam certos tratamentos (esterilização e antibióticos) da dieta, que evitam contaminações por microrganismos saprófitas e permitem que doses conhecidas do patógeno sejam oferecidas ao inseto.

Este trabalho tem por objetivo fornecer noções básicas da criação de seis insetos (*Anticarsia gemmatilis*, *Spodoptera frugiperda* e *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* e *Antonomus grandis*) utilizados na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN, principalmente, em bioensaios com agentes entomopatogênicos (Vírus, Bactérias e Fungos).

Os progressos em pesquisas entomológicas e o sucesso em programas de manejo de pragas, que utilizem o controle biológico, dependem da nossa habilidade em criar insetos e estabelecer colônias em laboratório. O sucesso definitivo depende da qualidade dos insetos criados em laboratório.

Singh & Moore, 1985, Anderson & Leppla, 1992 bem como Parra, 1992 são referências importantes quando se trata de criação de insetos.

## Obtenção de insetos para estabelecimento ou revigoramento da colônia

O processo de estabelecimento das colônias de lepidópteros e coleópteros e pentatomídeos pode ser feito obtendo-se posturas, larvas, pupas ou até mesmo adultos do campo, em suas referidas plantas hospedeiras (Milho e Soja) ou de laboratórios desde que sejam insetos de boa qualidade.

Os insetos provenientes do campo devem obrigatoriamente passar por um período de Quarentena afim de se evitar a introdução de contaminantes de dietas, parasitóides e patógenos na colônia.

Quando a população "Selvagem" é introduzida no laboratório, ocorre uma perda da variabilidade genética devido à "deriva genética", seleção e "inbreeding" (cruzamento entre irmãos), nas primeiras

Foto: F.Schmidt



11  
Circular  
Técnica

Brasília, DF  
Dezembro, 2001

### Autores

Francisco  
Guilherme V. Schmidt  
Engenheiro Agrônomo,  
MSc. Embrapa  
Recursos Genéticos e  
Biotecnologia. E-mail:  
fschmidt@cenargen.embrapa.br

Rose Gomes Monnerat  
Bióloga, Phd. Embrapa  
Recursos Genéticos e  
Biotecnologia. E-mail:  
rose@cenargen.embrapa.br

Miguel Borges  
Biólogo, Phd. Embrapa  
Recursos Genéticos e  
Biotecnologia.

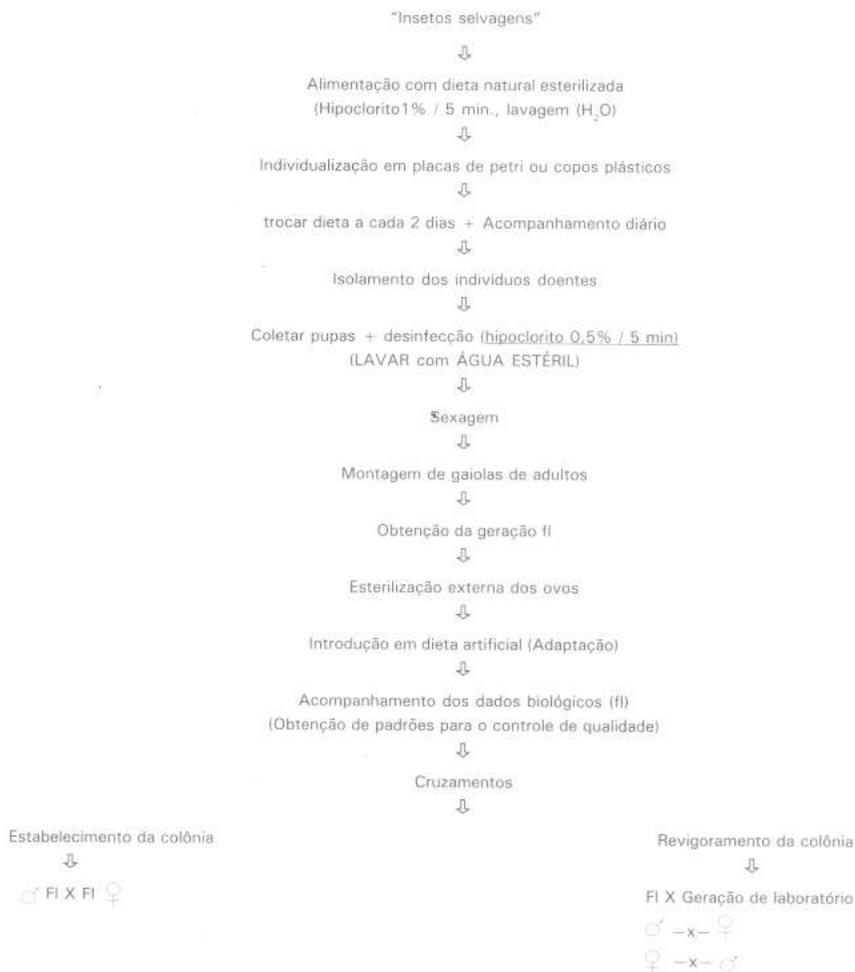
Rômulo da Silva Car-  
valho  
Engenheiro Agrônomo,  
MSc. Embrapa Man-  
dioca e Fruticultura.

gerações, somente por volta da quinta à sétima geração ocorre uma recuperação desta variabilidade, devido a mutações e recombinações (Parra, 1986).

Para o estabelecimento da colônia do culicídeo *C. quinquefasciatus* são coletadas larvas no campo, em local como Lagoas de oxidação, poças d'água de chuva, águas pluviais encontradas em garagens de edifícios, de preferência onde não tenha sido feito nenhum tipo de controle químico ou biológico recente. Essas larvas são deixadas em local isolado e à medida em que empupam são colocadas em gaiolas. A quantidade aproximada é de 700 pupas por gaiola.

Após a estabilização, a cada 6 gerações, são feitas novas introduções para revigoramento da colônia. Para isso, pupas da colônia e pupas obtidas de material oriundo do campo ou de outra colônia são colocadas na mesma gaiola para que haja cruzamento entre os adultos emergidos. Os mesmos procedimentos em laboratório são feitos quando da introdução ou estabelecimento de colônia de outro culicídeo, *Aedes aegypti*, exceto em relação à origem. Este inseto deve proceder de outro laboratório, pois doenças transmitidas por ele ao homem, passam de uma geração de mosquito a outra, através dos ovários das fêmeas portadoras (Consoli & Oliveira, 1998).

Esquema geral para estabelecimento ou revigoramento de colônia de insetos



## Técnicas para criação de *Anticarsia gemmatalis* (Hubner, lepidoptera: Noctuidae) Lagarta da soja

### Importância e características

A lagarta da soja é um inseto normalmente encontrado nas lavouras de soja, atacando a área foliar da cultura

A época de ataque mais acentuado desta lagarta está diretamente ligado à latitude onde se encontra localizada a lavoura, tendo sido observado que os ataques mais precoces ocorrem nas latitudes mais baixas, enquanto, no sul do país os ataques são mais tardios. Inicialmente, há uma migração das mariposas para a

Lavoura. As mariposas apresentam policromia acentuada, podendo sua coloração geral variar entre cinza, marrom, bege ou azul, tendo sempre uma linha transversal unindo as pontas do primeiro par de asas (Fig.1).

Todo o processo reprodutivo ocorre durante o período noturno, inclusive a oviposição que é efetuada sobre diversas partes da planta. Após eclosão, as lagartas distribuem-se sobre a planta, sendo que, nos primeiros estágios, a sua capacidade de consumo é baixa, acentuando-se no final do período larval.

A lagarta apresenta, em geral, cor verde, com estrias brancas sobre o dorso, caracterizando-se pela presença de quatro pares de patas abdominais.



Fig. 1. Adulto de *A. gemmatalis* (Lagarta da soja).

Em condições de alta população, a lagarta da soja pode assumir coloração, escura (Fig.2), sem que isso altere fundamentalmente suas características de consumo.

No final do período larval, a lagarta da soja transforma-se em crisálida, sendo esta fase passada no solo (Gazzoni et al.,1981).

### Facilidades e equipamentos

A simulação das condições ideais do meio ambiente é importante para que o comportamento dos insetos e a manutenção das características biológicas não sejam modificadas drasticamente em laboratório.

Foto: F.Schmidt



Fig. 2. Lagarta da soja.

### Equipamentos necessários:

- Umidificador
- Freezer
- Geladeira
- Estufa
- Condicionador de ar
- Balança
- Timer
- Termohigrográfo
- Microscópio estereoscópio
- Autoclave ou fogão
- Destilador de água
- Capela c/ fluxo laminar ou estrutura semelhante(caixa ou sala) com lâmpada U.V, germicida 30W
- Armadilha luminosa
- Líquidificador Industrial, batedeira ou mixer
- Caixas plásticas com tampa para acondicionar dieta
- Espátula
- Pincel nº 24
- Piceta
- Tesoura e guilhotina

### Sala de criação de lagartas

É conveniente a separação da sala de criação de lagartas, da sala de criação de adultos uma vez que nas escamas das asas dos lepidópteros se alojam grande número de microrganismos que podem contaminar a dieta artificial oferecida às lagartas. Outro motivo é a alta umidade exigida pelos adultos que não convém às lagartas, pois favorece uma maior ocorrência de patógenos e outros contaminantes de dieta, sendo recomendável para a sala de criação de lagartas no máximo 70% de umidade.

O fotoperíodo desta sala, 14 h, é controlado através de timer, e a umidade pode ser controlada com o uso de umidificadores e/ou desumidificadores conforme a situação exigir.

O uso do condicionador de ar ajuda a manter a temperatura mais constante, facilitando assim o manejo da colônia, permitindo a previsão de utilização dos insetos. O uso de um termostato acoplado ao condicionador de ar, principalmente em locais onde a variação de temperatura tem uma grande amplitude, permite um controle mais eficiente da temperatura. Em locais muito frio deve-se utilizar Condicionadores de Ar quente/frio.

### Sala de adultos

Os adultos de *A. gemmatilis* necessitam de umidade alta para acasalamento e oviposição. Esta sala deve ter umidade em torno de 80% e fotoperíodo deve ser de 14 h. É necessário a utilização de uma lâmpada de 30w e 220 volts ligada em 110 volts para simular a situação de luminosidade em que os adultos de *A. gemmatilis* acasalam (Fig.3).

- Equipamentos: - Ar condicionado  
 - Termohidrógrafo  
 - Umidificador  
 - Timer  
 - Lâmpada de 30W (simulação da lua)

Obs.: - Deve-se limpar sistematicamente as salas a cada dois dias com desinfetante inodoro ou de aroma fraco.

- Usar máscara, jaleco e luvas para evitar reações alérgicas, que podem ocorrer devido ao contato direto com

escamas de insetos e substâncias químicas das dietas e material de limpeza (Parra, 1992).

## Manutenção da colônia (Cronograma 1)

### Coleta e esterilização externa dos ovos

Os ovos colocados no papel das gaiolas de adultos, são retirados diariamente, pela imersão do papel em água destilada, quando passa-se um pincel macio ou os dedos suavemente, para auxiliar a liberação dos ovos (Fig.4). Estes são coados em peneira de malha fina e esterilizados, imergindo-os em solução de formaldeído 5% durante cinco minutos, água destilada por dois minutos e por último em solução de sulfato de cobre 1% durante dois minutos. Com o auxílio de um pincel fino, os ovos de *A. gemmatilis* são distribuídos uniformemente em fitas de papel estéril (3 x 6 cm) e posteriormente colocados na face interna do copo plástico transparente de 250 ml, com 2 cubos (2x2x2cm) de dieta, e cuja tampa é perfurada ( $\phi = 1\text{cm}$ ) e vedada com algodão para ventilação (Fig.5).

Obs: Deve-se evitar o contato do papel, contendo os ovos, com a dieta para diminuir os riscos de contaminação.

### Manejo de lagartas

Após aproximadamente 3 dias ocorre a eclosão das lagartas que se alimentarão da dieta e permanecerão neste recipiente até o sétimo dia, quando deverão atingir o estágio L3-L4 (cerca de 1.5 cm de comprimento) (Fig.6). Nesta fase as lagartas são repicadas, quatro para cada copo de 50 ml contendo um cubo (2x2x2cm), 9,5g aproximadamente, de dieta de onde permanecerão até a fase de pré-pupa.

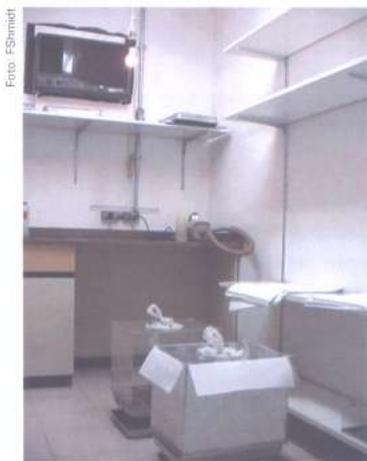


Fig. 3. Sala de criação de adultos de lepidópteros.



Fig. 4. Coleta de ovos de *A. gemmatilis* utilizando-se pincel.

Foto: F.Schmidt



Fig. 5. Copo plástico para incubação dos ovos de *A. gemmatilis*.

Foto: F.Schmidt



Fig. 6. Copo contendo larvas L3-L4 para repique em copos individuais.

Os copos contendo lagartas devem permanecer na sala de desenvolvimento larval. A utilização de copos descartáveis economizam tempo e mão-de-obra do laboratório diminuindo também os riscos de contaminação. Os copos são fechados com tampas de acrílico transparente (Fig.7).

Foto: F.Schmidt

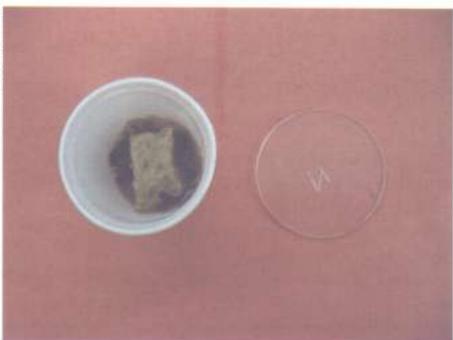


Fig. 7. Copo com tampa de acrílico para individualização das lagartas.

que podem ser reutilizadas se esterilizadas em hipoclorito e/ou U.V.

### Manejo das pupas

De 7 a 10 dias após repique as lagartas entram na penúltima fase de metamorfose, ou seja, transformam-se em pré-pupas (Fig.8). Nesta fase apresentam algumas características marcantes:

- Coloração rosada,
- Umedecidas e enrugadas,
- Procuram se esconder sob a dieta ou sob as fezes.

As lagartas com estas características devem ser acondicionadas em caixas tipo gerbox ou similar, contendo vermiculita devidamente autoclavada\*, colocando-se aproximadamente 60 pré-pupas por gerbox (Fig.9).

Foto: F.Schmidt



Fig. 8. Pré-pupa de *A. gemmatilis*.

Foto: F.Schmidt



Fig. 9. Gerbox com vermiculita e pré-pupas.

As pupas obtidas são sexadas sob lupa, observando-se a região ventral. Nas proximidades da região posterior percebe-se o dimorfismo sexual (Fig.10). As pupas passam por um processo de desinfecção em formaldeído 5% durante cinco minutos, água destilada por dois minutos e solução de sulfato de cobre 1% durante dois minutos, quando, então, são transferidas para a gaiolas de adultos afim de que ocorra a emergência (Fig.11).

Reiniciando, desta maneira, todo o procedimento de criação.

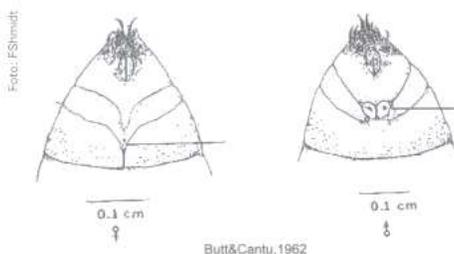


Fig. 10. Dimorfismo sexual em *A. gemmatilis* e *Spodoptera frugiperda*.



Fig. 11. Gaiola para adultos de *A. gemmatilis*.

Em colônias de grande porte a rotina de sexagem para esta espécie não é muito importante que seja feita a cada repique, mas deve ser feita periodicamente por amostragem, não necessitando sexar toda a colônia.

\* A vermiculita deve ser autoclavada úmida, sendo seca em seguida em estufa ou fluxo laminar ou similar.

## Dieta ou alimentação

### Dieta artificial para lagartas (rendimento aproximado: 5 litros)

Ingredientes	Quantidade
Feijão carioca	312,5 g
Lev. cerveja*	156,0 g
Germe de trigo <sup>o</sup>	250,0
Ac. ascórbico <sup>o</sup>	15,0 g
Ac. sórbico <sup>o</sup>	7,5 g
Nipagin <sup>o</sup>	12,5 g
Agar*	100,0 g

Continuação da Tabela.

Água*	5000,0 ml
Formol <sup>o</sup> 40%	15,0 ml
Prot. soja*	250,0 g
Caseína*	125 g
sol. vitamínica <sup>o</sup>	25 g

**Preparação:** colocar os componentes marcados com asterisco (\*), em um recipiente autoclavável (saco de polipropileno). Em seguida, autoclavar estes componentes por 20 minutos a 120 °C sob pressão de 1 atmosfera. Retirar o material autoclavado, verter em uma panela e homogeneizar com uma batadeira elétrica. Quando a temperatura destes componentes estiver a 60°C, adicionar primeiramente os anticontaminantes e conservantes (<sup>o</sup>) misturando-os bem. Por último adicionar a solução vitamínica (<sup>o</sup>) e misturar bem, antes de acondicionar a dieta em bandejas ou caixas plásticas esterilizadas previamente em U.V.

O Nipagin para atuar de maneira adequada deve ser dissolvido em acetona ou álcool, tomando-se o cuidado de não utilizar estes solventes em excesso, pois podem alterar a aceitação da dieta pelo inseto ou causar mortalidade do mesmo.

A autoclavagem do material pode ser feita em panela de pressão. É possível utilizar apenas uma panela comum para fazer a dieta. Neste caso aconselha-se a adicionar algum tipo de antibiótico, (tetraciclina 0,058g/Kg de dieta) por exemplo, no momento em que a dieta é homogeneizada.

Para insetos introduzidos do campo, quando forem larvas, o alimento fornecido deve ser o mesmo utilizado pelo inseto no campo, tomando-se o cuidado de emergir o alimento por 5 minutos em hipoclorito de sódio 5% e em seguida por 2 minutos em água estéril, antes de fornecer-los aos insetos.

Caso surja contaminação por bactérias na dieta (a dieta fica com aspecto molhado e com mal cheiro), deve-se verificar se estão corretos o tempo e a temperatura de esterilização da dieta. Caso se esteja utilizando antibiótico deve-se recolher amostra da bactéria e fazer um antibiograma para se escolher então um antibiótico mais eficaz.

Os anti-contaminantes prescritos e procedimentos na confecção da dieta normalmente evitam a contaminação por fungos em situações normais. Entretanto, podem surgir problemas com quando se utiliza agar de má qualidade ou de concentração mais baixa. Neste caso aconselha-se a reduzir um pouco a quantidade de água da dieta.

Continua...

### Solução vitamínica para *A.gemmatalis*

Componentes:	Ac. ascórbico : 12 g
	Pantotenato de cálcio : 0,30 g
	Niacina : 0,5 g
	Riboflavina : 0,08 g
	Tiamina HCL : 0,04 g
	Piridoxina HCL : 0,04 g
	Ac. fólico : 0,08 g
	H <sub>2</sub> O (destilada e esterilizada):1000ml

### Manejo e gaiolas de adultos

Utiliza-se gaiolas de acrílico ou monocril 0,5cm de espessura, medindo 43 cm de frente e fundo, 32cm de laterais e 32cm de altura, com vários orifícios para ventilação. Entre a tampa e as paredes laterais da gaiola existe um espaço para colocação de papel "sulfite" off-set, onde as mariposas fazem ovoposição (Fig.12).

Foto: FShmidt



Fig. 12. Adultos de *A. gemmatalis* fazendo postura.

O papel é colocado rente as paredes laterais da gaiola, de maneira a impedir que as mariposas se coloquem entre estas superfícies, evitando-se assim a perda dos ovos e o stress dos insetos. Costuma-se pingar algumas gotas de água nas laterais da gaiola para melhor aderência do papel. Para coleta de posturas basta retirar os papéis e recolocar outros novos. São colocados aproximadamente 90 casais por gaiola.

Os adultos são alimentados em "bebedouros" (Fig.13) com a seguinte dieta:

- Mel = 10g
- Acido sórbico = 1g
- Sacarose = 60g
- Cerveja = 10 ml
- H<sub>2</sub>O destilada (estéril) = 1000 ml

Oba: A cerveja só deve ser adicionada à dieta no momento de sua utilização.

Foto: FShmidt



Fig. 13. Bebedouro fornecedor de dieta líquida para mariposas.

### Ciclo de vida

Tabela 1. Dados do ciclo de vida de *A.gemmatalis* (Leppä et al,1977).

Estágio	Número de dias		
	min	médio	max.
Ovo	2	3	4
Larva (macho e fêmea)	14	15	19
Pupa			
(macho)	6	7	9
(fêmea)	5	6	8
Emergência do adulto			
(macho)	22	26	32
(fêmea)	21	25	31
<b>DESENVOLVIMENTO TOTAL</b>	<b>24</b>	<b>28</b>	<b>34</b>

[\*] Dados do ciclo de vida [\*] Dados do ciclo de vida e sobrevivência foram obtidos para desenvolvimento de ovos, adultos e pupas a 28° C e 80% U.R., e para larvas 27° C e 50% U.R.

**Dados de sobrevivência (%):**

- Viabilidade dos ovos: 80.
- Viabilidade Larvas: > 75.
- Viabilidade Pupas e adultos: > 95.

**Outros dados:**

- Período de pré-oviposição: 3-4 dias.
- Pico de n° de ovos após a emergência em adultos: 4-5 dias.
- Média de fecundidade: 400 ovos/fêmea.
- Número de instares: 5.
- Média de peso de pupas: 275 mg.

### Técnica para criação de *Spodoptera frugiperda* (Smith, Lepidoptera : Noctuidae) - Lagarta do cartucho do milho.

**Importância e características**

A Lagarta do cartucho é considerada uma das principais pragas do milho nas Américas, podendo ocorrer durante todo o estágio de crescimento da cultura, assumindo grande importância no México, América Central e América do sul, podendo gerar perda de até 34% da produção (Cruz, 1995).

O inseto adulto é uma mariposa medindo cerca de 35 mm de envergadura e apresentando uma coloração pardo-escura nas asas anteriores, e branco-acinzentada nas asas posteriores (Fig.14). As posturas são feitas em massa, possuindo, em média, 150 ovos. O período de incubação dos ovos é de aproximadamente 3 dias (Cruz et al., 1985).



Fig. 14. Adulto de *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho).

As lagartas recém-eclodidas alimentam-se a própria casca do ovo. Após esta primeira alimentação, permanecem em repouso por um período variável de 2 a 10 horas. Quando encontram hospedeiro adequado, elas começam a alimentar-se dos tecidos verdes, geralmente começando

pelas áreas mais suculentas, deixando apenas a epiderme membranosa, provocando o sintoma conhecido como "folhas raspadas". A medida em que as lagartas crescem, começam a fazer orifícios nas folhas, podendo causar severos danos às plantas (Fig.15). A lagarta completamente desenvolvida mede cerca de 40 mm, e com coloração variável de pardo-escura, verde até quase preta e com um "Y" invertido na parte frontal da cabeça (Fig.16).

Foto: F.Schmidt



Fig. 15. Planta de Milho atacada severamente por *S. frugiperda*.

Foto: F.Schmidt



Fig. 16. Lagarta do cartucho bem desenvolvida.

**Facilidades e equipamentos**

São as mesmos exigidos para *A.gemmatilis*, já descritos anteriormente, exceto a lâmpada de 30w que não é necessária para a criação desta mariposa, que entretanto, pode ser mantida na mesma sala de adultos de *A. gemmatilis* sem problemas.

## Manutenção da colônia (Cronograma 2)

### Coleta e esterilização externa dos ovos

As posturas são feitas em massas de ovos, no papel que recobre a parede e a tampa da gaiola (Fig.17). Faz-se a coleta de ovos diariamente ou a cada dois dias, recortando estes papéis em volta das posturas. Os papéis recortados contendo as posturas são transferidos para uma placa de petri (Fig.18) onde são tratadas com formaldeído 5% por cinco minutos, água autoclavada ou fervida, por dois minutos e solução de sulfato de cobre 1% durante dois minutos. Posteriormente retira-se o excesso de água e 5 posturas são colocadas na face interna de copos plásticos transparentes de 250 ml com 2 cubos de dieta. A tampa deste copo é perfurada ( $\varnothing = 2\text{cm}$ ) e vedada com algodão para ventilação. Cada massa de ovos, após o tratamento é presa com a própria tampa do copo (Fig.19).

Foto: F.Schmidt



Fig. 17. Gaiola com posturas de *S. frugiperda*.

Foto: F.Schmidt



Fig. 18. Papéis recortados contendo posturas de *S. frugiperda*.

Foto: F.Schmidt



Fig. 19. Massa de ovos já limpos, incubando em potes plásticos.

### Manejo de lagartas

Após 7 a 8 dias da eclosão dos ovos, as lagartas deverão encontrar-se no terceiro instar, aproximadamente 6,40mm (Fig.20). Neste estágio de desenvolvimento, faz-se o repique, individualizando as lagartas, ou colocando-se no máximo duas por copo, pois um número maior que este acarretará em canibalismo com prejuízo para a colônia. Neste recipiente as lagartas se tornarão pupa dentro do resto de dieta e fezes (Fig.21)

Foto: F.Schmidt



Fig. 20. Larvas em L3-L4 no prontas para serem individualizadas.

### Manejo de pupas

Após 14 a 16 dias do repique, as pupas são removidas dos copinhos, sexadas e esterilizadas externamente do mesmo modo que *A. gemmatalis*, e colocadas na gaiola de adultos (45 casais) para emergirem.

Foto: F.Schmidt

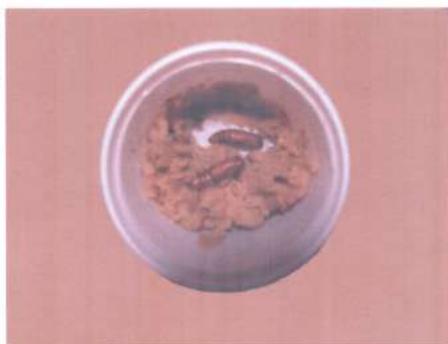


Fig. 21. Pupas envolvidas em restos de dieta e fezes.

## Dieta ou alimentação

### **Dieta para adultos: 1 litro (volume total aproximado)**

- mel = 50 g
- Ac. ascórbico = 100 mg
- sacarose = 50 g
- água destilada = 1000 ml

Obs.- a dieta é fornecida nos "bebedores" anteriormente mencionados.

### **Dieta artificial para lagartas (rendimento aproximado: 3 litros)**

Ingredientes	Quantidade
Feijão carioca*	412,5 g
Lev. Cervaja*	125,0 g
Germe de trigo <sup>o</sup>	198,0 g
Ac. ascórbico <sup>o</sup>	12,5 g
Ac. sórbico <sup>o</sup>	4,1 g
Nipagin <sup>o</sup>	8,0 g
Agar*	51,3 g
Água*	3000,0 ml
Formol 10% <sup>o</sup>	32,0 ml

Obs.: preparar de maneira idêntica à dieta de *A. gemmatilis*

## Gaiolas de adultos

Os adultos são colocados em gaiolas plásticas cilíndricas (18 cm de diâmetro x 22 cm altura), forradas no interior com papel sufit tipo off-set ou similar (Fig.22), contendo dieta para adultos, onde ocorre o acasalamento e oviposição. Sendo a tampa da gaiola telada, é necessário forrá-la por dentro com apenas uma das faces do papel toalha (Fig.23), para que haja uma boa ventilação da gaiola. Os ovos postos neste papel também são aproveitados.

Foto: F.Schmidt

Fig. 22. Gaiola para adultos de *S. frugiperda*.

Foto: F.Schmidt



Fig. 23. Papel toalha desmembrado em duas faces.

## Ciclo de vida

Tabela 2. Dados sobre o ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda* (Ferraz, 1962):

Estágio	Duração (x + SD) (Dias)	Viabilidade (%)
Ovo	3,11 ± 0,21	80,0
Lagarta	19,69 ± 0,25	72,5
Pré - pupa	2,14 ± 0,08	94,8
Pupa :		
(macho)	9,27 ± 0,08	
(fêmea)	9,31 ± 0,21	100
Adulto :		
(macho)	12,40 ± 3,75	-
(fêmea)	11,10 ± 2,60	-
Pré-oviposição	4,8 ± 1,51	

## Técnica para criação de *Culex quinquefasciatus* (Say, Diptera:Culicidae) e *Aedes aegypti* (Say, Diptera:Culicidae)

### Importância e características

Os mosquitos são insetos da ordem díptera, de distribuição mundial, ocorrendo principalmente nas regiões

quentes do globo. Eles são vetores de diversas doenças, tais como a malária, dengue, febre amarela, sendo estas duas últimas transmitidas por *A. aegypti* e filariose por *C. quinquefasciatus* (Fig.24). Além disso estes insetos causam incômodo e consequentemente "stress" nas populações atingidas por suas picadas.

Foto: Leonard Menatavamm



*Aedes Aegypti*



*Culex Quinquefasciatus*

Fig. 24. Adultos de *Culex quinquefasciatus* e de *Aedes aegypti*.

As larvas de *C. quinquefasciatus* (Fig.25) se criam em Lagoas de oxidação, poças d'água de chuva, águas pluviais encontradas em garagens de edifícios, alimentando-se de matéria orgânica contida na água, após eclodirem de massa de ovos, em forma de jangada que flutuam na superfície destes ambientes. As larvas de *A. aegypti* ao contrário necessitam de água mais limpa, normalmente águas pluviais acumuladas em plantas e recipientes vazios abandonados.

Uma outra forma de controle é utilizando *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis*. Essas bactérias são patogênicas para larvas de mosquitos e não causam danos ao homem e ao meio ambiente.

A manutenção de colônias de mosquitos, é de fundamental importância, pois fornece larvas saudáveis para avaliação da patogenicidade de isolados de *Bacillus* entomopatogênicos.

Foto: FShmidt



Fig. 25. Larvas de *C. quinquefasciatus*.

Várias formas de controle têm sido realizadas com o auxílio de inseticidas químicos, entretanto, esses agentes além de poluir o ambiente, em pouco tempo deixam de ser eficazes, pois os mosquitos adquirem resistência.

### Facilidades e equipamentos

#### Equipamentos necessários:

- Autoclave
- Capela de fluxo laminar ou caixa esterilizadora de bandeja com U.V.
- Ar condicionado
- Termohigrografo
- Timer
- Bandejas plásticas brancas: usadas para o desenvolvimento larval
- gaiolas de adultos: dimensões 60x60x60 cm, e seus lados são de tela fina. Na frente possui uma "manga" de tecido, para facilitar a manipulação e limpeza no interior.
- Copos para oviposição - 500ml
- Conta gotas - para coleta de pupas
- Recipiente para fornecimento de mel aos insetos
- Recipiente para aprisionar codornas

### Sala de criação de larvas e adultos:

Esta sala deve ter ar condicionado para manter constante a temperatura próxima à 25°C, bem como um timer para o controle do fotoperíodo que deve ser mantido em 14h de luz (Fig.26).

Foto: F.Schmidt



Fig. 26. Sala de criação dos Culicídeos *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*.

### Manutenção da colônia de *C. quinquefasciatus* (Cronograma 3)

#### Coleta de ovos

Os ovos de *C. quinquefasciatus* são colocados em grupos de 150, sendo este agrupamento denominado "jangada" (Fig.27). Diariamente, as jangadas são coletadas e postas em bandejas, previamente esterilizadas em U.V., com 4 litros de água destilada ou fervida.

Foto: F.Schmidt



Fig. 27. Posturas (Jangadas) *C. quinquefasciatus*.

É importante não colocar mais que 6 jangadas por bandeja, evitando assim a superpopulação.

#### Manejo de larvas

Após aproximadamente 24h ocorre a eclosão das larvas que vão se alimentar de biscoitos de ração de gato

(previamente autoclavados). Em cada bandeja coloca-se 2 biscoitos, que é trocado todos os dias para evitar que estes se dissolvam e fermentem.

A cada dois dias, as larvas são recolhidas em peneiras de "voil" e colocadas em novas bandejas. Esse tratamento é realizado até que a larva atinja o estado de pupa.

#### Manejo de pupas

Sete dias após a eclosão, as larvas começam a empupar. Com o auxílio de um conta gotas (Fig.28), essas pupas são coletadas e colocadas em copos plásticos, que por sua vez são introduzidos nas gaiolas.

Foto: F.Schmidt



Fig. 28. Pupas de Culicídeos sendo coletadas com conta-gotas.

Nessa fase, a pupa não se alimenta, só respira.

Assim sendo, não necessita de dieta. É interessante frisar que os machos empupam primeiro do que as fêmeas, portanto é necessário remanejar as pupas entre as gaiolas.

#### Manejo de adultos

Vinte e quatro horas após a pupação, começam a emergir os adultos. Coloca-se então, a solução aquosa de mel a 10% num recipiente com papel de filtro, de maneira que todos os insetos tenham acesso à dieta (Fig.29).

De 2ª a 5ª feira, durante 4 horas, é colocado uma codorna por gaiola para o repasto sanguíneo da fêmea. Nestes dias o recipiente com mel a 10% é retirado pela manhã.

Dois dias após o repasto sanguíneo as fêmeas já começam a fazer posturas, reiniciando todo o procedimento.

É importante mencionar que sem se alimentarem de sangue as fêmeas não fazem posturas.

Foto: F.Schmidt



Fig. 29. Recipiente fornecedor de solução água/mel para adultos de Culicídeos.

## Dieta ou alimentação

### Dieta para larvas do 1<sup>o</sup> ao 4<sup>o</sup> estágio:

Ração comercial de cachorro ou de gato, autoclavada a 121°C por 20 Minutos.

### Dieta para adultos:

#### Dieta para Machos e fêmeas

Solução aquosa de mel a 10%.

### Dieta para fêmeas

São oferecidas de 2<sup>a</sup> a 5<sup>a</sup> feira, codornas vivas (sem penas nas costas) acondicionadas em gaiolas de contenção (Fig.30), feitas com garrafas plásticas tipo "Pet", visando alimentação de fêmeas de *Culex* com sangue.

Foto: F.Schmidt

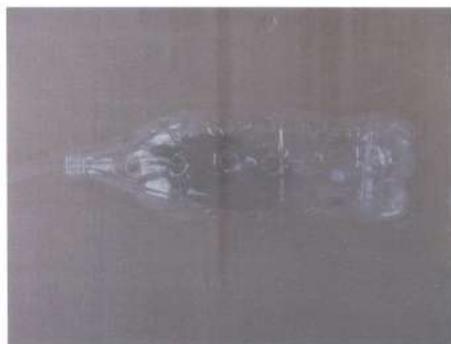


Fig. 30. Gaiola para contenção de codornas.

## Gaiola de adultos

A gaiola de adultos pode ser feita em madeira e recoberta por tela mosquiteiro ou sombrite escuro. É em formato de cubo tendo como entrada uma "manga" de tecido para facilitar o manuseio e evitar escape de adultos (Fig.31).

Foto: F.Schmidt

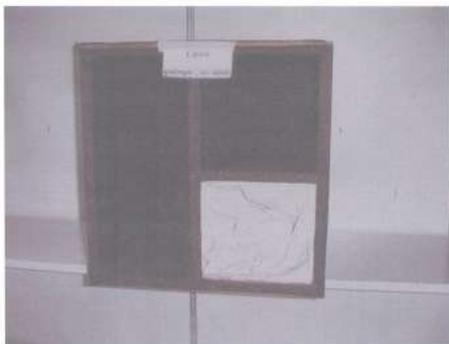


Fig. 31. Gaiola para manutenção de Culicídeos adultos:

## Ciclo de vida

Tabela 3. Ciclo de vida de *C. quinquefasciatus*.

(observados no Laboratório de Bioecologia de Insetos - Embrapa-Cenargen)

ESTÁGIO	TEMPO		
	Min.	Médio	Max.
Ovos:	20h	24h	30h
Larvas:			
Macho	6d	7d	8d
Fêmea	7d	8d	9d
Pupas	24h	36h	48h

### Dados de sobrevivência (%)

- Viabilidade dos ovos = 90
- Larvas = 95
- Pupas = 100

### Outros dados

- N<sup>o</sup> médio de ovos/postura = 150
- N<sup>o</sup> de estágios = 4
- Longevidade = 60 dias (e condições de laboratório)
- Início do declínio (morte) = 25 dias

Os dados do ciclo de vida e sobrevivência foram obtidos a 28°C, 80% U.R. e 14h de fotofase.

## Manutenção da Colônia de *A. aegypti* (Cronograma 3)

### Coleta de ovos

Os ovos de *A. aegypti* são colocados individualmente nas tiras de papel acima mencionadas (Fig.32). Diariamente, os papéis são coletados e postos em bandejas, previamente esterilizados em U.V., contendo 4 litros de água autoclavada. Os ovos podem ser armazenados por longos períodos, se, o papel onde estão depositados for secado a temperatura ambiente e guardado em sacos plásticos.

Foto: F.Schmidt

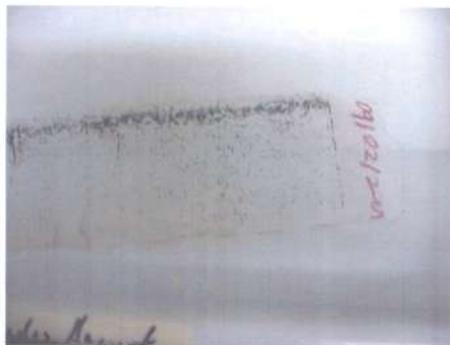


Fig. 32. Tiras de papel com ovos de *A. aegypti*.

### Manejo de larvas

A eclosão das larvas ocorre a aproximadamente vinte e quatro horas após a oviposição. As larvas são alimentadas com de biscoitos de ração de gato previamente autoclavados a 121°C por vinte minutos. Em cada bandeja coloca-se 2 biscoitos, que são trocados todos os dias para evitar que se dissolvam e fermentem. Caso isso ocorra, forma-se uma nata que impede a respiração das larvas.

A cada dois dias, as larvas são recolhidas em peneiras de "voil" e colocadas em novas bandejas. Essa manipulação é realizada até que a larva atinja seu estado pupal.

### Manejo de pupas

Sete dias após a eclosão, as larvas começam a empupar. Com o auxílio de um conta gotas, essas pupas são coletadas e colocadas em copos plásticos, que por sua vez são introduzidos nas gaiolas.

Nessa fase, a pupa não se alimenta, só respira. Assim sendo, não necessita de dieta. É interessante frisar que os machos empupam primeiro do que as fêmeas, portanto é necessário distribuir as pupas entre as gaiolas.

### Gaiola e manejo de adultos

Os adultos devem ser criados em sala climatizada com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 14/10 e umidade relativa de 70%.

Eles são mantidos em gaiolas quadradas cujos lados medem 60 cm, e cujas laterais são de tela preta para mosquitoireiro. A parte frontal destas gaiolas possui uma "manga" de tecido, para facilitar a manipulação e limpeza.

Os mosquitos são alimentados com solução aquosa de mel a 10%, para isso, coloca-se um recipiente contendo esta solução dentro da gaiola. Este mel deve ser substituído a

cada dois dias, evitando assim a contaminação com fungos e bactérias.

O repasto sanguíneo segue o mesmo manejo indicado anteriormente para *C. quinquefasciatus*.

## Técnica de criação de *Anthonomus grandis* (Boheman), Bicudo do algodoeiro

### Importância e características

*Anthonomus grandis*, bicudo do algodoeiro (Fig.33), é uma das pragas mais importantes da cultura do algodão. Este inseto se desenvolve nos botões florais e nos frutos, do seu hospedeiro, causando a queda destes ou defeitos na fibra produzida, causando prejuízos na produção e na comercialização do algodão.

Foto: F.Schmidt



Fig. 33. Adulto de *Anthonomus grandis* (Bicudo do algodoeiro).

### Facilidades e Equipamentos

#### Equipamentos Necessários:

- Umidificador (em regiões ou épocas de baixa umidade)
  - Freezer
  - Geladeira
  - Condicionador de ar
  - Balança
  - Timer
  - Termohigrografo
  - Microscópio estereoscópio
  - Autoclave ou fogão
  - Capela c/ fluxo laminar ou estrutura semelhante(caixa ou sala) com lâmpada U.V. germicida 30W
  - Liqüificador Industrial, batedeira ou mixer
  - Piceta
  - Seacador manual de cabelo
  - Balão volumétrico e funil
- Sala de Criação de larvas e adultos**  
Esta sala deve ter umidade em torno de  $65 \pm 5\% \text{UR}$ , fotoperíodo de 14 h e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

- Equipamentos:
- Ar condicionado
  - Termohidrógrafo



## Dieta ou Alimentação

### Dieta Artificial para Larvas e adultos de *A. grandis* (bicudo do algodoeiro)

Componentes	Quantidades
Agar (1)	40 g
Levedo de cerveja (1)	60 g
Germes de trigo (2)	60 g
Ácido ascórbico (2)	20 g
Ácido sórbico (2)	2,4 g
Nipagin (2)	2 g
Proteína de soja (PVT)	100 g
Glicose	60 g
Pharmamedia (1)	40 g
Sais de Wesson	10 g
Vitaminas de Vanderzant modificada* (2)	10 ml
Água (1)	1500 ml

(\*) Complexo vitamínico detalhado anteriormente na dieta de *A. gemmatilis*.

**Preparação:** colocar os componentes marcados com o número (1), em um recipiente autoclavável (saco de polipropileno). Em seguida, autoclavar estes componentes por 20 minutos a 120 °C sob pressão de 1 atmosfera. Retirar o material autoclavado, verter em uma panela e homogeneizar com uma batedeira elétrica. Quando a temperatura destes componentes estiver a 60°C, adicionar os anticontaminantes e conservantes (2) misturando-os bem. Acondicionar a dieta em bandejas esterilizadas previamente em U.V.

## Manejo e gaiola de adultos

Os adultos devem ser criados em sala climatizada com temperatura de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 14/10 e umidade relativa de 70% (Fig.38).

Grupos de até 600 casais são mantidos em gaiolas que consistem de recipientes plásticos, cujo fundo e a tampa são telados. Este recipiente é colocado dentro de um outro não telado (Fig.39), onde os ovos e fezes que caem do recipiente telado e ficam depositados. Antes de colocar os adultos nos recipientes plásticos estes devem ser esterilizados com luz ultravioleta de 30W por 15 minutos, e terem em suas bordas aplicada vaselina, para dificultar a fuga de insetos durante o manejo destes.



Fig. 38. Sala de criação de Bicudo do algodoeiro.



Fig. 39. Gaiolas para manutenção e ovoposição de Bicudo.

Estes adultos são alimentados com dieta artificial, oferecida em formato de semicilindros medindo 3,5 x 2,2 cm de diâmetro, que são depositados nos recipientes com a área de maior superfície curva para cima, (Fig.40) num total de 5 por recipiente, aproximando-se assim da técnica sugerida por Gast, 1966. A cada 2 dias é feita a limpeza desses recipientes, sendo retirados os ovos, fezes e insetos mortos, estes últimos com o auxílio de de jato de ar quente fornecido por um secador manual de cabelo. Os insetos vivos se movimentam com o calor permitindo assim separá-los dos mortos.



Fig. 40. Dieta semicilíndrica sobre a tela da gaiola de ovoposição.

## Outros dados

Período de pré-oviposição: 5,6 dias

- Fecundidade observada: 130 ovos/(amplitude de 3-368)

- Número de instares: 5

- Viabilidade de ovos: 20%

## Ciclo de Vida (Tab.4)

Tabela 4. Ciclo de vida de *Anthonomus grandis* em laboratório criado com dieta artificial.

Fase	Duração(dias)
Ovo	5,47
Larva e Pupa	15,00
Pré-oviposição	5,60
oviposição	60,64
Pós-oviposição	15,12

## Procedimentos gerais para utilização do laboratório de criação de insetos

Não transitar entre os laboratórios fungos, vírus e bactérias e o de criação de insetos.

Não entrar com material proveniente do campo no Laboratório criação de insetos

- Lavar as mãos antes de iniciar o trabalho.
- Manter fechada a porta da sala de dieta.
- Eliminar os resíduos de dieta fora dos locais de criação de insetos.

As paredes, pisos, balcões e prateleiras do laboratório, de criação devem ser revestidos por materiais que permitam a limpeza diariamente com desinfetantes.

O Hipoclorito de sódio é bastante utilizado como desinfetante, pois age sobre um largo espectro de

microorganismos. Deve-se evitar os desinfetantes muito perfumados, para não perturbar a comunicação entre os insetos.

Fazer uso contínuo dos equipamentos de proteção adequados ao manuseio de insetos, evitando assim, contato com substâncias alergênicas.

Os equipamentos de proteção (jalecos, máscaras, e luvas) e de manuseio devem ser de uso exclusivo na colônia.

O ambiente onde ficam os insetos deve ser tranquilo, silencioso, e sem vibração provocada por máquinas.

Funcionários e/ou estagiários que participem de alguma etapa da criação ou seleção dos insetos para uso em bioensaio, devem executar estas tarefas antes de trabalharem nos laboratórios onde existam contaminantes e/ou entomopatogênicos.

É importante manter livro atualizado, com o controle de produção insetos fornecimento e ocorrências, no laboratório de criação de insetos.

- Só manter o número necessário de insetos na colônia.
- Programar previamente o fornecimento dos insetos.

## Controle de qualidade e produção

Parâmetros da biologia de uma população de insetos tais como: fertilidade, fecundidade, viabilidade, taxas de desenvolvimento, peso de pupas, deformação de pupas e adultos etc podem ser, segundo Moreti & Parra, 1983, usados para avaliar a qualidade de insetos mantidos em laboratório. Estes dados apesar de serem rotineiramente coletados são raramente publicados. É importante lembrar que os resultados de um laboratório, nem sempre podem ser comparados com os resultados de outros laboratórios devido a diferença de métodos empregados para criação do mesmo inseto.

Os parâmetros mencionados acima têm em sua maior parte efeitos desconhecidos sobre a qualidade total de insetos mantidos em laboratório (Huettel, 1976), podendo, em cativeiro, serem produzidos insetos com características diferenciadas daquelas observadas nos insetos selvagens, comprometendo assim a consistência e mesmo a aplicabilidade de resultados experimentais obtidos com tais insetos. Contudo, isto não invalida as formas de controle de qualidade anteriormente citadas, pois permite comparar a mesma população em distintas gerações, e apontar variações no desempenho da colônia. Deve-se para tanto estabelecer-se um intervalo de tempo para que esta atividade não consuma tempo excessivo.

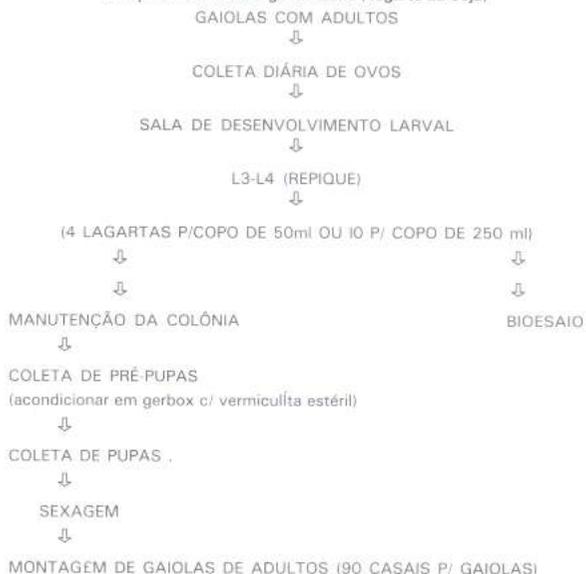
O controle da produção e fornecimento de insetos deve ser feito pelo responsável do laboratório de criação de insetos, para que este técnico tenha condições de realizar o

fornecimento sem que isto ponha em risco a sobrevivência da colônia. Este procedimento também facilita a avaliação do técnico envolvido na criação, que via de regra é pressionado para fornecer insetos para bioensaios não programados.

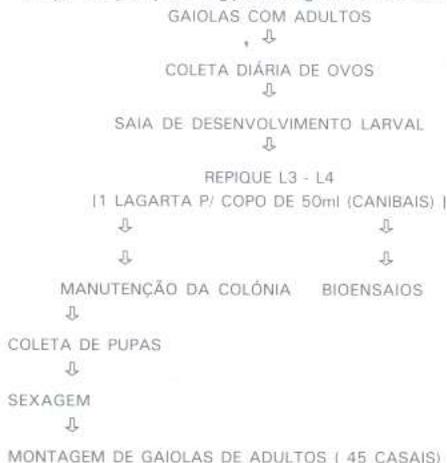
## Referências Bibliográficas

- ANDERSON, T. E.; LEPPLA, N. C., (Ed.). **Advances in insect rearing for research and pest management**. Boulder, USA: Westview Press, 1992. 519p.
- CONSOLI, R. G. B.; OLIVEIRA, R. L. de. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998. 228p.
- CRUZ, I.; WAQUIL, J. M.; SANTOS, J. P.; VIANA, P. A.; SALGADO, L. O. **Pragas da cultura do milho em condições de campo: métodos de controle e manuseio de defensivos**. Brasília: EMBRAPA, 1985. 75p. (Circular Técnica, 10).
- CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas, MG: EMBRAPA-CNPMS, 1995. 45p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 21).
- FERRAZ, A. N. Combate às pragas na lavoura e no armazenamento do milho. **Seleções Agrícolas**, Rio de Janeiro, v.17, n.196, p.17-25, 1962.
- GAST, R. T. Oviposition and fecundity of boll weevils in mass-rearing laboratory cultures. **Journal of Economic Entomology**, v.59, n.1, p.173-176, 1966.
- GAZZONI, D.; OLIVEIRA, E. B. de; CORSO, I. C.; FERREIRA, B. S. C.; VILLAS BOAS, G. L.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A. R. **Manejo de pragas da soja**. Brasília: EMBRAPA, 1981. 44p. (Circular Técnica, 5).
- HUETTEL, M. D. Monitoring the quality of laboratory-reared insects: a biological and behavioural perspective. **Environmental Entomology**, v.5, n.5, p.807-814, 1976.
- LEPPLA, C. N.; ASHLEY, T. B.; GUY, R. H.; BUTLER, G. D. Laboratory life history of velvetbean caterpillar. **Annals of the Entomological Society of America**, v.70, p.217-220, 1977.
- MORETI, A. C. C.; PARRA, J. R. P. Biologia comparada e controle de qualidade de *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) (Lepidoptera-noctuidae) em dietas natural e artificial. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.50, n.1-4, p.7-15, 1983.
- PARRA, J. R. P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. São Paulo: USP, 1986. 80p. Apostila ESALQ/USP.
- PARRA, J. P. R. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: FEALQ, 1992. 161p.
- SINGH, P.; MOORE, R. F., (Ed.). **Handbook of insect rearing**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 1985. v.2. 514p.

## Cronograma 1

Criação de *Anticarsia gemmatilis* (Lagarta da Soja)

## Cronograma 2

Criação de *Spodoptera frugiperda* (Lagarta do Cartucho do Milho)

**Cronograma 3****CRIAÇÃO DE CULICÍDEOS (mosquitos)**

INSETOS CAMPO ("SELVAGENS")



RETIRADA DA ÁGUA SUJA



SEPARAÇÃO DAS LARVAS ATRAVÉS DE PENEIRAÇÃO



COLOCAÇÃO DAS LARVAS DE INSTARES DIFERENTES NAS BANDEJAS



ALIMENTAR COM DIETA ARTIFICIAL (RAÇÃO DE CACHORRO)



TROCAR A ÁGUA TODOS OS DIAS



COLETAR AS PUPAS COM O AUXÍLIO DE CONTA-GOTAS



MONTAGEM DE GAIOLAS DE ADULTOS

-RECIPIENTE DE DIETA DE MEL 10%

-RECIPIENTE PARA OVIPOSIÇÃO

(700 PUPAS POR GAIOLA)

F1

OBTENÇÃO DE DADOS BIOLÓGICOS PARA  
CONTROLE DE QUALIDADE**Cronograma 4****Criação de *Antonomus grandis* (Bicudo)**

GAIOLA DE ADULTOS



COLETA DIÁRIA DE OVOS



DESCONTAMINAÇÃO DO OVOS



Inoculação do ovos em placa com dieta



⇒ Larvas p/ BIOENSAIO



Incubação das placas inoculadas(sala de criação)



EMERGÊNCIA DE ADULTOS

**Circular  
Técnica, 11**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) -  
Brasília, DF, CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372  
PABX: (61) 448-4800 Fax: (61) 340-3624

http://www.cenargen.embrapa.br

e-mail: sac@cenargen.embrapa.br

**Comitê de  
publicações**

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretário-Executivo: Miraci de Arruda Câmara Pontual

Membros: Antônio Costa Allem

Marcos Rodrigues de Faria

Marta Aguiar Sabo Mendes

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

**Expediente**

Supervisor editorial: Miraci de Arruda Câmara Pontual

Normalização Bibliográfica: Sérgio Souza Santos

Editoração eletrônica: Alysson Messias da Silva

1ª edição

1ª impressão (2001): 150 unidades

gerações, somente por volta da quinta à sétima geração ocorre uma recuperação desta variabilidade, devido a mutações e recombinações (Parra, 1986).

Para o estabelecimento da colônia do culicídeo *C. quinquefasciatus* são coletadas larvas no campo, em local como Lagoas de oxidação, poças d'água de chuva, águas pluviais encontradas em garagens de edifícios, de preferência onde não tenha sido feito nenhum tipo de controle químico ou biológico recente. Essas larvas são deixadas em local isolado e à medida em que empupam são colocadas em gaiolas. A quantidade aproximada é de 700 pupas por gaiola.

Após a estabilização, a cada 6 gerações, são feitas novas introduções para revigoramento da colônia. Para isso, pupas da colônia e pupas obtidas de material oriundo do campo ou de outra colônia são colocadas na mesma gaiola para que haja cruzamento entre os adultos emergidos. Os mesmos procedimentos em laboratório são feitos quando da introdução ou estabelecimento de colônia de outro culicídeo, *Aedes aegypti*, exceto em relação à origem. Este inseto deve proceder de outro laboratório, pois doenças transmitidas por ele ao homem, passam de uma geração de mosquito a outra, através dos ovários das fêmeas portadoras (Consoli & Oliveira, 1998).

Esquema geral para estabelecimento ou revigoramento de colônia de insetos

