



IDENTIFICAÇÃO DE PREDADORES DE *APHIS SPIRAECOLA* (PATCH, 1914)(HEMIPTERA: APHIDIDAE) ATRAVÉS DA SEROLOGIA

F. M. Costa (1)

C. R. Sousa - Silva (2)

(1) Programa de Pós - graduação em Ecologia e Recursos Naturais/ Universidade Federal de São Carlos/SP - Brasil. mfm-costa1@zipmail.com.br

(2) Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva. Universidade Federal de São Carlos/SP - Brasil. Rodovia Washington Luís, Km 235 São Carlos, São Paulo, Brasil, CEP 13565 - 905.

INTRODUÇÃO

A citricultura é uma das mais importantes atividades agrícolas no Brasil, sendo a sua produção voltada especialmente para a exportação de suco concentrado, gerando divisas que ultrapassam 1 bilhão de dólares/ano (Neves *et al.*, 2003). A produção brasileira ultrapassa 20 milhões de toneladas, tendo como principal pólo produtor o Estado de São Paulo, com quase 80% da produção nacional de frutos cítricos (IBGE, 2005). A cultura de citros (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) é alvo constante de inúmeras pragas e doenças, que encontrando condições favoráveis ao seu desenvolvimento são capazes de causar danos irreversíveis. Entre as diversas espécies de insetos que podem ocasionar prejuízos econômicos à citricultura encontram - se os afídeos (Hemiptera: Aphididae). Esses hemípteros podem causar danos diretamente pelo depauperamento da planta, motivado pela sucção contínua da seiva e enrolamento das folhas. Os danos indiretos são motivados pela transmissão de vírus às plantas (Ilharco, 1992; Nault, 1997).

Dados compilados por Sousa - Silva & Ilharco (1995) mostram que, no Brasil, as plantas cítricas são colonizadas pelos seguintes afídeos: *Aphis spiraecola* (Patch, 1914), *Aphis gossypii* (Glover, 1887), *Toxoptera aurantii* (Boyer de Foscolombe, 1841) e *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907).

A maior ameaça à citricultura brasileira, ocorreu em 1937 com o aparecimento do vírus da “tristeza dos citros”, que praticamente eliminou 10 milhões de plantas enxertadas em laranja “Azeda,” atrasando o desenvolvimento da citricultura brasileira em mais de uma década. Seu patógeno é o Citrus Tristeza Virus-CTV, tendo como principal vetor o afídeo *T. citricidus*, entretanto, as espécies de afídeos *T. aurantii*, *A. gossypii* e *A. spiraecola*, podem transmitir - lo às plantas de modo semipersistente (Blackman & Eastop, 1984; Hughes & Gottwald, 1999; Whiteside *et al.*, 1993). Atualmente a morte súbita dos citros (MSC) foi diagnosticada em pomares citricolas de Minas Gerais e São Paulo,

trazendo enormes prejuízos aos citricultores, e apresentando aspectos semelhantes aos da ‘tristeza dos citros’. Em relação à etiologia desta doença, informações epidemiológicas sobre a MSC, indicam a existência de vetores aéreos, provavelmente afídeos. Pesquisas recentes indicaram *A. gossypii* e *A. spiraecola*, como os principais vetores envolvidos com essa doença. Pelo tipo de alastramento da doença nos pomares e pelos aspectos semelhantes ao CTV, *T. citricidus* também é apontado como um dos possíveis vetores envolvidos na disseminação da ‘MSC’ nos pomares (Fundecitrus, 2005).

Os prejuízos que grandes populações de afídeos podem provocar nas culturas levam os agricultores a utilizar produtos fitofarmacêuticos visando - se garantir uma melhor produção. O uso de inseticidas químicos tornou - se extremamente difícil no controle de afídeos devido à resistência destes aos inseticidas, particularmente organofosforados, carbamatos e piretróides (Delorme, 1996), enquanto os seus inimigos naturais são eliminados (Ilharco, 1992) e como grande consequência: a contaminação sistêmica por químicos.

O conhecimento não só da praga como também da fauna auxiliar torna - se essencial para diminuir a utilização de meios químicos que podem quebrar equilíbrios biológicos existentes e imprescindíveis para a limitação natural.

O reconhecimento desses agentes controladores é realizado, principalmente, através da observação direta. Diversos autores têm utilizado a serologia, como complemento à observação direta, para a determinação de relações alimentares entre presa e predador (Dempster, 1960; Titova, 1970; Lund & Turpin, 1976; Gorayeb & Pinger 1978; Mciver, 1981; Sousa - Silva, 1990, Serrão *et al.*, 1997; Cas-saro - Silva *et al.*, 2001). Essa técnica baseia - se na possibilidade de reações específicas entre um antissoro, obtido para a presa que se deseja investigar e antígenos obtidos pela maceração de possíveis predadores capturados no campo.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de um antissoro específico para *A. spiraecola* e a sua utilização na determinação de seus predadores.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de Entomologia do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

A. spiraecola foi utilizado como antígeno na produção de antissoro específico. Os afídeos foram coletados diretamente em plantas de citros na Propriedade Agrícola Terra Roxa, localizada entre as coordenadas: 21° 47' 144" S e 47° 55' 426" W e 710 m de altitude, no município de São Carlos-SP.

Em cada coleta as plantas eram examinadas ao acaso e as folhas jovens e ramos apicais infestados com o afídeo eram seccionados e armazenados em frascos para posterior triagem em laboratório. A triagem foi realizada sob microscópio estereoscópico para a comprovação da espécie.

- Preparo do antígeno (Ag) -

Amostras de ápteros de *A. spiraecola* foram maceradas em presença de solução salina (0,75%) e centrifugadas a 6000g durante 5 min. Os sobrenadantes, emulsionados com Adjuvante Freund completo (v/v), foram utilizados como antígenos imunizantes (Ag - As).

- Esquemas de imunizações e sangrias para a obtenção do antissoro para *A. spiraecola* (As - As) -

Imunizou - se um coelho, com uma dose de 3,0 ml do antígeno Ag - As, na região do linfonóculo (Oliveira, 1975). Antes da primeira inoculação, recolheu - se uma amostra de sangue do coelho para ser utilizada como controle (C) nas reações serológicas. Após a inoculação realizou - se uma sangria semanal no animal, durante três semanas. As sangrias foram realizadas através de cortes longitudinais na veia marginal da orelha do animal, recolhendo - se, em média, 10ml de sangue em um frasco de vidro. O sangue foi mantido em repouso por 2 horas em temperatura ambiente (23° C), posteriormente, em geladeira (4° C) por 24 horas. O coágulo formado no frasco foi descartado, e o antissoro armazenado em congelador a - 20° C, para uso posterior nos testes serológicos.

- Testes Serológicos -

Foram efetuados testes serológicos homólogos e heterólogos, através da técnica de dupla difusão em ágar a 1% (Ouchterlony, 1958), em tampão PBS 0,01 M, pH 7,0 (Hofling, 1975) sobre lâminas para microscopia (3,0 ml de solução de ágar por lâmina de 75x25 mm). Os testes serológicos homólogos foram realizados entre os antissoros para *A. spiraecola* (As - As.) e antígenos obtidos de extratos salinos, dos respectivos macerados de formas jovens e adultas de *A. spiraecola*. Os testes serológicos heterólogos foram realizados entre o As - As e antígenos obtidos pela maceração de prováveis artrópodes predadores do afídeo, coletados no campo.

RESULTADOS

Os testes serológicos homólogos mostraram reações positivas 7 dias após a primeira inoculação do antígeno no coelho, permitindo observar duas linhas de precipitação. Sousa - Silva *et al.*, (1990), Serrão *et al.*, (1997), Cassaro - Silva *et al.*, (2001) utilizando a serologia para o estudo de predadores de pragas agrícolas também realizaram inoculações via linfonóculo, e observaram resultados positivos, logo após sete dias da primeira inoculação do antígeno no coelho.

Um máximo de duas linhas foi observado nas reações com os antissoros obtidos na 2a e 3a sangrias, respectivamente, aos 14 e 28 dias após a primeira inoculação. O título do antissoro foi de 32. Este resultado pode ser considerado baixo quando comparado com o obtido por Titova (1970) para um antissoro contra *Eurigaster integriceps* Put (Heteroptera: Scutelleridae). A autora obteve título de 10.000 após repetidas injeções do antígeno em coelho. Entretanto, como observou, esse título elevado acarretou perda da especificidade do antissoro produzido o que possibilitou o aparecimento de reações cruzadas em testes com insetos do mesmo gênero. Dempster (1960) também enfatiza que antissoros com altos títulos podem levar ao aparecimento de reações cruzadas.

No campo, os testes serológicos heterólogos foram positivos para alguns coccinelídeos: *Cycloneda sanguinea sanguinea* (Linnaeus, 1763), *Harmonia axyridis* (Pallas), *Hippodamia convergens* Guerin - Meneville; alguns heterópteros (Heteroptera) e aranhas (Araneae), estes ainda não identificados. Estes resultados demonstram a funcionalidade dos testes serológicos como complemento na determinação de predadores de *A. spiraecola* em citros.

CONCLUSÃO

É possível obter - se antissoro específico para *A. spiraecola*. Imunização via linfonóculo respondeu rapidamente à produção de antissoro. No campo, o antissoro produzido foi capaz de detectar predadores de *A. spiraecola*.

Agradecimentos: A CAPES, pela bolsa de doutorado concedida ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS

- Blackman, R. L. & V. F. Eastop. 1984.** Aphids on the World's Crops: An identification guide. Wallingford, CAB INTERNATIONAL, 986 p.
- Cassaro - Silva, M.; J. E. Serrão, Sousa - Silva, C. & J. M. Pacheco. 2001.** Identificação de predadores de *Orphulella punctata* (de Geer) (Orthoptera: Acrididae) através da serologia. *Revta. Bras. Zool.* 18 (1): 75 - 79.
- Delorme, R. 1996.** Résistance aux insecticides chez les pucerons. *PHM Revue Horticole* 369: 29 - 33.
- Dempster, J. P. 1960.** A quantitative study of the predators on the eggs and larvae of the broom beetle *Phytodecta olivacea* Forster, using the precipitin test. *J. Anim. Ecol.* 29: 149 - 167.
- Fundecitrus. 2005.** *Pragas e doenças dos citros.* Disponível em www.fundecitrus.com.br

- Gorayeb, I.S. & C.R. Pinger. 1978.** Detecção de predadores naturais das larvas de *Simulium fulvotum*, Cerq. e Mello, 1968. (Diptera: Nematocera). *Acta Amazon. 8 (4)*: 629 - 637.
- Hofling, J. F. 1975.** *Reações serológicas com antígenos presentes em sementes de C. arábica L.* Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia UNICAMP. 45 p.
- Hughes, G. & T. R. Gottwald. 1999.** Survey methods for assessment of citrus Tristeza virus incidence when *Toxoptera citricidus* (Homoptera: Aphididae) is the predominant vector. *Phytopathol. 89*: 487 - 494.
- Ilharco, F. A. 1992.** *Equilíbrio ecológico de afídeos.* Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 300p.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2005.** Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em: www.ibge.gov.br.
- Lund, R.D. & F.T. Turpin. 1976.** Serological investigation of black cutworm larval consumption by ground beetles. *Ann. Entomol. Soc. Amer. 70*: 322 - 324.
- Mciver, D.J. 1981.** An examination of the utility of the precipitation test for the evaluation of arthropod predator - prey relationship. *Can. Entomolol. 113*: 213 - 222.
- Nault, L. R. 1997.** Arthropod transmission of plant Viruses: a new synthesis. Arthropods in Relation to plant disease. *Annals of the Entomological Society of America 90*: 521 - 541.
- Neves, E. M., L. Rodrigues, M. Dayoub & D. S. Dragone. 2003.** Citricultura: geração de divisas ao plano real. Bebedouro: Coopercitrus, 2003, p.16 (Coopercitrus informativo Agropecuário, 2003).
- Oliveira A. R., 1975.** Considerações sobre antíssoros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonódulo. *Summa Phytopathol. 1*: 61 - 64.
- Ouchterlony, O. 1958.** Diffusion in gel methods for immunological analysis. IN: S. GARGER (ED). *Progress in allergy.* New York, Plenum Press. P 1 - 78.
- Serrão, J.E., M. Silva, C.R. Sousa - Silva & J. M. Pacheco. 1997.** Uso de serologia na identificação de predadores de *Orphulela punctata* (de Geer) (Orthoptera: Acrididae). *An. Soc. Entomol. Brasil 26*: 375 - 378.
- Sousa - Silva, 1990.** Serologia aplicada à determinação de predadores de *Deois flavopicta* (Stal, 1854) (Homoptera: Cercopidae). *An. da Soc. Entomol. Brasil 19 (1)*: 133 - 138.
- Sousa - Silva, C. R. & F. A. Ilharco. 1995.** *Afídeos do Brasil e suas plantas hospedeiras.* Ed. UFSCar, 85p.
- Titova, E. V. 1970.** Use of precipitin test in a study of interrelationship between *Eurygaster integriceps* Put (Hemiptera: Scuteleridae) and predatory arthropods. *Entomol. Rev., 49 (2)*: 155 - 162.
- Whiteside, J. O.; S. M. Garnsey & L. W. Timmer. 1993.** (Ed.) *Compendium of Citrus Diseases.* 2. ed. St. Paul: APS Press. 80p.