

Suscetibilidade da cochonilha branca dos citros, *Planococcus citri*, a *Metarhizium anisopliae*

Gabriel Moura Mascarin^{1,2*}, Giuliano Pauli² & Rogério Biaggioni Lopes³

RESUMO

A suscetibilidade de fêmeas adultas de *Planococcus citri* aos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria farinosa*, *I. fumosorosea*, *Lecanicillium muscarium* e *L. longisporum* foi avaliada sob condições de laboratório. Os insetos foram transferidos para discos foliares de laranja doce e inoculados com as suspensões de conídios por meio de pulverização em Torre de Potter. Em seguida, os insetos foram incubados em câmara climatizada (26±1°C e 12h fotofase) por 12 dias. O fungo *M. anisopliae* (ESALQ-1037) foi patogênico a *P. citri*, causando 78% de mortalidade para fêmeas adultas e esporulação sobre todos os cadáveres. A mortalidade para os isolados das demais espécies não diferiu significativamente do controle e não foi observada colonização dos indivíduos mortos. Testes de virulência com o isolado ESALQ-1037 e com outros isolados de *M. anisopliae*, bem como a subsequente avaliação desse agente em condições de campo, devem ser conduzidos para futura recomendação de uso do patógeno pelo citricultor.

Termos de indexação: controle microbiano, fungos Hypocreales, citros, Pseudococcidae.

SUMMARY

Susceptibility of the citrus mealybug, *Planococcus citri*, to *Metarhizium anisopliae*

The susceptibility of *Planococcus citri* adult females to entomopathogenic fungi, including *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria farinosa*, *I. fumosorosea*, *Lecanicillium muscarium* and *L. longisporum* was assessed under laboratory conditions. Insects were placed on arenas made of foliar discs of sweet orange and then exposed to aqueous suspensions of conidia applied with a Potter Spray Tower. After spraying, insects were incubated in a growth chamber (26±1°C and 12h photoperiod) for 12 days. The fungus *M. anisopliae* (ESALQ-1037) was the only pathogenic to *P. citri*, causing 78% of mortality to adult females along with conidiogenesis in all cadavers. The other fungal isolates were not pathogenic to *P. citri*, since they did not cause mortality significantly different from that of the control, and either colonized cadavers were not observed. Further virulence tests with ESALQ-1037 and other isolates of *M. anisopliae* along with the subsequent evaluation of this agent under field conditions should be carried out for the establishment of a future strategy of application of this entomopathogen by citrus growers.

Index terms: microbial control, Hypocreales fungi, citrus, Pseudococcidae.

¹ Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO 462 km 12, CP 179, 75375-000, Santo Antonio de Goiás, GO

* Autor para correspondência - gmmascar@gmail.com

² Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP. Av. Pádua Dias, CP 9, 13418-900, Piracicaba, SP

³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, W5 Norte (final) 70770-917, Brasília, DF

O desequilíbrio biológico causado pelo uso indiscriminado de agrotóxicos não seletivos na cultura dos citros e a subsequente eliminação dos inimigos naturais vêm favorecendo a ocorrência frequente de surtos populacionais de pragas antes consideradas secundárias, as quais provocam danos consideráveis em pomares comerciais de laranja no Brasil (Alves, 2004; Franco et al., 2004). A constatação recente de altas infestações da cochonilha branca, *Planococcus citri* (Risso, 1813) (Hemiptera: Pseudococcidae), em alguns pomares citrícolas no Estado de São Paulo é a prova desse cenário, representando uma séria ameaça aos produtores da região. Esse desequilíbrio biológico já foi observado para outros sistemas agrícolas com pulgões, cochonilhas e moscas brancas (DeBach & Rose, 1977).

Planococcus citri tem preferência por climas mais úmidos e seu ataque ocorre desde as raízes, troncos, galhos, folhas até frutos de citros, além de possuir um amplo espectro de hospedeiros alternativos (Ben-Dov, 1994). O inseto ocasiona desfolha, descoloração, deformação e queda dos frutos, além dos danos indiretos causados pela formação da fumagina (*Capnodium* sp.) (Santa-Cecília et al., 2007). Elevadas infestações da praga podem resultar em 80% de desfolha e 100% de queda de frutos (Kerns et al., 2002). O controle de *P. citri* praticado apenas com inseticidas químicos é insustentável a médio e longo prazo, em virtude do potencial dessa praga em desenvolver resistência a diferentes grupos químicos (Flaherty et al., 1982). Ainda, existe a dificuldade desses produtos químicos em agir sobre o inseto, que geralmente fica abrigado na planta, e apresenta uma cobertura cerosa sobre seu corpo (Demirci et al., 2011a). Essa praga apresenta ciclo de vida curto e alta capacidade reprodutiva, sendo capaz de aumentar rapidamente sua população na ausência de seus inimigos naturais (Franco et al., 2004). Entretanto, é comum a presença de parasitoides e predadores que regulam a população dessa praga e que contribuem para manter sua população em equilíbrio no agroecossistema cítrico (Afifi et al., 2010), especialmente quando não influenciados pelo uso descontrolado de produtos químicos na cultura.

Poucos são os relatos na literatura sobre a ocorrência natural e a patogenicidade de fungos sobre *P. citri*, limitando-se a estudos de laboratório. Na Austrália, por exemplo, a patogenicidade de isolados

de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* foi testada sobre ninfas de 2º instar de *P. citri* em condições de laboratório, destacando-se como o mais virulento um isolado do primeiro fungo (Cannard & Spooner-Hart, 2002). Um isolado de *Isaria farinosa* também vem sendo estudado para o controle dessa cochonilha na Turquia, mostrando-se bem infectivo a ovos, ninfas e adultos desse inseto sob condições de laboratório (Demirci et al., 2011a, 2011b). Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* são as espécies mais utilizadas no mundo como micopesticidas (Faria & Wraight, 2007) e apresentam uma ampla diversidade de isolados para uso no controle biológico de pragas. Dada a importância econômica de *P. citri* para a citricultura e outras espécies vegetais, associada à escassez de informações sobre o uso de fungos para seu controle, o presente trabalho objetivou avaliar a patogenicidade de seis espécies de fungos entomopatogênicos sobre fêmeas adultas de *P. citri* em condições de laboratório.

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Artrópodes, localizado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq/USP), em Piracicaba, SP. Os fungos utilizados no bioensaio foram obtidos do banco de entomopatógenos do laboratório, os quais se encontram preservados na forma de conídios e micélio liofilizados a -40°C . As espécies de fungos testadas foram: *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *I. farinosa*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium muscarium* e *L. longisporum* (Tabela 1).

Os conídios foram produzidos em placas de Petri (9 cm \times 2 cm) contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA: 200 g batata + 5 g dextrose + 15 g ágar) por um período de 10 dias a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12 h de fotofase. A suspensão de conídios foi preparada por meio da mistura dos conídios raspados da superfície do meio em 10 mL de água destilada estéril com espalhante-adesivo Tween[®] 80 a 0,01%. Essa suspensão original foi vigorosamente agitada em vórtex por dois minutos e, posteriormente, colocada em banho ultrassom por um minuto. Em seguida, a suspensão foi filtrada através de uma camada dupla de tecido *voile* (porosidade de 30 μm) para remover fragmentos de micélio, diluída e o número de conídios determinado por meio de contagem em câmara de Neubauer. A concentração padrão testada foi de 1×10^8 conídios mL^{-1} para cinco das espécies fúngicas testadas, enquanto que somente o isolado

Tabela 1. Procedência dos isolados de fungos entomopatogênicos utilizados no teste de patogenicidade a fêmeas adultas de *Planococcus citri*.

Espécie	Código do isolado	Classificação taxonômica	Hospedeiro	Procedência
<i>Beauveria bassiana</i>	ESALQ -447	Ascomycota: Cordycipitaceae	<i>Solenopsis invicta</i>	Cuiabá-MT
<i>Isaria farinosa</i>	ESALQ-1205	Ascomycota: Cordycipitaceae	<i>Bemisia tabaci</i>	Santa Fé do Sul-SP
<i>Isaria fumosorosea</i>	ESALQ-1296	Ascomycota: Cordycipitaceae	<i>Bemisia tabaci</i>	Jaboticabal-SP
<i>Lecanicillium longisporum</i>	ESALQ-1300	Ascomycota: Cordycipitaceae	<i>Praelongorthezia praelonga</i>	Bebedouro-SP
<i>Lecanicillium muscarium</i>	ESALQ-972	Ascomycota: Cordycipitaceae	<i>Coccus viridis</i>	Piracicaba-SP
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ-1037	Ascomycota: Clavicipitaceae	<i>Solenopsis invicta</i>	Porto Alegre-RS

ESALQ-1205 (*I. farinosa*) teve concentração de $2,6 \times 10^7$ conídios mL⁻¹, devido à baixa produção de conídios em meio de cultura. O controle foi composto apenas de solução estéril de Tween® 80 a 0,01%. Para determinar a viabilidade inicial dos conídios, uma diluição contendo 1×10^6 conídios mL⁻¹ foi plaqueada em meio BDA e incubada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ com 12 h fotofase. Após 24 h de incubação, todos os isolados apresentaram germinação superior a 90%.

A partir de uma colônia estoque de *P. citri*, mantida em abóbora Kabocha (*Cucurbita maxima* L.) sob condições controladas ($27 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $\geq 50\%$ e 12 h fotofase), fêmeas adultas com idade de um a três dias após emergência foram transferidas para discos foliares de citros (3,0 cm de diâmetro) de laranja Pêra [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], cujas folhas foram previamente desinfetadas com detergente neutro e, em seguida, cortadas com vazador metálico. Esses discos foliares foram inseridos, individualmente, com a face abaxial voltada para cima no interior de placas acrílicas (5,0 cm diâmetro x 1,5 cm altura), contendo uma solução de 8 mL de ágar-água (2%) solidificada no fundo. Para garantir a fixação da folha ao ágar, foi confeccionada uma borda com 2 mL de ágar-água (2%), delimitando uma arena de confinamento para os insetos [metodologia adaptada de Rossi-Zalaf & Alves (2006)].

Cada tratamento foi composto por nove repetições de oito fêmeas, totalizando 72 insetos por tratamento. Uma vez confeccionada, as arenas contendo os

insetos foram pulverizadas com 2 mL da suspensão de conídios, utilizando uma Torre de Potter (0,7 kg cm⁻²) (Burkhard® Manufacturing, Rickmansworth, England), gerando uma cobertura de 0,2 $\mu\text{L cm}^{-2}$. As arenas foram mantidas à temperatura ambiente para secar por alguns minutos e, posteriormente, transferidas para câmara climatizada a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 h de fotofase. No interior das placas fechadas contendo as arenas, a UR foi superior a 90%. Após 12 dias de incubação, a mortalidade acumulada dos insetos foi registrada e, quando possível, confirmada observando-se o crescimento e conidogênese dos fungos sobre os cadáveres. O experimento seguiu um delineamento inteiramente aleatorizado contendo sete tratamentos e nove repetições. Os dados se enquadraram nas exigências do modelo paramétrico (homocedasticidade) e, portanto, foram submetidos à análise de variância (*one-way* ANOVA). Em seguida, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), usando o programa estatístico SAS 9.2 (SAS, 2008).

O isolado ESALQ-1037 de *M. anisopliae* ocasionou aproximadamente 78% de mortalidade de fêmeas ($F = 9,51$; $gl = 6, 56$; $P < 0,0001$; Figura 1). Observou-se a completa colonização dos cadáveres e 100% de esporulação em todos os indivíduos mortos. Os sintomas da infecção se manifestaram a partir do quinto dia após sua inoculação, quando os insetos adquiriram coloração amarelada e se tornaram mumificados (endurecidos). A esporulação de *M. anisopliae* foi verificada ao sétimo dia

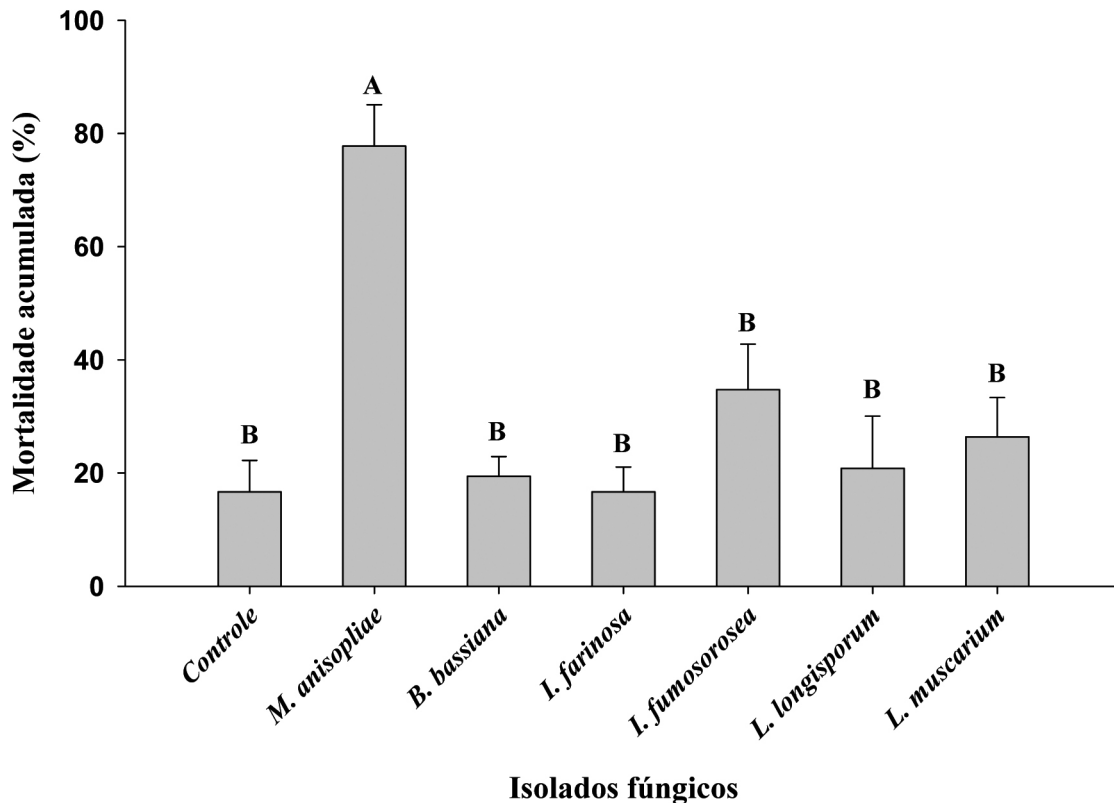


Figura 1. Patogenicidade de diferentes espécies de fungos, expressa em % mortalidade acumulada (média±EP), a fêmeas de *Planococcus citri* sob condições de laboratório (26±1°C e 12 h fotofase) após 12 dias da inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey HSD, ao nível de 1% de probabilidade.

após a inoculação, com a produção de uma massa verde de conídios sobre o tegumento dos cadáveres colonizados. Os isolados de *B. bassiana* (ESALQ-447), *I. fumosorosea* (ESALQ-1296), *L. longisporum* (ESALQ-1300) e *L. muscarium* (ESALQ-972) na concentração de 1×10^8 conídios mL⁻¹ proporcionaram mortalidades médias inferiores a 35% e não diferiram da mortalidade do controle ($P > 0,05$). Além disso, não foram observados sinais de colonização dos cadáveres pelos fungos. A espécie *I. farinosa* (ESALQ-1205) também não foi patogênica na concentração de $2,6 \times 10^7$ conídios mL⁻¹.

Metarhizium anisopliae já foi relatado infectando mais de cem espécies de insetos pertencentes a várias ordens, provavelmente em função da sua grande diversidade genética e ampla distribuição geográfica (Zimmermann, 1993). A maioria dos estudos de suscetibilidade de outras cochonilhas do mesmo grupo a isolados de *Metarhizium* tem sido conduzida tam-

bém sob condições de laboratório (Ujjan & Shahzad, 2007; Banu et al., 2010). O presente estudo relata pela primeira vez a patogenicidade do fungo *M. anisopliae* sobre fêmeas adultas de *P. citri*. Cannard & Spooner-Hart (2002) também demonstraram que apenas um isolado de *M. anisopliae* proporcionou maior virulência a ninfas de 2º instar de *P. citri*, corroborando com os resultados obtidos nesse estudo para fêmeas adultas do inseto. Além disso, uma das vantagens desta ação de *M. anisopliae* sobre fêmeas adultas de *P. citri* pode estar relacionada à redução da sua fecundidade. Entretanto, isso precisa ser comprovado em trabalhos futuros.

O conhecimento da atividade patogênica de isolados de *M. anisopliae* aponta para a possibilidade de um rápido desenvolvimento de micoinseticidas destinados ao controle da cochonilha, já que produtos à base de *M. anisopliae* e seu uso estão amplamente difundidos no país (Alves et al., 2008; Li et al., 2010).

Novos estudos devem ser realizados a fim de avaliar a virulência de outros isolados de *M. anisopliae* em diferentes doses de aplicação e formulações apropriadas que contribuam para aumentar a eficácia do entomopatógeno, protegendo o propágulo fúngico de fatores abióticos adversos em condições de campo.

REFERÊNCIAS

- Affi AI, El Arnaouty SA, Attia AR & Abd Alla Ael-M (2010) Biological control of citrus mealybug, *Planococcus citri* (Risso) using coccinellid predator, *Cryptolaemus montrouzieri* Muls. Pakistan Journal of Biological Sciences 13(5): 216-22.
- Alves SB (2004) O controle microbiano sustentável de ácaros em citros. Visão Agrícola 1(2): 87-89.
- Alves SB, Lopes RB, Vieira SA & Tamai MA (2008) Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: Controle Microbiano de Pragas na América Latina, eds. S.B. Alves, R.B. Lopes, FEALQ, Piracicaba, 69-110.
- Banu JG, Surulivelu T, Amutha M & Gopalakrishnam N (2010) Laboratory evaluation of insecticides and biopesticides against *Phenococcus solenopsis* and *Paracoccus marginatus* infesting cotton. Journal of Biopesticides 3(1): 343-346.
- Ben-Dov Y (1994) A systematic catalogue of the mealybugs of the world (Insecta: Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae and Putoidae) with data on geographical distribution, host plants, biology and economic importance. Andover: Intercept. 686 p.
- DeBach P & Rose M (1977) Environmental upsets caused by chemical eradication. California Agriculture 31:8-10.
- Cannard M & Spooner-Hart R (2002) Pathogenicity of water and oil based suspensions of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to citrus mealybug, *Planococcus citri* (Risso) (Hemiptera: Pseudococcidae) General and applied entomology 31: 75-79.
- Demirci F, Muşter M, Kaydan MB & Ülgentürk S (2011a) Laboratory evaluation of the effectiveness of the entomopathogen; *Isaria farinosa*, on citrus mealybug, *Planococcus citri*. Journal of Pest Science 84(3): 337-342.
- Demirci F, Muşter M, Kaydan MB & Ülgentürk S (2011b) Effects of some fungicides on *Isaria farinosa*, and in vitro growth and infection rate on *Planococcus citri*. Phytoparasitica 39:353-360.
- Faria MR de & Wraight SP (2007) Mycoinsecticides and Mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types, Biological Control 43: 23-256.
- Flaherty DL, Peacock WL, Bettiga L & Leavitt GM (1982) Chemicals losing effect against grape mealybug. California Agriculture 36:15-16.
- Franco JC, Suma P, da Silva EB, Blumberg D & Mendel Z (2004) Management strategies of mealybug pests of citrus in mediterranean countries. Phytoparasitica 32(5): 507-522.
- Kerns D, Wright G & Loghry J (2002) Citrus arthropod pest management in Arizona. Cooperative Extension. IPM series, number X. Arizona Citrus Research Council. Tucson: The University of Arizona. Disponível em: <<http://www.azda.gov/CDP/NewCBC/ACRC/ACRC2002Research/2002-05.pdf>>. Acesso em: 27 fev. 2011.
- Li Z, Alves SB, Roberts DW, Fan M, Delalibera Jr I, Tang J, Lopes RB, Faria M & Rangel DEN (2010) Biological Control of Insects in Brazil and China: History, Current Programs and Reasons for their Successes Using Entomopathogenic Fungi. Biocontrol Science and Technology 20: 117-136.
- Rossi-Zalaf LS & Alves SB (2006) Suscetibility of *Brevipalpus phoenicis* to entomopathogenic fungi. Experimental Applied Acarology 40:37-47.
- SAS Institute Inc. (2008) SAS/STAT®, release 9.2 User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.
- Santa-Cecília LVC, Souza B, Souza JC, de Prado E, Moino Junior A, Fornazier MJ & Carvalho GA (2007) Cochonilhas-farinhas em cafeeiros: bioecologia, danos e métodos de controle. Belo Horizonte: Epamig, p.48. (Epamig. Boletim Técnico, 79).

Ujjan AA & Shahzad S (2007) Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var *acridum* strains on Pink Hibiscus mealy bug (*Macronellicoccus hirsutus*) affecting cotton crop. Pakistan Journal of Botony 39(3): 967-973.

Zimmermann G (1993) The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. Pesticide Science 37:375-379.

Recebido: 31/03/2011 - Aceito: 24/04/2012
(CRT 039-11)