

AVANÇOS NOS ESTUDOS DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE COCHONILHAS-FARINHENTAS (PSEUDOCOCCIDAE) EM PLANTAS DE CAFÉ

Lenira Viana Costa Santa-Cecília²; Ernesto Prado³; Ana Luiza V. de Sousa⁴; Flávia V. S. Cecília⁵

¹ Pesquisa financiada pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café - CBP&D/Café

² Pesquisadora, D.Sc., IMA/EPAMIG-URESM-EcoCentro, Lavras-MG, Bolsista FAPEMIG; scecilia@epamig.ufla.br

³ Pesquisador Visitante, D.Sc., EPAMIG/FAPEMIG, Lavras-MG, epradoster@gmail.com

⁴ Acadêmica, Centro Universitário de Lavras-UNILAVRAS, anhalu04@yahoo.com.br

⁵ Mestranda, UNIFAL-MG, Alfenas-MG, flascecilia@hotmail.com

RESUMO: Os estudos do comportamento alimentar de insetos sugadores fornecem informações sobre as atividades que ocorrem no momento da inserção dos estiletos no interior dos tecidos da planta, cujo conhecimento tem-se mostrado importante nos estudos de resistência e de transmissão de viroses. Muitos aspectos do comportamento alimentar das cochonilhas-farinhentas são ainda desconhecidos. Assim, este trabalho objetivou conhecer o processo de inserção dos estiletos da cochonilha *P. citri* e correlacionar os padrões alimentares obtidos mediante a técnica de “Electrical Penetration Graphs”, EPG com as atividades biológicas e a localização dos estiletos dentro do tecido vegetal em plantas de café. Foram realizados registros da alimentação das cochonilhas com períodos variáveis de 1 a 16 horas. Durante o período de monitoramento eletrônico (EPG) o tecido vegetal foi seccionado cuidadosamente, junto ao aparato bucal das cochonilhas. Em seguida o tecido foi seccionado mediante um micrótomo e os cortes coloridos com Safrablau. Após a montagem em lâminas, as preparações foram observadas em microscópio. A salivação das cochonilhas foi estudada em meio artificial, utilizando dieta contendo água com açúcar (10%) sobre uma lâmina com cavidade e coberta por Parafilm®. As cochonilhas foram colocadas sobre a membrana por 24 horas, e posteriormente, o interior do líquido foi inspecionado com lupa e microscópio. O segundo método utilizou placas de Petri com ágar-água deixando as cochonilhas diretamente sobre o substrato e observando-as com lupa. Os resultados do monitoramento eletrônico e os cortes histológicos indicam que a inserção do aparato bucal segue uma rota intercelular. Durante os padrões ‘N’ e ‘C’ (caminhamento) os estiletos se encontram no mesófilo foliar. Apesar do estilete estar localizado no mesmo tecido, a atividade da cochonilha é diferente, o que se demonstra pelo distinto padrão encontrado no monitoramento eletrônico. A inserção dos estiletos de *P. citri* em dieta artificial apresenta salivagens principais a intervalos regulares que diminuem em intensidade, e intercaladas por outras menores; todas elas formam a bainha salivar e correspondem às ondas ‘B’ nos estudos de EPG.

Palavras-Chave: Cochonilha-branca, Pseudococcidae, Alimentação, EPG, Salivação, histologia.

ADVANCES ON THE MEALYBUG (PSEUDOCOCCIDAE) PROBING BEHAVIOUR STUDIES IN COFFEE PLANTS

ABSTRACT: Probing behaviour studies of sucking insects show the stylet penetration into the plant tissues. Its knowledge has been important for plant resistance and virus transmission studies. Many aspects of the mealybug probing behaviour are still unknown. This work aims to know the stylet penetration of the Citrus Mealybug and correlate the waveforms obtained by means of the ‘Electrical Penetration Graphs, EPG’ with biological activities and with the stylet location inside coffee plant tissues. The recordings lasted between 1 and 16 hours. During the ‘EPG’ recording the plant tissue and the stylet were gently sectioned by means of a hand microtome and then stained with Safrablau. They were mounted on slides and observed under microscope. The mealybug salivation was studied in artificial diet, sucrose solution at 10%, kept inside a concave slide and covered with a Parafilm® membrane. The mealybugs were kept on the membrane for 24 hours and then the content inside the solution was examined under microscope through the inverted slide. A second method was essayed by using a mixture of water-agar, maintaining the insects directly on the substrat and observing directly under a stereomicroscope. The results of the probing behaviour and the histological studies indicated that the stylet follows an intercellular path. During the patterns called ‘N’ and ‘C’ (stylet pathway) the stylets are located in the mesophyll. Despite the stylet is located in the same tissue, the activity in during the patterns should differ due to the different waveforms. The salivation inside the membrane showed strong saliva secretion at regular intervals and diminishing in intensity, with other minor secretion between the main ones, both forming the salivary sheath and corresponding to the ‘B’ waves obtained during the ‘EPG’ recording.

Key words: Citrus mealybug, Pseudococcidae, probing behaviour, EPG, salivation, histology.

INTRODUÇÃO

As cochonilhas-farinhentas (Hemiptera, Pseudococcidae) são insetos sugadores de seiva, e se constituem em pragas de diversas plantas cultivadas, entre elas, o cafeeiro *Coffea* spp. (Santa-Cecília et al., 2007). A alimentação desses insetos ocorre com a inserção dos estiletes nos tecidos da planta, para posteriormente atingirem o floema, onde se alimentam (Santa-Cecília, 2003). Assim, a interação entre a cochonilha e a planta hospedeira ocorre principalmente ao nível de tecidos da planta. Para encontrar os tubos crivados os estiletes devem percorrer parte dos tecidos da planta onde ocorrem importantes interações entre ambos os organismos.

O comportamento alimentar de insetos sugadores tem sido estudado principalmente em pulgões mediante a técnica de Electrical Penetration Graphs (EPG) que indica a posição do aparato bucal no interior dos tecidos e a atividade biológica do inseto (Tjallingii, 1988). Em cochonilhas-farinhentas o conhecimento é incipiente, sendo essas informações importantes para estudos da interação inseto-planta, resistência de plantas, transmissão de viroses e movimentação de inseticidas sistêmicos. A correlação do comportamento alimentar obtida mediante a técnica de EPG com microscopia tem sido amplamente desenvolvida em pulgões, porém nada é conhecido com relação às cochonilhas-farinhentas.

Este trabalho teve como objetivos correlacionar os padrões alimentares das cochonilhas obtidos mediante a técnica de EPG com as atividades biológicas, estudar a salivagem desses insetos e associar a formação da bainha salivar com determinadas ondas obtidas durante a fase de ‘caminhamento’ dos estiletes em tecidos foliares de plantas de café.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Controle Biológico de Pragas da EPAMIG/URSM/EcoCentro, Lavras–MG.

Cochonilhas. As cochonilhas utilizadas (*Planococcus citri*) foram obtidas de uma criação de manutenção em abóboras, *Cucurbita maxima* L., cultivar cabotchá acondicionadas em Baterias de Flandes, em sala climatizada à $25\pm 1^\circ\text{C}$, $70\pm 10\%$ UR.

Experimento 1-EPG- A penetração do estilete de *P. citri* em tecidos foliares de plantas de café foi estudada mediante a técnica de EPG (Electrical Penetration Graphs) usando um sistema DC de 8 canais (Tjallingii, 2000). O sinal análogo foi convertido a sinal digital mediante uma placa DAS-800 (Keithley Metrabyte Corporation). Os registros foram realizados e analisados mediante o programa Stylet 3.0 e armazenados no PC. Fêmeas jovens foram retiradas da criação em laboratório e deixadas sem alimentação por um período de uma hora. Durante esse período, foram preparadas para o estudo de EPG. A substância cerosa do dorso foi eliminada delicadamente com um pincel e água. Um eletrodo com um fino fio de ouro de 2 cm de comprimento e $20\ \mu\text{m}$ de diâmetro foi fixado no dorso através de uma gota de tintura de prata. Os insetos foram conectados a um amplificador de sinais e posteriormente colocados sobre a folha de cafeeiro. Outro eletrodo foi conectado ao vaso com o substrato que continha as plantas. Dessa maneira, quando a cochonilha inseriu os estiletes, o circuito foi fechado e os sinais foram visualizados. Neste estudo foram realizados 32 registros da alimentação das cochonilhas, cada um com períodos variáveis de 1 a 16 horas.

Experimento 2-Microscopia óptica- O tecido vegetal de plantas de café junto ao aparato bucal das cochonilhas foi seccionado cuidadosamente durante o período de monitoramento eletrônico (EPG), e o conjunto foi refrigerado a -15°C por aproximadamente 20 minutos. Etanol 70% foi adicionado ao recipiente de maneira que o estilete permanecera no tecido. Tais tecidos contendo os estiletes (aparato bucal dos insetos) foram colocados entre blocos de isopor e cortados com micrótomo manual em secções de aproximadamente 20-25 micras (Brennan et al., 2001). As secções foram clareadas com Hipoclorito de Sódio a 10% durante dez minutos e posteriormente lavadas em água por 10 minutos. Os cortes foram tingidos com Safranblau (5 ml de solução aquosa de Safranina a 1%, 95 ml solução aquosa de Azul de Astra a 1% e duas gotas de ácido glacial acético) durante 10-12 segundos. A observação dos estiletes foi realizada em microscópio e determinada a sua localização no interior dos tecidos. Desta maneira, foi possível associar alguns dos padrões obtidos com o monitoramento da alimentação das cochonilhas e as localizações do aparato bucal do inseto. A visualização dos estiletes nos cortes nem sempre é possível, pois às vezes o corte não passa pelo lugar de inserção.

Experimento 3-Estudos de provas em dieta artificial- Dois sistemas foram estudados. O primeiro consistiu em colocar água com açúcar (10%) sobre uma lâmina com cavidade e coberta por Parafilm[®]. As cochonilhas foram colocadas sobre a membrana por 24 horas, e posteriormente, o interior do líquido foi inspecionado com lupa e microscópio. O segundo método utilizou placas Petri com ágar-água deixando as cochonilhas diretamente sobre o substrato e observando-as com lupa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do monitoramento eletrônico e os cortes histológicos indicam que a inserção do aparato bucal segue uma rota intercelular (Figura 1). Durante o padrão, denominado e caracterizado como ‘N’, o estilete se encontra no mesófilo do tecido vegetal (Figura 2). Durante o padrão ‘C’ (caminhamento) o estilete também se encontra no mesófilo (Figura 3). Mesmo que, durante ambos os padrões, o estilete se encontre no mesmo tipo de tecido, a atividade da cochonilha é diferente, o que se demonstra pelo distinto tipo de padrão encontrado no monitoramento eletrônico.

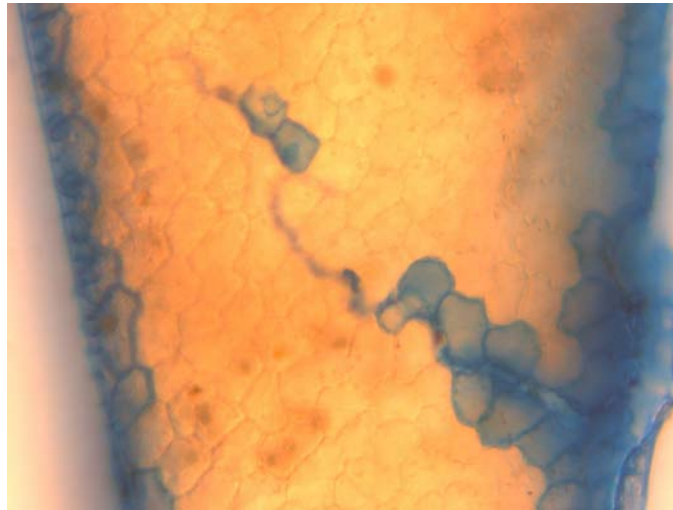


Figura 1. Bainha salivar deixada durante a penetração do estilete da cochonilha em tecidos foliares de plantas de café mostrando a rota intercelular dos estiletos.

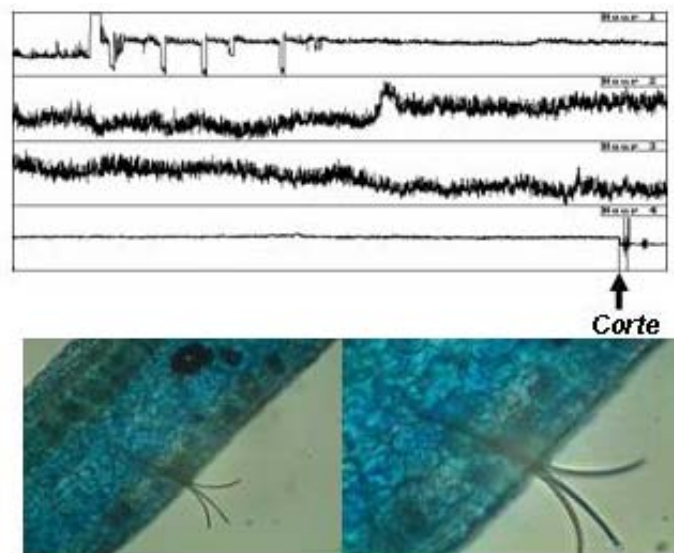


Figura 2. Monitoramento eletrônico (acima) mostrando o padrão 'N' no momento do corte, e corte microscópico (abaixo) indicando posição do estilete no mesófilo em tecidos foliares de plantas de café durante esse padrão.

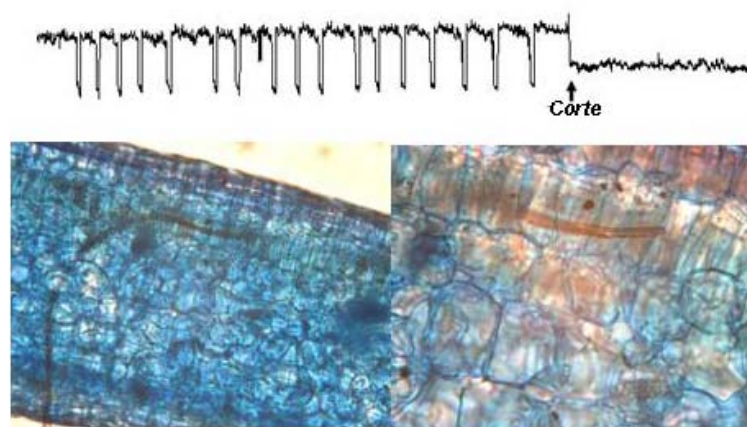


Figura 3. Monitoramento eletrônico (acima) mostrando o padrão 'C' (caminhamento), com inserções do estilete dentro de células, e corte microscópico (abaixo) indicando posição do estilete no mesófilo em tecidos foliares de plantas de café no momento do corte.

No estudo da salivação das cochonilhas sobre ágar os estiletes foram visualizados, porém nenhuma saliva foi detectada com esta metodologia. Na dieta contendo água e açúcar a saliva foi observada em detalhe. A secreção segue uma frequência regular que diminui em intensidade e que corresponde às ondas denominadas 'B' obtidas no 'EPG', sendo observado tanto no 'EPG' como na dieta artificial. Entre as salivagens principais são produzidas salivagens menores que vão construindo a bainha salivar, típica destes insetos sugadores. No 'EPG' são observadas oscilações de menor intensidade entre as ondas 'B' que obedecem a estas pequenas secreções de saliva (Figura 4). O comprimento dos estiletes de *P. citri* dentro da dieta atingiu 5 mm, aproximadamente o triplo do comprimento da cochonilha.

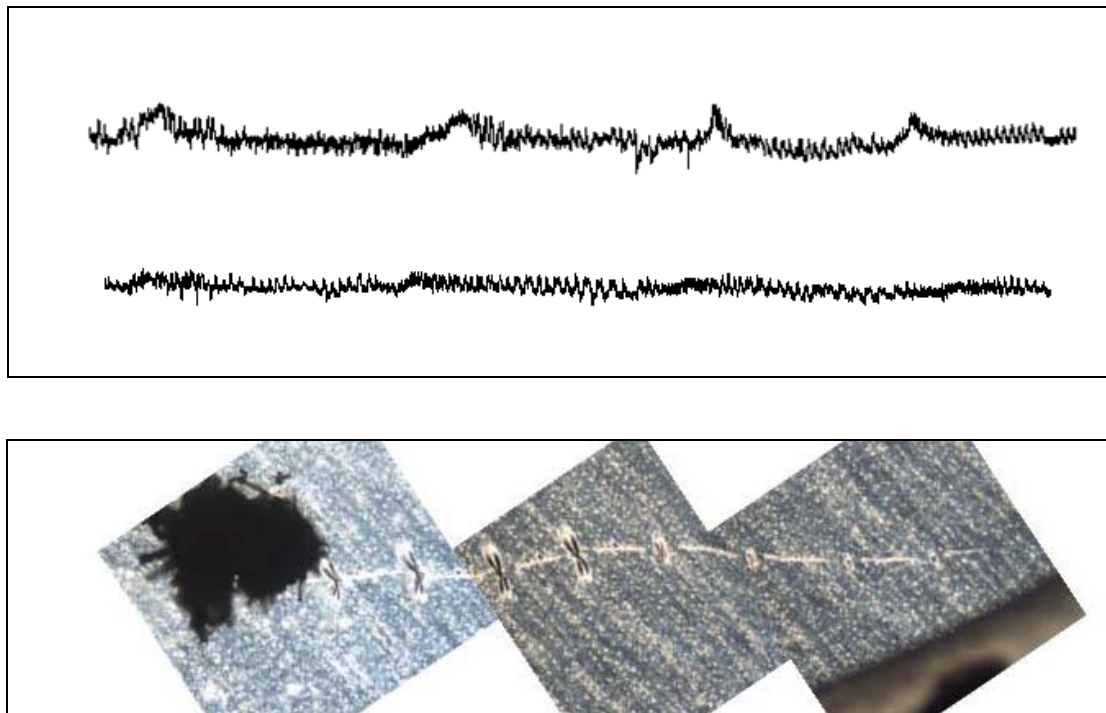


Figura 4. Ondas 'B' obtidas durante uma inserção dos estiletes (acima). Salivação observada em dieta artificial com frequência correspondente às oscilações obtidas em EPG (abaixo). Reconstrução de fotografias de microscópio 2,5 x.

CONCLUSÕES

A inserção do aparato bucal das cochonilhas segue uma rota intercelular nos tecidos foliares da planta de café. Durante os padrões 'N' e 'C' (caminhamento) os estiletes se encontram no mesófilo do tecido vegetal da folha de café, porém as atividades biológicas são diferentes em cada padrão de alimentação.

A inserção dos estiletes de *P. citri* em dieta artificial apresenta salivagens principais intercaladas por outras menores; todas elas formam a bainha salivar e correspondem às ondas 'B' obtidas durante o monitoramento eletrônico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CBP&D/Café pelo financiamento da pesquisa e a FAPEMIG pela concessão de bolsas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRENNAN, E.B.; WEINBAUM, S.A.; PINNEY, K. A new technique for studying the stylet tracks of homopteran insects in hand-sectioned plant tissue using light or epifluorescence microscopy. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 76, n. 2, p. 59-66, 2001.
- SANTA-CECÍLIA, L.V.C. **Interação cochonilha (Pseudococcidae)- planta avaliada mediante estudos biológicos e da técnica de "Electrical Penetration Graphs" (EPG)**. 2003. 84 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SANTA-CECÍLIA, L.V.C.; SOUZA, B.; SOUZA, J.C.; PRADO, E.; MOINO JR. A.; FORNAZIER, M.J.; CARVALHO, G.A. Cochonilhas-farinhas em cafeeiros: bioecologia, danos e métodos de controle. Belo Horizonte: EPAMIG, 2007. 48p. (EPAMIG. Boletim Técnico, 79).
- TJALLINGII, W.F. Electrical recording of stylet penetration activities. In: MINKS, A.K.; HARREWIJN, P. **Aphids, their biology, natural enemies and control**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, v. 2, pp. 95-107, 1988.
- TJALLINGII, W.F. Comparison of AC and DC system for electronic monitoring of stylet penetration activities by homopterans. In: WALKER, G.P.; BACKUS, E.A. (Ed.). **Principles and applications of electronic monitoring and**

other techniques in the study of homopteran feeding behaviour. Lanham: Entomological Society of America, 2000. p. 41-69. (Thomas Say Publications in Entomology).