

Ocorrência do fungo entomopatogênico *Lecanicillium longisporum* Zimmerman em *Orthezia praelonga* Douglas (Hemiptera: Ortheziidae)

Roberto Luis Weiler^{1*}, Fernanda Souza Teixeira²,
Lécio Kaneko² & Celson Alexandre Weiler¹

RESUMO

A cochonilha *Orthezia praelonga* é uma importante praga dos citros, atacando as folhas e brotos, sugando continuamente a seiva, introduzindo toxinas que provocam desfolha, enfraquecimento das árvores e queda de até 50% dos frutos. O fungo *Lecanicillium longisporum* é patogênico para *O. praelonga* e ocorre sobre as diferentes fases de desenvolvimento do inseto, exceto ovo. O trabalho teve por objetivo identificar cochonilhas *O. praelonga* infectadas por *Lecanicillium* sp. e isolar este fungo para posterior multiplicação visando a obtenção de colônias puras. Coletou-se 120 insetos com formação cotonosa sobre os corpos em folhas de laranjeiras Valência, onde se observaram fungos dos gêneros *Penicillium*, *Trichoderma*, *Metarhizium*, *Beauveria* e *Lecanicillium*. No total foram isolados nove insetos com colônias de *Lecanicillium* sp. Uma vez que a colônia estava isolada e identificada foram utilizados os postulados de Koch para estabelecer uma relação causal entre o fungo *L. longisporum* e a cochonilha *O. praelonga*. Os insetos coletados das plantas inoculadas com o fungo apresentaram sintomatologia semelhante aos que anteriormente tinham colônias de *Lecanicillium* sp e confirmaram a relação causal da doença, havendo morte de 100% dos insetos após 10 dias de inoculação.

Termos de Indexação: citros, cochonilha, controle biológico.

SUMMARY

Occurrence of entomopathogenic fungi *Lecanicillium longisporum* Zimmerman on *Orthezia praelonga* Douglas (Hemiptera: Ortheziidae)

The soft scale, *Orthezia praelonga*, is a pest in citrus orchards, they continuously suck the sap, introducing toxins that cause defoliation, weakening of the tree and can cause a drop of fruits up to 50%. The fungus *Lecanicillium longisporum* is pathogenic to *O. praelonga* and occurs on the different stages of development of the insect, except egg. The objective of this work was to identify scale insects *O. praelonga* infected with *Lecanicillium* sp. and to isolate this entomopathogenic fungus for future multiplication. A hundred and twenty insects with a cottony

¹ PPG - Fitotecnia, Faculdade de Agronomia/UFRGS. Rua Bento Gonçalves, 7712, Porto Alegre, RS

* Autor para correspondência - E-mail: robertoluisw@yahoo.com.br

² Ballagro Agro Tecnologia Ltda.

sac were collected from Valência orange leaves, and we could identify the fungi: *Penicillium*, *Trichoderma*, *Metarhizium*, *Beauveria* and *Lecanicillium*. Nine colonies of *Lecanicillium* sp collected from insects were isolated. Once the colony was isolated and identified, Koch postulate was used to prove the link between the fungus *L. longisporum* and the scale *O. praelonga*. The fungus inoculated insects showed symptoms similar to the previously observed in *Lecanicillium* sp infected insects. This fact confirmed the relation between the fungus and the disease, causing the death of 100% of the insects 10 days after inoculation.

Index terms: citrus, scale, biological control.

INTRODUÇÃO

A citricultura ocupa uma posição de destaque no Brasil pelo volume de exportação de suco concentrado, pelo comércio interno e pela importância social, empregando grande número de pessoas em sua cadeia produtiva. A produção mundial foi de cerca de 105 milhões de toneladas em 2007, sendo o Brasil responsável por cerca de 20% desta produção com aproximadamente 21 milhões de toneladas (FAO, 2009).

As pesquisas realizadas têm visado amenizar os problemas da citricultura, incluindo-se aqueles relacionados ao ataque de pragas (Mariconi et al., 1994). A cochonilha *Orthezia praelonga* Douglas, 1891 (Hemiptera, Ortheziidae), nativa da América Tropical (Gonçalves & Cassino, 1978), é considerada praga importante no Brasil desde 1954, quando foi responsável por grandes perdas na citricultura carioca (Fernandes et al., 2007). Naquela ocasião, a praga causou perdas na produção de citros estimadas entre 50 e 90% e praticamente dizimou a cultura do estado do Rio de Janeiro.

Esse inseto coloniza normalmente a face abaxial das folhas, sugando continuamente a seiva e introduzindo toxinas que provocam a desfolha, enfraquecendo a planta. Além disso, pode provocar uma queda de até 50% dos frutos produzidos, sendo que os remanescentes ficam sem sabor, com baixos teores de açúcar e ácido. Em casos mais graves, os frutos apresentam o tamanho reduzido, tornando-se imprestáveis para o comércio (Fernandes et al., 2005).

Machos e fêmeas de *O. praelonga* apresentam dimorfismo sexual. Os machos nos estádios iniciais de seu desenvolvimento são semelhantes às fêmeas, porém, na fase adulta, estes se tornam morfologicamente

diferentes destas. Apresentando um par de asas hialinas (transparentes), com uma longevidade não superior a cinco dias. Os machos apresentam comportamento de dirigirem-se ao tronco e permanecerem reunidos até transformarem-se em adultos (Carvalho et al., 1998). As fêmeas são de coloração branca, corpo ceroso e movimentos lentos, apresentando na parte superior o ovissaco. Uma fêmea de *O. praelonga* chega a viver cerca de 80 dias e pode ovipositar acima de 100 ovos por ciclo (Carvalho et al., 1998), podendo gerar outras 160 fêmeas por ano segundo Lima (1981).

Como as fêmeas não são aladas, a dispersão de *O. praelonga* pode ocorrer pelo vento, bem como pelo transporte de material de colheita (escadas e sacolas), roupas, mudas infestadas, máquinas e implementos (Carvalho, 2006).

Devido à excreção de substâncias açucaradas (*honeydew*), a infestação dessa cochonilha favorece o desenvolvimento da fumagina, provocada pelo fungo *Capnodium* sp., cujas hifas recobrem as folhas e frutos, prejudicando a respiração e a fotossíntese da planta (Cassino et al., 1991). Segundo Parra et al. (2003), esse potencial de danos faz com que essa espécie seja considerada a principal cochonilha dos citros.

O fungo *Lecanicillium longisporum* é patogênico para *O. praelonga* e ocorre sobre as diferentes fases de desenvolvimento do inseto, exceto ovo, apresentando a capacidade de aderir ao tegumento do hospedeiro, que possui grande quantidade de cera. Os conídios apresentam-se em massas globosas sobre as fiálides de disposição verticilada, condição que levou a separação do gênero *Verticillium* (Molina, 2007).

Para considerar um agente isolado patogênico e responsável por sintomas observados, as seguintes etapas enunciadas nos postulados de Kock devem ser cumpridas. Associação constante patógeno-hospedeiro,

deve ser possível o isolamento do patógeno, a inoculação do mesmo e a reprodução dos sintomas quando do reisolamento do patógeno (Bergamim Filho et al., 1995).

Na superfície do fungo *L. longisporum* existe uma substância mucilaginosa envolvendo os conídios, facilitando a adesão do patógeno à superfície do hospedeiro, seja na cutícula ou nas placas de cera, garantindo também as condições de proteção contra a dessecação. Assim, o patógeno e o hospedeiro têm mecanismos distintos para evitar a desidratação: a cera promove a proteção do hospedeiro, enquanto que a cobertura mucilagenosa protege o patógeno. Estes mecanismos são importantes na relação patógeno-hospedeiro. Na adesão, a cobertura mucilagenosa é solúvel em água e permite explorar, no microclima da superfície do hospedeiro, as condições de umidade relativa adequadas ao desenvolvimento do fungo e a solubilização das massas de conídios, disponibilizando o inóculo (Molina, 2007).

O objetivo deste trabalho foi detectar cochonilhas *O. praelonga* infectadas com *L. longisporum* e isolar esse fungo entomopatogênico para posterior multiplicação visando a obtenção de colônias puras passíveis de serem replicadas.

MATERIAL E MÉTODOS

O pomar de coleta de cochonilhas *O. praelonga* possivelmente infectadas por *L. longisporum* está localizado no município de Pirassununga, SP (21°56'S e 47°24'O). A coleta foi realizada em pomar de laranjeira da variedade Valência, com 12 anos de idade, não irrigadas e apresenta sérios problemas de manejo, principalmente no que diz respeito ao controle de pragas e doenças, oferecendo, portanto, maior possibilidade de se encontrar a ocorrência natural (epizootia) de *L. longisporum* sobre populações de *O. praelonga*.

Foram coletados ramos e folhas das laranjeiras com a presença de ninfas e adultos de *O. praelonga*. No laboratório, com auxílio de uma lupa, foram identificados insetos com algum crescimento cotonoso em seu corpo, possivelmente por motivo de infecção por fungos. Os insetos foram coletados com auxílio de pinça e agulha histológica flambadas e mergulhadas em uma solução de cloro (2%) por 30 segundos. Esse procedimento visou eliminar possíveis fungos oportunistas na superfície

do corpo dos insetos e possibilitar para a extrusão de fungos entomopatogênicos responsáveis pela morte do inseto. Em seguida os insetos foram enxaguados em água destilada e inoculados sobre meio de cultura BDA com antibiótico tetraciclina.

As placas de Petri foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura constante de 25±1°C, com fotofase de 12 horas e UR = 70±10%, por cinco dias. Os insetos que mostraram crescimentos de fungos foram observados em lupa, dos quais se preparavam lâminas para confirmação das espécies. Após isolamento e identificação da colônia empregaram-se os enunciados dos postulados de Koch para estabelecer uma relação causal entre o fungo *L. longisporum* e a cochonilha *O. praelonga*. O patógeno foi inoculado no hospedeiro vivo, mantido em plantas jovens de laranjeiras da variedade Seleta, para reprodução dos sintomas. Foram selecionadas nove plantas, uma por isolado, com cerca de 60 cm de altura, sendo escolhidas aquelas com brotações novas e sob alta infestação de *O. praelonga*. As plantas foram mantidas em vasos plásticos de 2 litros e cultivadas em telado. Os ramos foram ensacados para não ocorrer exposição a outros possíveis agentes controladores, sendo as plantas irrigadas a cada dois dias. Após 10 dias, os insetos inoculados com o patógeno foram coletados, mergulhados em solução de cloro 2%, enxaguados com água destilada e inoculados em placas de Petri com meio BDA e antibiótico para, novamente, obter-se colônias puras do fungo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados 120 insetos com formação cotonosa sobre os corpos, onde se constatou a presença de fungos do gênero *Penicillium*, *Trichoderma*, *Metarhizium*, *Beauveria* e *Lecanicillium*. Uma vez que o pomar encontrava-se com um manejo deficiente no que diz respeito ao controle de pragas e doenças, já era esperado detectar uma grande diversidade de fungos. Na procura de métodos alternativos para solucionar problemas ocasionados pelo uso não criterioso de agrotóxicos no manejo de pragas de citros, tem-se avaliado os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Metarhizium anisopliae* no controle de *O. praelonga*, sendo as ninfas de segundo e terceiro instares as mais susceptíveis aos dois primeiros patógenos (Molina, 2007). Nos

pomares de São Paulo, com pouco uso de inseticidas, há ocorrência de *Lecanicillium* sp. e *Syngliocladium* sp. com incidências variáveis para cada mês (Alves et al., 2004).

No total foram isoladas nove insetos com colônias de *Lecanicillium* sp. (Figura 1). Repicando as colônias, observou-se que o crescimento em placa de Petri com meio BDA, foi lento, exigindo cerca de quatro semanas para que tomasse toda a superfície do meio na placa. Devido a este crescimento lento e visando uma produção em larga escala, para o uso deste fungo entomopatogênico como biocontrolador de cochonilhas, seria necessária a

produção de uma massa de micélios em meio líquido para inoculação desta massa em arroz pré-cozido, permitindo a obtenção de um volume adequado e com relativa rapidez.

Visualizando em microscópio óptico foi possível identificar as estruturas do fungo (Figura 2). No crescimento de micélio a partir de um ponto separaram-se uma ou mais fiálides, com esporulações globosas na extremidade, formadas por inúmeros conídios de forma alongada unidos (Figura 3). Essas características permitiram concluir que o isolado obtido era do gênero *L. longisporum*.

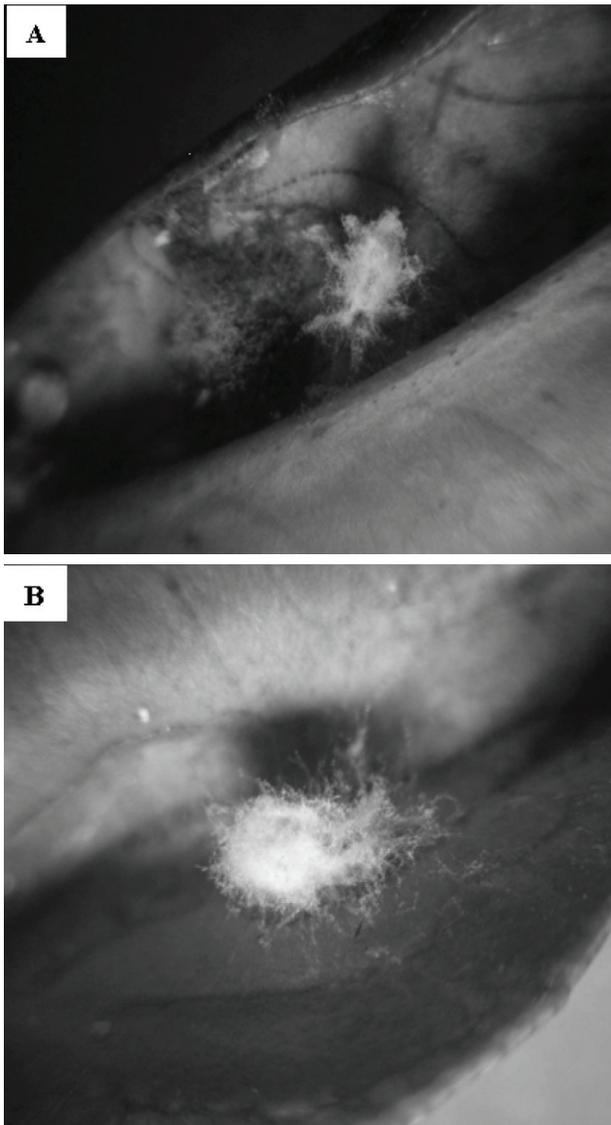


Figura 1. Cochonilhas *Orthezia praelonga* com formações cotonosas nos corpos em folhas de laranjeiras Valência, visualização em microscópio estereoscópio aumento 20x (A) e 30x (B), respectivamente.



Figura 2. Visualização em microscópio óptico (aumento 40x), das estruturas do fungo *Lecanicillium longisporum*, com crescimento de micélio separando-se de um ponto uma ou mais fiálides, com esporulações globosas na extremidade.

Das plantas com *O. praelonga*, onde foi inoculado o fungo *L. longisporum*, todos os insetos presentes morreram após 10 da inoculação. Vários indivíduos apresentavam o corpo recoberto por micélios de fungos (Figura 4). Assim verificou-se que a cera contida no inseto não bloqueou a penetração do fungo no corpo do inseto, conforme descrito por Garcia & Alves (2005). Destes insetos foi possível reisolar o fungo, confirmando assim os postulados de Koch, ou seja, o fungo *L. longisporum* isolado é patogênico a *O. praelonga* (Bergamim Filho et al., 1995).

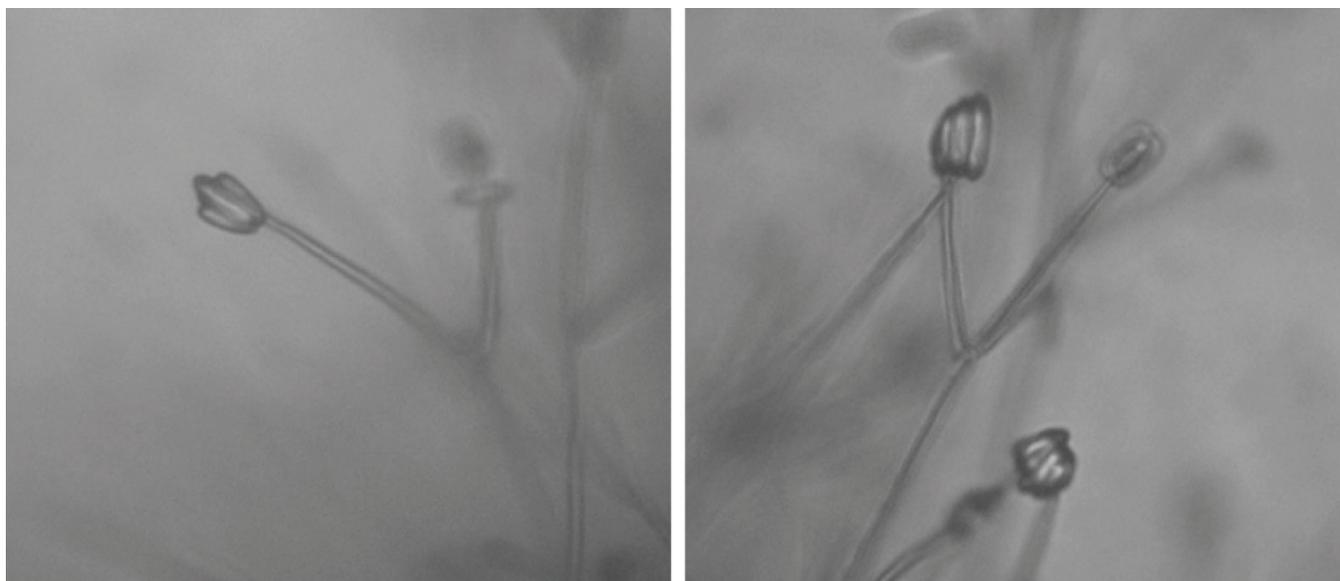


Figura 3. Estruturas do fungo *Lecanicillium longisporum*, inúmeros conídios de forma alongada unidos na extremidade dos micélios, visualização em microscópio óptico aumento (400x).

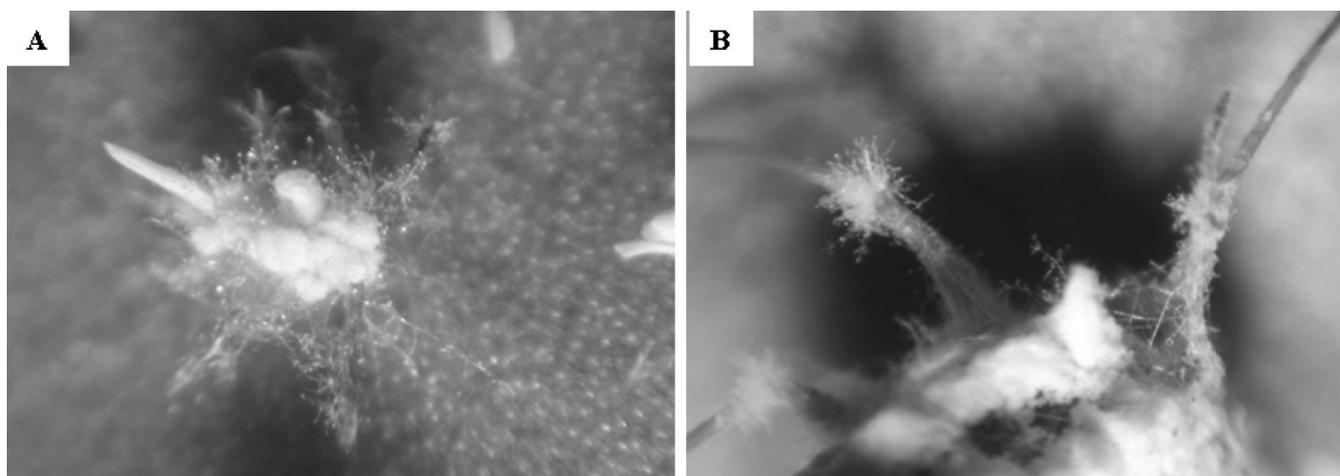


Figura 4. Cochonilhas *Orthezia praelonga* com crescimento do fungo *Lecanicillium longisporum* no corpo, após 10 dias de inoculação do fungo, visualização em microscópio estereoscópio aumento 30x (4A) e 40x (4B), respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Ao Sr. Edivaldo da Fazenda Boa Esperança pelo acesso aos pomares (Pirassununga, SP).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves SB, Humber R, Lopes RB, Tersi F & Padulla FL (2004) Ocorrência da doença “Salmão-da-ortézia” causada por um hifomiceto entomopatogênico. 20º Congresso Brasileiro de Entomologia, Gramado, RS, p.279.

Bergamin Filho A, Kimati H & Amorim L. (1995) Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. Ceres, São Paulo, v.1, 3a ed., 919p.

Carvalho R. de S. (2006) Disseminação da ortézia em pomares e hortos comerciais. Bahia Agrícola. Bahia 7(2): 22-28.

Carvalho RS, Nascimento AS & Sanches NF (1998) Controle da ortézia dos citros. Cruz das Almas-BA: EMBRAPA-CNPMP. Circular Técnica, 31. 15p.

Cassino PCR, Lima AF, Robbs CF & Racca-Filho F. (1991) *Orthezia praelonga* em plantas cítricas no Brasil. Arquivo UFRRJ 14(1): 35-57.

FAO. Agricultural Data - FAOSTAT. Online. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>. Acesso em: 15 outubro de 2009.

Fernandes FDP, Rodrigues WC, Cassino PCR, Zinger K & Spolidoro MV (2005) Flutuação populacional de *Orthezia praelonga* (Sternorrhyncha, Ortheziidae) e seus inimigos naturais em tangerina cv. Poncã em cultivo orgânico em Seropédica, RJ. Anais da XV Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ.

Fernandes AO, Carneiro TR, Campos AP, Oliveira TT & Ferreira MC (2007) Dispersão de *Orthezia praelonga* causada por equipamentos de pulverização em pomar de citros. Revista Brasileira de Fruticultura 29(2): 249-253.

Garcia MO & Alves MB (2005) Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de *Orthezia praelonga*. Laranja 26(1): 1-10.

Gonçalves CR & Cassino PCR (1978) O problema da *Orthezia praelonga* na citricultura. Anais Encontro Nacional de Citricultura, Rio de Janeiro, RJ, v.1, p.5.

Lima AF de (1981) Bioecologia de *Orthezia praelonga* Douglas, 1891 (Homoptera, Ortheziidae). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Mariconi FAM, Nass LL, Passos HR, Ciniglio Neto F, Vieira Jr FM & Campos Neto HM (1994) Scientia Agrícola 51(3): 474-480.

Molina JHG (2007) Efeito do controle microbiano em insetos sugadores em três sistemas de manejo de pragas de citros. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Parra JRP, Oliveira HN & Pinto AS (2003) Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos dos citros. Piracicaba. 140p.