

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

METODOLOGIA DE CRIAÇÃO DE *Anastrepha fraterculus*
(WIED., 1830) (DIPTERA: TEPHRITIDAE) EM DIETA ARTIFICIAL
EM LABORATÓRIO

Luiz A. B. Salles¹

ABSTRACT

Rearing technique for *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830)
(Diptera: Tephritidae) in laboratory

A. fraterculus was successfully reared in laboratory with simplified larval medium used to rear other *Anastrepha* species. New oviposition substrate and minimum handling procedures were developed and successfully tested for two consecutive years.
KEYWORDS: fruit fly; mass rearing.

RESUMO

A. fraterculus foi criada com sucesso em laboratório em dieta simplificada em relação à aquelas utilizadas para espécies de *Anastrepha*. Foram desenvolvidos novo substrato para oviposição e procedimentos que permitem o mínimo manuseio dos tefritídeos ao longo do ciclo de produção. Estes procedimentos foram testados por dois anos consecutivos, mostrando a sua viabilidade para criação de *A. fraterculus*.

Recebido em 4/12/91

¹ Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado/EMBRAPA, Caixa Postal 403, 96001-970 Pelotas RS. Bolsista do CNPq.

INTRODUÇÃO

O progresso e sucesso em diversas áreas da pesquisa entomológica dependem da criação de insetos em laboratório. A ciência (ou arte) de criar insetos têm aumentado em sua complexidade e sofisticação durante as duas últimas décadas. Entomologistas, no passado, desenvolveram importantes estudos, coletando insetos do campo ou criando-os em laboratório com a utilização de hospedeiros naturais. Todavia, novas necessidades, tais como a produção massal de parasitóides e predadores, demandaram maiores quantidades de insetos. Assim, novas dietas artificiais, amplos estudos de condições de ambientes controlado e métodos de manipulação foram desenvolvidos e hoje, são usados para inúmeras espécies de insetos criados massalmente em laboratório.

Métodos de criação em laboratório da mosca-das-frutas sula americana *A. fraterculus* foram desenvolvidos por BARROS *et al.*, (1983), BAKER (1945), MARTINS (1986), PETELINCAR *et al.*, (1985), SIMON (1968), ZUCOLOTO *et al.*, (1979). Todavia, esses processos tiveram limitações, ora na obtenção de novos (BAKER, 1945; BARROS *et al.*, 1983; PETELINCAR *et al.*, 1983, ora no desenvolvimento das larvas (MARTINS, 1986; SIMON, 1968).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma nova tecnologia de criação de *A. fraterculus* em laboratório utilizando um meio artificial simplificado e de fácil aquisição no mercado brasileiro.

METODOLOGIA DA CRIAÇÃO

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Entomologia do Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado/EMBRAPA, Pelotas-RS. A temperatura nas salas de criação foi de 25°C, a umidade relativa variou entre 70 e 85%, sendo o fotoperíodo de 16 horas, e luminosidade de 1.900 lux, fornecida através de lâmpadas fluorescentes "luz do dia" de 40 w.

Obtenção das matrizes reprodutivas

Conforme relatado por SALLES & KOVALESKI (1990), há dentre as espécies de Tephritidae uma massiva dominância de *A. fraterculus* no Rio Grande do Sul, em particular na região sul do Estado. Inicialmente obtiveram-se larvas da mosca-das-frutas de goiabas infestadas naturalmente. Após a emergência, os adultos foram observados quanto ao fenótipo e, aqueles que se enquadravam no padrão morfológico de *A. fraterculus* (tamanho, cor, tonalidade, etc.), passaram a fazer parte do estoque genético básico da criação.

Obtenção de ovos

O ponto crítico no estabelecimento de uma colônia de *A. fraterculus* em condições de laboratório, foi e têm sido a da obtenção de ovos e da possibilidade de uso destes (LOPES, 1986; MARTINS, 1986; PETELINCAR *et al.*, 1985). Obter o ovo em si não é problema limitante, todavia a sua utilização o é. A remoção do ovo do substrato de postura, seja da espuma de plástico (MARTINS, 1986), ou da gaze tratada com parafina (PETELINCAR *et al.*, 1985) mostrou-se problemática, trabalhosa e pouco eficiente. Frutos artificiais ou substratos redondos foram usados para outras espécies de tefritídeos (CYTRYNOWICZ *et al.*, 1982; LOPES, 1986). Dentre as diversas tentativas feitas no presente estudo, chegou-se à conclusão de que metade de frutos artificiais, revestidos com um filme plástico, foi altamente eficiente.

O preparo desses frutos artificiais foi feito da seguinte forma: a) **ingredientes necessários:** ágar bacteriológico 8,5 g, água pura 350 ml, suco concentrado de amora preta (*Rubus* sp.) 75 ml, metil parahidroxibenzoato (Nipagin 10% dissolvido em álcool etílico) 4 ml; b) **Preparo da solução:** dissolver o ágar em água fria e posteriormente levar ao fogo até o ponto de fervura, agitando sempre para não formar grumos; logo após a fervura, retirar do fogo, adicionando e misturando, de forma homogênea o suco de amora e o Nipagin. Caso o suco de amora tenha fragmentos de polpa ou outros sólidos, recomenda-se coá-lo antes do uso.

Para a moldagem dos frutos artificiais, usaram-se fôrmas plásticas de fazer gelo em bolas. Para se fazer meios frutos, somente preenche a metade da forma. Passados de 1 a 2 minutos, o meio solidificará e poderá ser removido da fôrma, pressionando-se para baixo um lado do fruto. O excesso de gelatina das bordas do fruto é facilmente removido com a mão.

Os frutos podem ser usados de imediato ou estocados em refrigerador. Se forem guardados em refrigerador, é necessário acondicioná-los em saço plástico ou outro recipiente fechado hermeticamente para não haver perda de água.

Para que o fruto artificial seja oferecido as moscas-das-frutas há necessidade de revesti-lo com uma película ou filme plástico (PARAFILM[®]). Cortam-se pedaços (+ 3 x 5 cm) desse material, os quais são esticados na parte central com o dedo polegar, colocando-se a parte convexa do fruto na parte esticada do plástico. O excesso de plástico é cortado e com um alfinete entomológico, fura-se as bolhas de ar que ficarem nos frutos.

Os frutos são colocados nas gaiolas de oviposição, diretamente na base das gaiolas de oviposição, com a parte convexa voltada para cima.

Embora CYTRYNOWICZ *et al.*, (1982) tenham determinado uma maior atração para fêmeas de *A. fraterculus* por esferas de cor

amarela, optou-se pelas de cor vermelha (Opala Rosa, 022/ The Wilson Colour Chart II) devido à facilidade de se obter o suco de amora preta e a comprovação através de testes anteriores da quantidade de ovos nelas depositados.

Colocam-se 4 frutos artificiais por um período de 2 dias. Neste período, os frutos ficam repletos de ovos, facilmente visíveis observando-os contra a luz.

A eclosão de larvas de *A. fraterculus* à 25°C ocorre em cerca de 3 à 4 dias. No sistema usado, os "frutos" contendo os ovos, são colocados imediatamente na dieta.

As gaiolas de postura são de madeira (30 x 30 X 40 cm) revestidas com tecido tipo filô. O fundo da gaiola é revestido com madeira compensada, e na parte frontal há uma porta do tipo quilhotina.

Nas gaiolas de postura, adiciona-se o alimento para os adultos, composto de açúcar mascavo (100 g) e proteína hidrolizada (50 ml) (2:1), água pura (300 ml) e uma colher de sopa de mel. A solução pastosa de açúcar mascavo e proteína hidrolizada é colocada em pequenas placas de Petri (diâmetro = 3 cm) preenchendo-as completamente. Sobre esta solução coloca-se um pedaço de tela de náilon, para evitar que as moscas fiquem presas ao alimento. A solução de água e mel é colocada em uma placa de Petri e fornecida por capilaridade, através de algodão hidrófilo.

O alimento deve ser trocado semanalmente, porém há que repô-lo a cada dois dias, para evitar a contaminação por microorganismos.

Criação de larvas

A criação das larvas da mosca da fruta foi feita em dieta artificial, a semelhança de outros autores (KAMASAKI *et al*, 1970; MARTINS, 1986; RHODE, 1957; SIMON, 1968; ZUCOLOTTI *et al*, 1979), para várias espécies de tefritídeos.

A composição da dieta artificial é a seguinte (para 1 litro de dieta): Germe de trigo - 60 gramas; Levedura-de-cerveja-60 gramas; Açúcar branco cristal - 60 gramas; Benzoato de sódio - 1 grama. Após a homogenização dos ingredientes em um Becker de 350 ml, acrescenta-se lentamente 400 ml de água fria, para formar uma pasta homogênea. Adicionar 6 ml do ácido clorídrico concentrado (37%) e 8 ml de Nipagin 10% diluído em álcool etílico.

Em outro recipiente colocar 400 ml de água e 10 g de ágar bacteriológico. Levá-lo ao fogo, mexendo constantemente, até o ponto de fervura.

Adicionar a solução água e ágar no outro recipiente com a pasta da dieta e mexer até a perfeita homogeneização.

A mistura a deve ser colocada nas bandejas, pois em pouco tempo a dieta solidificará formando uma gelatina, com cerca de 1,5 à 2 cm de espessura. Deixa-se esfriar em temperatura ambiente. Após, estas bandejas são guardadas na geladeira, viradas para baixo e dentro de um saco plástico para evitar a dessecação e/ou contaminação. Pode-se guardar as bandejas com dietas, no modo mencionado, por 2 à 4 semanas sem haver alteração alguma.

Quando se pretende utilizar a bandeja com a dieta, deve-se retirá-la da geladeira e deixá-la que atinja a temperatura ambiente.

Para colocar os frutos artificiais com ovos de *A. fraterculus* na dieta artificial são realizados orifícios, (5 cm de diâmetro) na camada da dieta em fileiras, utilizando-se um tubo de ensaio e a porção da dieta removida é colocada ao lado do furo. São colocados cerca de 20 frutos artificiais por bandeja (4 fileiras com 5 frutos em cada). A parte convexa do furo é colocada no furo. Desse modo, pode-se movimentar as bandejas sem que os frutos se desloquem.

A seguir, pulveriza-se a bandeja com uma solução do fungicida Benomil a 0,2% diluída em água, cobrindo-se com filme plástico a bandeja, estendendo-o ao máximo. É importante que o plástico fique bem estirado e bem aderido à borda da bandeja; caso contrário, as larvas após completarem o desenvolvimento e saírem da dieta, também poderão sair da bandeja.

No centro da bandeja, se remove uma porção do plástico (5x 10 cm). Sobre este orifício, coloca-se um pedaço de gaze (ex: pano Perfex) com a finalidade de propiciar a ventilação e não permitir condensação demasiada de vapores de água na bandeja. Pulverizar a gaze com a solução de Benomil à 0,2%, ficando esta sempre úmida e assim aderida ao plástico, evitando a entrada de moscas drosófilas, um problema potencial nos meses de verão.

Obtenção das pupas

Logo que começam a se formar as primeiras pupas a bandeja deve ser removida.

Assim, retiram-se o plástico de cobertura e coloca-se água na bandeja até cobrir totalmente o que sobrou da dieta (água com temperatura entre 10 e 35°C não influi na velocidade de formação, número de pupas e emergência de adultos). As pupas já formadas flutuarão e facilmente serão coletadas com auxílio de um coador. Logo a seguir, com uma colher, mexe-se o conteúdo da bandeja. Este conteúdo é despejado numa peneira de 1 mm de abertura de malha. É importante que a peneira esteja sobre uma bandeja, pois se houverem larvas pequenas, estas passarão na malha da peneira, podendo-se aproveitá-las. Com água corrente, lava-se o conteúdo sobre a peneira e o resto da dieta dissolverá e passará pela malha, ficando sobre esta somente as larvas.

É importante ressaltar a grande resistência aparente ao manuseio das larvas de *A. fraterculus* e assim, não há razão para se temer a ação de lavagem, peneiragem, etc.

Como as larvas têm uma atividade muito intensa de deslocamento quando fora da dieta e estão próximas a época de puparem, há necessidade de confiná-las para que as pupas fiquem em um só local. Assim, idealizou-se um cilindro para pupação, que é um cilindro PVC de 200 mm, com 20 cm de comprimento. Por dentro e no meio é colocada uma peneira de tecido tipo filô, fixa por um anel do mesmo material do cilindro. Sobre esta peneira colocam-se as larvas e o resto de dieta da primeira peneira de separação e, como as larvas passarão pelo filô, cairão no piso do cilindro. Neste se coloca um tecido de malha densa e que não permita a passagem das larvas. Para absorver a umidade excessiva das larvas e pupas, colocam-se duas folhas de papel-toalha sobre o tecido. As pupas se formarão sobre e entre as folhas de papel. Há necessidade de também se colocar uma outra peneira, semelhante a do fundo do cilindro, na parte superior, para evitar a fuga das larvas. Cerca de 5 dias após a separação das larvas, remove-se a peneira da parte de baixo do cilindro e as pupas são facilmente coletadas.

Estocagem de pupas e emergência dos adultos

As pupas são colocadas em uma placa de Petri ou outro recipiente, sobre uma camada de areia levemente umedecida e sobre as pupas, coloca-se mais uma fina camada de areia, que funciona como substrato de fixação e apoio para os adultos recém emergidos.

Quando os primeiros adultos emergem, este recipiente é transferido para as gaiolas de emergência. As gaiolas de emergência, são idênticas às de oviposição. Nas gaiolas de emergência é necessário fornecer alimentação extra. Além das placas com proteína hidrolizada e solução de água e mel, com mais proteína, coloca-se com uma espátula, uma porção considerável da solução semi-pastosa de proteína, na parte lateral e de cima da gaiola e esta escorre em grossos filetes, constituindo diversos pontos de alimentação para as moscas.

Manejo da criação

O sucesso de uma criação de insetos em laboratório esta diretamente dependente do sistema e da constância do manejo, ou seja, da rotina de atividades desenvolvidas. Nas gaiolas de oviposição o alimento (proteína hidrolizada e solução de água-mel) é trocado a cada três dias. Isso evita a contaminação do alimento por fungos e bactérias. Nessa oportunidade, as moscas mortas e pedaços, são retiradas da gaiola. Para tanto, usa-se o succionador de insetos, tanto com aspiração humana como acoplado à bomba de vácuo.

Todas as manhãs, pulveriza-se as gaiolas com uma fina né-

voa da solução água e Benomil 0,2%. A razão para este procedimento não está bem esclarecida, porém nota-se que as moscas tornam-se mais ativas após, além de possivelmente evitar a contaminação das gaiolas com fungos.

As gaiolas quando ficam muito sujas (\pm 2 meses de uso), são desativadas e lavadas com água e detergente e, então, desinfectadas com uma solução \pm 5% de clorofina.

Como foi descrito no item referente a criação de larvas, as bandejas de criação não sofrem manipulação alguma ao longo do período de desenvolvimento larval, somente a pulverização com solução de 0,2% de Benomil sobre o tecido que cobre a abertura no plástico.

AGRADECIMENTOS

Sem a participação e a dedicação dos laboratoristas José Carlos Silveira e Jair Zaffalon Farias, este trabalho não teria sido concluído. Agradeço as Drs. Antonio R. Zucchi e José Postalí Parra do depto de Entomologia da ESAL/USP pela identificação da espécie de mosca da fruta e revisão do manuscrito.

LITERATURA CITADA

- BAKER, E.W. 1945. Studies on the Mexican fruit fly known as *Anastrepha fraterculus*. *J. econ. ent.* 38 (1):95-100.
- BARROS, M.D.; NOVAES, M.; MALAVASI, A. 1983. Estudos do comportamento da oviposição de *Anastrepha fraterculus* (Wiedmann, 1830) (Diptera, Tephritidae) em condições naturais e de laboratório. *An. Soc. ent. Brasil* 12(2):243-247.
- CYTRYNOWICZ, M.; MORGANTE, J.S.; SOUZA, H.M.L. 1982. Visual responses of south American fruit fly, *Anastrepha fraterculus*, and mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, to colored rectangles and spheres. *Environ. Ent.* 11(6):1202-1210.
- KAMASAKI, H.; SUTTON, R.; LOPES, D.F.; SELHIMÉ, A. 1970. Laboratory culture of the caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*, na Florida. *Ann. ent. Soc. Am.* 63(3):639-641.
- LOPES, R.M. 1986. Desenvolvimento ovariano e aspectos reprodutivos de *Anastrepha fraterculus* (Diptera:Tephritidae). Tese de mestrado, Instituto de Biociências USP, São Paulo, 96 p.
- MARTINS, J.C. 1986. Aspectos biológicos de *Anastrepha fraterculus* (Wied.; 1830) (Diptera, Tephritidae) em dieta artificial sob diferentes condições de temperatura e fotoperíodo. Tese de Mestrado. ESALQ/USP, Piracicaba, 80p.

- PETELINCAR, I.M.; ARANHA, V.L.S.S.; RAGIA, A.; WATANABE, K.; VECCHIATO, M.H.; SUPLICY FILHO, N. 1985. Metodologia para criação massal de "Mosca das Frutas" do gênero *Anastrepha* com dieta artificial. *Biológico* 51 (8):209-214.
- RHODE, R.H. 1957. A diet of Mexican fruit fly *Anastrepha ludens*. *J. econ. Ent.* 50:215.
- SALLES, L.A.B. & KOVALESKI, A. 1990. Mosca-das-frutas em macieira e pessegueiro no Rio Grande do Sul. *Hortisul* 1 (3):5-9.
- SIMON, J.E. 1968. Maiz rearing of *Anastrepha fraterculus* Wied., In: Symposium stage of research into the eradication of the Mediterranean and South American fruit flies and the cotton steiner in Peru by the sterile male technique. Viena, IAEA, p.116-119. *Proceedings*.
- ZUCOLOTTO, F.S.; PUSCHEL, S.; MESSAGE, C.M. 1979. Dieta artificial para larva de *Anastrepha* sp. In: REUNIÃO ANUAL DA SOC. BRAS. PROGRESSO DA CIÊNCIA, 31, Campinas, p 495. *Resumos*.
- WILSON, R.F. 1941. *The wilson colour chart*. The British Colour Council, 2v. 110p.