

Estudo histológico da penetração do estilete da Pérola da Terra *Eurhizococcus brasiliensis* (Wille, 1922) (Hemiptera:Margarodidae) nas Raízes de Videira

Marcelina Mezzomo Debiasi

Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) – *Campus* Joaçaba
(marcelina.debiasi@unoesc.edu.br)

Márcia Bündchen

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(marcia.bundchen@poa.ifrs.edu.br)

Katiane Paula Bagatini

Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) – *Campus* Joaçaba
(katiane.bagatini@unoesc.edu.br)

Edegar Luiz Peruzzo

Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI)
(peruzzo@epagri.sc.gov.br)

Fernanda Maurer D'Agostini

Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) – *Campus* Joaçaba
(fernanda.dagostini@unoesc.edu.br)

Resumo: *Eurhizococcus brasiliensis* (Wille, 1922), a pérola da terra, é considerada a principal praga da videira no sul do Brasil e existe pouca informação sobre as interações inseto-planta. O objetivo deste estudo foi verificar o mecanismo de penetração de *E. brasiliensis* nas raízes de *Vitis vinifera* através de cortes histológicos. Amostras de 250 raízes de *V. vinifera* infestadas por *E. brasiliensis* foram coletadas e fixadas em FAA₇₀ e armazenadas em etanol 70%; Após a fixação das raízes infestadas, os segmentos foram desidratados, emblocados em parafina, seccionados e corados para a preparação de lâminas histológicas permanentes. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz e os dados obtidos do estudo anatômico revelaram que o estilete de *E. brasiliensis* quando introduzido nos tecidos radiculares rompe as células e aproxima-se do xilema. A penetração do estilete forma um canal com as margens mais claras e irregulares atingindo até 650 µm no interior dos tecidos da raiz.

Palavras-chave: Interação inseto-planta; Histologia da raiz; *Vitis vinifera*.

Histological study of penetration of the Brazilian ground pearl stylet *eurhizococcus brasiliensis* (wille, 1922) (hemiptera: margarodidae) in Raízes de Videira

Abstract: *Eurhizococcus brasiliensis* (Wille, 1922), the Brazilian ground pearl, is considered the main vine pest in Southern Brazil and there is few information about the insect-plant interactions. The aim of this study was to verify the penetration mechanism of the *E. brasiliensis* in the roots of *Vitis vinifera* through histological cuts. Samples from 250 *V. vinifera* roots infested by *E. brasiliensis* were collected and were fixated at FAA₇₀ and stored in ethanol 70%; then, root segments were dehydrated, molded in paraffin, sectioned and staining to prepare the permanent histological slides. The slides were analyzed under a light microscope and the obtained data from the anatomical studies revealed that the *E. brasiliensis* stylet when introduced in the root tissues, breaks the cells and reaches to the xylem. The root penetration of the stylet forms a track with clearer and more irregular margins reaching up to 650µm inside the root tissues.

Keywords: Insect-plant interaction; Root histology; *Vitis vinifera*.

INTRODUÇÃO

Eurhizococcus brasiliensis (Wille, 1922) Hemiptera, popularmente conhecida como “pérola da terra” ou “margarodes” é uma espécie de cochonilha neotropical endêmica do Brasil e encontrada principalmente na região Sul (BOTTON, 2010a; EFROM *et al.*, 2012). É um parasita subterrâneo que se alimenta nas raízes de cerca de 70 espécies de plantas, incluindo videiras, cana-de-açúcar, palmeiras, algodão e diversas outras, causando assim sérios danos nestas culturas (FOLDI, 2005). As consequências da infestação de *E. brasiliensis* na produtividade da cultura de *Vitis* sp. têm maior impacto econômico em decorrência do papel da vitivinicultura na sustentabilidade econômica das pequenas propriedades rurais do sul do Brasil (MELLO, 2012).

Na literatura as hipóteses para o declínio e morte das plantas de videira, associadas à infestação pela cochonilha incluem: sucção contínua da seiva floemática; bloqueio da translocação de fotossimilados; toxicidade injetada pelo aparelho bucal e infecções secundárias, por microorganismos. Segundo Panizzi e Noal (1971) e Foldi (2005), o definhamento progressivo do parreiral pode ser devido à sucção contínua de seiva, resultando na redução da produção e consequente morte das plantas. Zart *et al.* (2014) constataram que a evolução dos sintomas foliares associados ao definhamento da planta está relacionada com uma redução na atividade fotossintética e com o acúmulo de amido nas folhas das plantas

infestadas, sugerindo que decorram do bloqueio no transporte de fotoassimilados das folhas. Outra interpretação acerca dos sintomas indica que a saliva injetada pela cochonilha nos tecidos vegetais é tóxica para a videira e distribui-se de forma sistêmica pela planta através do sistema vascular, acarretando em baixo vigor, mesmo quando se elimina o inseto das raízes (SORIA e GALLOTTI, 1986). A penetração do estilete pode também representar um veículo para a penetração de viroses, a exemplo da transmissão, também em videiras, do *Grapevine virus B* pela cochonilha *Pseudococcus longispinus* (KUNIYUKI *et al.*, 2006).

Historicamente, a pérola da terra é uma praga de difícil controle (BOTTON *et al.*, 2000) devido, particularmente, ao hábito subterrâneo, aliado ao desenvolvimento na forma de cisto, à dispersão e infestação facilitadas pelas formigas (NONDILLO *et al.*, 2013). Durante a fase jovem (primeiro instar e cisto) esta espécie ataca as raízes da videira alimentando-se dos tecidos vasculares ou células de parênquima utilizando o estilete para a nutrição (FOLDI, 2005; SORIA e CONTE 2005). O inseto somente é prejudicial na fase jovem uma vez que os adultos não apresentam aparelho bucal (BOTTON *et al.*, 2000).

As tentativas de controle têm sido restritas ao uso de inseticidas por diferentes vias de aplicação, as quais não se mostraram eficientes para evitar os danos nas videiras (BOTTON *et al.*, 2008; BOTTON *et al.*, 2010a; HICKEL *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2001). Além disso, tem se procurado, no uso de agentes biológicos, uma alternativa aos inseticidas químicos (CAUSTON *et al.*, 2004; GRAFTON-CARDWELL *et al.*, 2005) para o controle de insetos da família Margarodidae. O díptera *Proleptis lucifer* (Asilidae), um predador encontrado em populações naturais de *E. brasiliensis*, mostrou-se um potencial agente de controle biológico (SORIA *et al.*, 2004) enquanto o uso de cobertura de solo com mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*), não foi eficiente para o controle da pérola-da-terra (BOTTON *et al.*, 2010b).

Considerando a importância socioeconômica derivada do impacto da pérola da terra na produção das videiras e a escassez de informações sobre a relação parasita-hospedeiro, o presente estudo visou, por meio da análise histológica, visualizar e documentar a inserção do estilete de *E. brasiliensis* nos tecidos radiciais de *Vitis vinifera*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas aleatoriamente 250 amostras de raízes de *V. vinifera*, completamente infestadas por *E. brasiliensis*, provenientes de um vinhedo de Cabernet Sauvignon sobre o porta-enxerto Paulsen 1103, na Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), localizada no município de Videira, na região Centro Oeste do estado de Santa Catarina (coordenadas 27°01'28"S/51°08'55", altitude 745m). Após a coleta as raízes infestadas foram fixadas em FAA₇₀ (formol, ácido acético e álcool etílico 70%) (JOHANSEN, 1940) por 48 horas e, a seguir, armazenadas em etanol 70%.

Para o processamento do material, segmentos da extremidade distal, com menor diâmetro, das raízes foram dispostos em porta amostras (cassetes) apropriados ao procedimento de inclusão e submetidos ao processador de tecidos da marca LUPE® onde foram submetidos a álcool absoluto e formalina (4:1) por uma hora, álcool absoluto por três horas, xilol por três horas e parafina líquida por três horas (TIMM, 2005). Os segmentos foram emblocados em parafina e permaneceram por 15 minutos no refrigerador a -18° C para serem desenformados. Os blocos resultantes foram colocados por 2 horas na água amoniacal, com a finalidade de amolecer o tecido, e em seguida mantidos sob refrigeração (-18° C) por aproximadamente 10 minutos, adaptando-se a técnica de Timm (2005). Foram confeccionados 62 blocos resultando em 298 lâminas seriadas.

Secções transversais e longitudinais (com relação à orientação das raízes) foram obtidas em micrótomo de rotação (Leica®) com espessura de 4 µm. Os cortes foram distendidos em água a 40° C, dispostos de forma seriada em lâminas de vidro e desparafinados em estufa a 70°C por um período de duas horas. A coloração foi realizada com solução aquosa de azul de toluidina 0,05% (O'BRIEN *et al.* 1965), hematoxilina/eosina (JOHANSEN, 1940) e montadas em resina sintética Permount®.

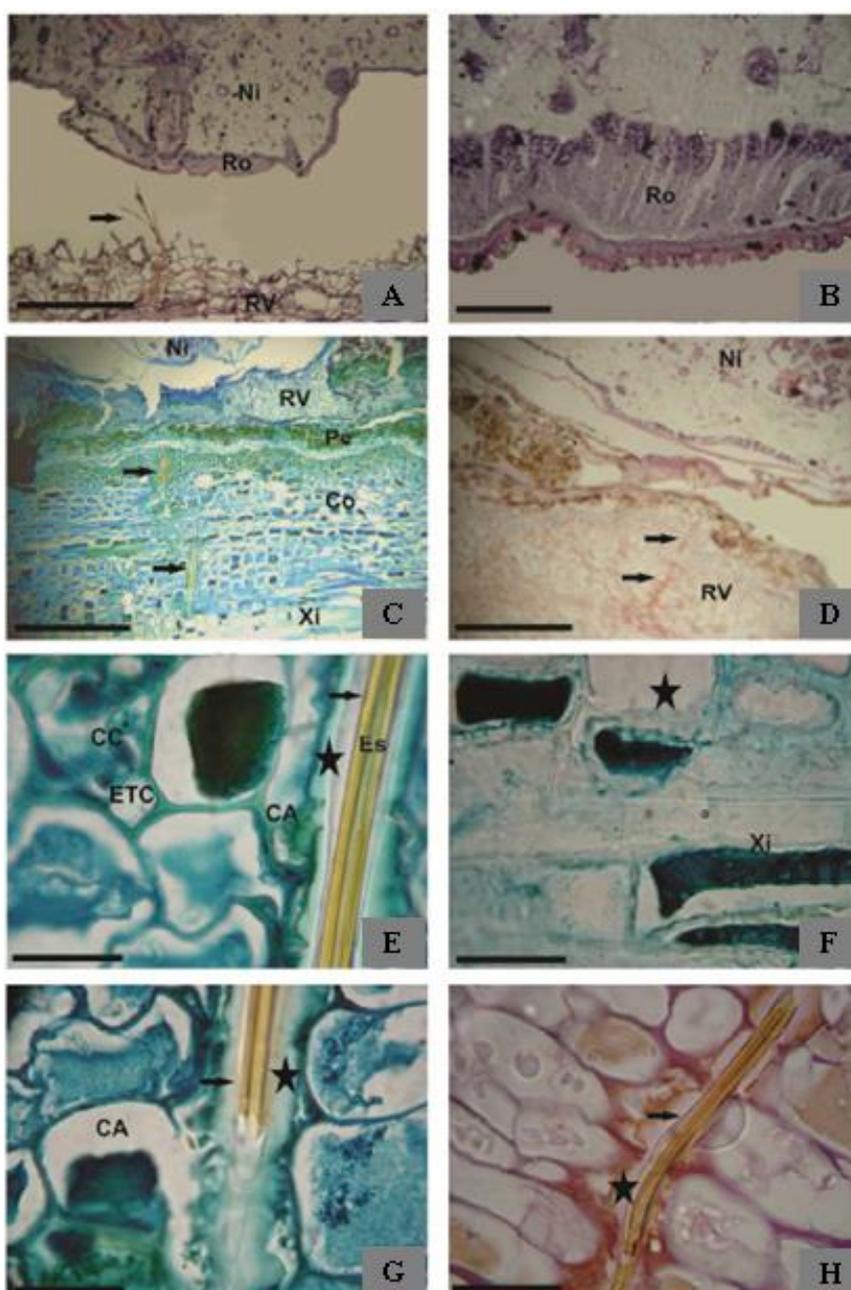
As análises microscópicas e os registros fotográficos foram realizados em microscópio fotônico (Nikon®) com captura de imagem. Nas lâminas em que o estilete pode ser visualizado foi efetuada a mensuração do seu comprimento e largura através do software Motic Images Plus 2.0 (MIP-2.0).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estilete de *E. brasiliensis* é formado por três segmentos (Figura 1-A seta), quitinosos, originados das duas mandíbulas e da maxila que se modificam, unificando-se e formando um tubo (COSTA LIMA, 1942; FOLDI, 2005) com $6,27\mu\text{m}$ ($\pm 0,9$) de espessura. O estilete penetra na raiz através dos tecidos da periderme e do córtex, ultrapassando o tecido floemático (Figura 1-C, 1-D e 1-E) e se aproximando do xilema (Figura 1-F) aprofundando-se até $650\mu\text{m}$. Na área que circunda a inserção do estilete destaca-se a margem de coloração mais clara e aspecto irregular (Figura 1-E, 1-G e 1-H), resultado da penetração do estilete através das células, formando um “canal” e causando lise e desagregação dos componentes das paredes celulares das células atingidas. Nas células adjacentes ao canal, no entanto, não se evidenciam alterações morfológicas (Figura 1-G e 1-H). No decorrer da penetração do estilete as células adjacentes ao canal são de diferentes tipos morfológicos, periderme, córtex parenquimático (Figura 1-C e 1-D) e tecido floemático (Figura 1-E).

Kellow *et al.* (2004) analisando a interação entre *V. vinifera* e *Daktulosphaira vitifoliae* constataram que as células imediatamente em torno daquelas penetradas pelo estilete não apresentaram alteração perceptível em microscopia óptica, não formando um canal. Inclusive, durante a introdução do estilete de *D. vitifoliae*, diferentemente do presente estudo, não foi visualizada a penetração do mesmo no citoplasma ou no vacúolo das células (KELLOW *et al.*, 2004). O aspecto histológico da penetração do estilete observado em *E. brasiliensis* é similar ao descrito por Hewer *et al.* (2011) e Pointeau *et al.* (2012) para afídeos (Hemiptera). Nos afídeos a penetração do estilete é acompanhada pela secreção de saliva que se solidifica e permanece na planta após a retirada do estilete. Esta saliva contém componentes não enzimáticos que inibem as respostas de defesa da planta com relação aos danos no sistema vascular (MILES, 1999).

Figura 1 - Secções transversais (A a G) e seção longitudinal (H) de raiz *Vitis vinifera* infestada por *Eurhizococcus brasiliensis*. (A) Detalhe do estilete três segmentos (seta) de *E. brasiliensis*. (B) Detalhe das células da ninfa perto do rostrum (C e D). Estilete (seta) nos tecidos da raiz. (E, F, G e H) Detalhe do estilete (seta) inserido na raiz formando um canal (estrela) por lise e rompimento das paredes das células. Ni - ninfa; Ro - células próximas à tribuna; RV = raiz *Vitis vinifera*; Pe - periderme, Co - córtex; Xi - xilema, CC – célula companheira (floema), ETC – elemento de tubo crivado (floema), CA - célula adjacente, Es - estilete. Barra de escala: 200 um (fotomicrografias A, C e D), 30 um (fotomicrografia B), 20 um (fotomicrografias E, F, G e H). Técnica de azul de toluidina (fotomicrografias C, E, F e G) e técnica de hematoxilina/eosina (fotomicrografias A, B, D e H).



CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo revelou detalhes dos aspectos da interação inseto-plantas, permitindo visualizar a penetração do estilete nos tecidos radiciais. A análise histológica das raízes infestadas revelou que o estilete de *E. brasiliensis* quando introduzido na raiz de *V. vinifera* excede ao floema e aproxima-se ao xilema, causando lise e degradação dos componentes da parede celular das células atingidas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às colaborações da médica, especialista em Anatomia Patológica, Nádia Aparecida Lorencette e do biólogo, doutor em Ciências Morfológicas, Dib Ammar.

REFERÊNCIAS

- BOTTON, M., BASTOS, G., PEREIRA, O. Y ONZI, I. **Efeito da cobertura vegetal sobre a pérola-da-terra (Hemiptera: Margarodidae) na cultura da videira.** *Acta Scientiarum. Agronomy*. n.32, v.4, p.681-685, 2010a.
- BOTTON, M, TEIXEIRA, I, BAVARESCO, A, PASTORI, P L. **Use of soil insecticides to control the Brazilian ground pearl in vineyards.** *Revista Colombiana de Entomología*, v. 36, p. 20-24, 2010b.
- BOTTON, M, SCHUK, E, SORIA, S DE J, HICKEL, E R. **Manejo de pragas na cultura da videira. EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves.** 2008. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/.../perola.html>>. Acesso em: 12 nov. 2015.
- BOTTON, M., HICKEL, E. R., SORIA, S. DE J. AND TEIXEIRA, I. **Bioecologia e controle da pérola-da-terra *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel, 1922) (Hemiptera: Margarodidae) na cultura da videira.** Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 27. Bento Gonçalves: Embrapa-CNPUV, 2000. 23p.
- CAUSTON, C. E.; LINCANGO M. P.; POULSOMT, G. A. **Feeding range studies of *Rodolia cardinalis* (Mulsant), a candidate biological control agent of *Icerya purchasi* Maskell in the Galapagos islands.** *Biological Control*, v.29, p.315-325, 2004.
- COSTA LIMA, A. M. da. **Insetos do Brasil. 3, Homópteros.** Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1942. p.327.

EFROM, C.F.S.; BOTTON M.; MEYERI, G.A. **Brazilian ground pearl damaging blackberry, raspberry and blueberry in Brazil.** *Ciência Rural*, n. 42, p. 1545–1548, 2012.

FOLDI, I. **Ground pearls: a generic revision of the Margarodidae sensu stricto (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea.** *Annals Sociedade Entomológica*, v.41, p.81-125, 2005.

GRAFTON-CARDWELL.E.E.; GU, P; MONTEZ, G.H. **Effects of temperature on development of vedalia beetle, *Rodolia cardinalis* (Mulsant).** *Biological Control*, v.32, p.473–478, 2005.

HEWER, A.; BECKER, A.; VAN BEL, A. J. E. **An aphids Odyssey – the cortical quest for the vascular bundle.** *The Journal of Experimental Biology*, v.214, p.3868-3879, 2011.

HICKEL, E.R.; PERUZZO, E.L.; SCHUCK, E. **Controle da pérola-da-terra, *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel, 1922) (Homoptera: Margarodidae), através da insetigação.** *Neotropical Entomology*, v.30, p.125-132, 2001.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique.** New York, 1940. p.523.

KELLOW, A.V., SEDGLEY, M., VAN, H. R. **Interaction Between *Vitis vinifera* and Grape Phylloxera: Changes in Root Tissue During Nodosity Formation.** *Annals of Botany*, v.93, p. 581-590, 2004.

KUNIYUKI, H.; GIORIA, R.; REZENDE, J.A. M.; WILLINK, C.G; NOVO, J.C.S.; YUKI, V.E. **Transmissão experimental do Grapevine virus B pela cochonilha *Pseudococcus longispinus* Targioni-Tozzetti (Hemiptera: Pseudococcidae).** *Summa Phytopathologica*, v.32, p.151-155, 2006.

MELLO, L.M.R. de. **Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2012.** EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves. 2012.

MILES, PW. Aphid saliva. **Biological Review**, v.74, p. 41-85, 1999.

NONDILLO, A.; SGANZERLA, V.M.A.; BUENO, O.C.; BOTTON, M. **Interaction between *Linepithema micans* (Hymenoptera: Formicidae) and *Eurhizococcus brasiliensis* (Hemiptera: Margarodidae) in Vineyards.** *Environmental Entomology*, v.42, p.460-466, 2013.

O'BRIEN, T.P., FEDER, N., MCCULLY, M.E. **Polycromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O.** *Protoplasma*, v.59, p. 368-373, 1965.

PANIZZI, A.R.; NOAL, A.C. ***Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel, 1922) disseminação no município de Passo Fundo.** Universidade de Passo Fundo: IPEPLAN, Passo Fundo. 1971. 34p.

POINTEAU, S.; AMELINE, A.; LAURANS, F.; SALLÉ, A.; RAHBÉ, Y.; BANKHEAS-DRONNET, S.; LIEUTIER, F. **Exceptional plant penetration and feeding upon cortical parenchyma cells by the woolly poplar aphid.** *Journal of Insect Physiology*. v.58, p.857-866, 2012.

SORIA, S.J.V.; GALLOTTI, B.J. **O margarodes da videira *Eurhizococcus brasiliensis* (Homoptera: Margarodidae):** biologia, ecologia e controle no sul do Brasil. *Circular técnica 13*. EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves. 1986.

SORIA, S. J.; MELLO R. P.; OLIVEIRA, A. M. **Novos registros de *Prolepsis lucifer* (Wiedemann, 1928) (Diptera, Asilidae) como predador de *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel in Wille, 1922) (Hemiptera, Margarodidae) em diferentes regiões viticultoras do Rio Grande do Sul, Brasil.** *Entomología y Vectores* v.11, p. 323-331, 2004.

SORIA, S.J., CONTE, A.F. **Bioecologia e controle das pragas da videira.** *Circular Técnica 63*. EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves, 2005.

TEIXEIRA, I.; MARCOS, M.; LOECK, A.E. **Avaliação de inseticidas visando ao controle de *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel) (Hemiptera: Margarodidae) em novos plantios de videira.** *Neotropical Entomology*, v.31, p.457-461, 2001.

TIMM, L.L. **Técnicas Rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas.** *Caderno La Salles XI*, Canoas, v.2, n.1, p.231-239, 2005.

ZART, M.; DE CÉSARO, A.; SANTOS, H.P. dos; SOUZA, P.V.D.de. **Caracterização morfo-fisiológica de plantas de videira atacadas por pérola-da-terra.** *Semina: Ciências Agrárias*, v. 35, n. 3, p. 1187-1200, 2014.