

Identificação de predadores de *Orphulella punctata* (de Geer) (Orthoptera, Acrididae) através da serologia

Marta Cassaro-Silva¹

José Eduardo Serrão²

Carlos Sousa-Silva³

Josué Marques-Pacheco³

ABSTRACT. Serological technique for identifying *Orphulella punctata* (de Geer) (Orthoptera, Acrididae) predators. Females of *Orphulella punctata* (de Geer, 1794) were captured in the field and kept in cages with food and boxes filled with moist soil for oviposition. The eggs, macerated with 0,85% saline solution and centrifugated, were used as the immunizing antigen for obtention of the specific antiserum (AS-O). Rabbits were immunized by the linphonodule injection method with two injections of this antigen, with an interval of 15 days between the 1st and 2nd inoculations. Serological tests were performed using double diffusion in agar gel with homologous and heterologous antigens. Specific serological reactions were obtained 14 days after the 1st inoculation. The antiserum of the 30th day gave 5, 2-4 and 1-4 precipitation lines respectively with eggs, female and male antigen. Such differences can be attributed to the high specificity of AS-O. Positive reaction was observed with arachnids and mirmeleontids captured in the field, indicating the predation on *O. punctata*.

KEY WORDS. Insecta, arthropod, grasshopper, antiserum, antigen, biological control, predation

A espécie *Orphulella punctata* (de Geer, 1794) (Orthoptera, Acrididae) é encontrada desde o México até a Argentina, em pastagens e às margens de florestas (OTTE 1978). Já foi citada como praga de *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) no Brasil (SILVA *et al.* 1968). Na região de São Carlos, São Paulo, ocorre durante o ano todo, nas áreas de pastagens, sem a constatação de danos aparentes. Contudo, gafanhotos são insetos capazes de consumir grandes quantidades de alimento, devido à sua versatilidade e voracidade, podendo assim se tornar pragas (BARRERA & TURK 1977).

Quando a população de *O. punctata* atinge níveis mais elevados, o controle químico, que é a primeira alternativa disponível para o agricultor, leva ao desequilíbrio ambiental (JOERN & RUDD 1982), além de não proporcionar um nível de controle satisfatório em muitos casos (MUKERJI & EWEN 1984). A necessidade de técnicas menos agressivas ao ambiente impõe o estudo da biologia da praga e de

1) Instituto de Humanidades, Universidade de Uberaba. Rua Nenê Sabino 1801, 31550-970 Uberaba, Minas Gerais, Brasil. E-mail: martacass@hotmail.com

2) Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa. 36571-000 Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

3) Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos. Rodovia Washington Luiz, Km 235, 13560-000 São Carlos, São Paulo, Brasil.

E-mail: dcrs@power.ufscar.br

suas relações tróficas, possibilitando o seu controle através de inimigos naturais. GREENSTONE (1989) afirma que o obstáculo básico para a implantação deste tipo de controle é a ausência de metodologia para a identificação de predadores preferenciais da praga.

A serologia, cuja eficiência tem sido comprovada por vários autores (WEST 1950; FOX & MACLELLAN 1956; DEMPSTER 1960; TITOVA 1970; GORAYEB & PINGER 1978), é uma técnica que pode ser empregada para estudar essas relações alimentares, inclusive herbivoria (FIGUEIREDO *et al.* 1977; ORIANI *et al.* 1996). Esta técnica se baseia na reação específica entre um determinado antígeno e seu anticorpo, ou seja, proteínas, polissacarídeos ou glicoproteína que, ao entrar em contato com o sistema imunológico de um vertebrado, estimulam a produção de anticorpos.

FIGUEIREDO *et al.* (1977) advertem que o uso de estruturas somáticas implica em risco de variação qualitativa e quantitativa dos antígenos durante o ciclo de vida do organismo. Neste trabalho, obteve-se antissoro para ovos de *O. punctata* e avaliou-se sua aplicabilidade para detecção de predadores naturais da espécie.

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), entre maio de 1986 e junho de 1987.

Preparo do antígeno imunizante (AG-O)

Ovos de *O. punctata* foram obtidos em laboratório, a partir de fêmeas coletadas no campo e mantidas em gaiolas teladas contendo capim marmelada (*Brachiaria plantaginea*) (Poaceae) como substrato alimentar. Bandejas plásticas de 18 cm x 11,5 cm x 2,5 cm com terra umedecida foram colocadas como substrato para a oviposição. Os ovos coletados foram lavados em água destilada e macerados em solução salina a 0,85%. O macerado foi centrifugado a 6000 G durante três minutos. O sobrenadante, emulsionado com adjuvante Freund incompleto em partes iguais (v/v), foi utilizado como antígeno imunizante.

Obtenção do antissoro para ovos (AS-O)

Um coelho, pesando cerca de 3 kg, foi imunizado através da técnica da injeção na região do linfonóculo (OLIVEIRA 1975), com duas aplicações de 0,5 ml do antígeno imunizante, com intervalo de 15 dias entre elas. Antes da primeira, recolheu-se uma amostra de sangue, utilizada como controle nas reações serológicas.

Durante 30 dias, foram feitas sangrias diárias, através de um corte longitudinal na veia marginal da orelha do coelho, recolhendo-se cerca de 10 ml de sangue em Becker. Após duas horas em temperatura ambiente, o coágulo formado foi descolado das paredes e o frasco, colocado em geladeira (10°C) por 24 horas. Ao final deste período, descartou-se o coágulo e adicionou-se merthiolate ao antissoro liberado, em concentração de 1:10.000, armazenando-se a -2°C.

Testes serológicos

Utilizou-se a técnica de dupla difusão em ágar a 1% (OUCHTERLONY 1958), em tampão PBS 0,01 M e pH 7 sobre lâmina para microscopia (3,0 ml de solução

por lâmina). Nos testes homólogos, extratos obtidos pela maceração em solução salina 0,85% de machos, fêmeas, ninfas ou ovos de *O. punctata* foram usados como antígeno reagente. A titulação do antissoro foi feita diluindo-o em água numa progressão geométrica de razão 2.

Testes heterólogos iniciais foram realizados com antígenos obtidos com o macerado de aranhas alimentadas em laboratório com adultos machos ou fêmeas de *O. punctata*. Aranhas mantidas em jejum por 48 horas foram utilizadas como controle. Testaram-se, em seguida, artrópodes capturados no campo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O título observado para o AS-O foi 8.

Testes serológicos entre o AS-O e o antígeno homólogo para ovos mostraram resultados positivos, com uma linha de precipitação, a partir do antissoro obtido 14 dias após a primeira inoculação do antígeno imunizante no coelho. O número máximo de linhas observado foi cinco, com o antissoro da 30ª sangria, 30 dias após a primeira inoculação. O resultado positivo dos testes já na 14ª sangria confirma a eficiência da técnica da injeção na região do linfonóculo, demonstrada por OLIVEIRA (1975). TELFER (1954), usando como antígeno ovos de *Cecropia* sp. (Lepidoptera, Saturniidae) imunizou coelhos por injeções subcutâneas, observando resultados positivos após 30 dias. MOLLET & AMBRUST (1977) imunizando coelhos com extrato protéico de *Hypera postica* (Coleoptera, Curculionidae) só obtiveram resultados satisfatórios após 40 dias, com injeções intramusculares e endovenosas.

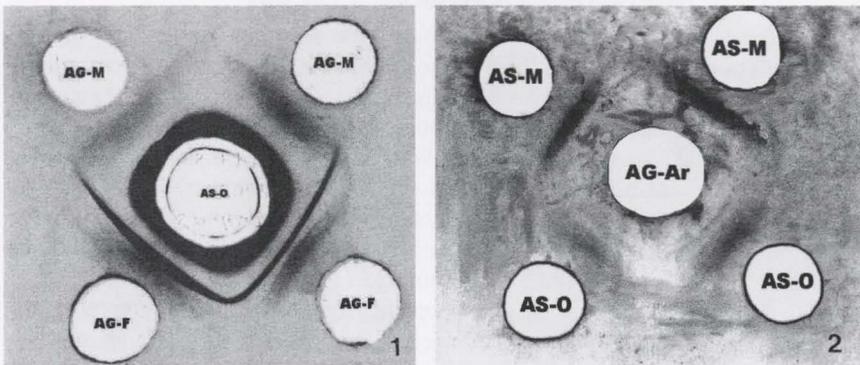
As reações serológicas com machos de *O. punctata* mostraram de 1 a 4 linhas; com fêmeas de 2 a 4 (Fig. 1) e com ninfas, de 1 a 4 linhas. O maior número de linhas observadas nas reações com ovos do que naquelas com ninfas e adultos reflete a alta especificidade do antissoro, o qual foi capaz de diferenciar cada fase do desenvolvimento do inseto as quais, segundo EBERT (1970), apresentam componentes protéicos característicos.

TELFER (1954), usando ovos de *Cecropia* sp. obteve antissoro capaz de detectar uma proteína característica da fêmea. SOUSA-SILVA *et al.* (1988), usando ovos de *Deois flavopicta* (Homoptera, Cercopidae) em diversas fases de desenvolvimento, notaram que o antissoro obtido de cada fase reagia de maneira diferente com ninfas e adultos da espécie.

Resultados positivos foram obtidos com aranha recém-alimentada com um adulto de *O. punctata* e com aranhas e mirmeleontídeos coletados no campo. A aranha em jejum não reagiu. SERRÃO *et al.* (1997), utilizando antissoro específico para indivíduos machos de *O. punctata* obtiveram resultados positivos com os mesmos predadores, cujas linhas foram menos nítidas (Fig. 2). A maior nitidez das linhas observadas nas reações com o AS-O pode ser devida ao menor título, já que este é inversamente proporcional à especificidade do antissoro (TITOVA 1970). GORAYEB & PINGER (1978), pesquisando predadores naturais das larvas de *Simulium fulvinoxum* Cerqueira & Mello, 1968 (Diptera, Simuliidae), observaram que antissoro com baixo título foi específico enquanto que, com alto título, apresentou reações cruzadas.

SOUSA-SILVA *et al.* (1990) utilizando serologia para a detecção de predadores de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae), realizaram testes de laboratório com aranhas e percevejos alimentados com lagartas do inseto. Observaram reações positivas com percevejos até 96 horas após a alimentação e com as aranhas, no máximo após 24 horas.

Esses resultados mostram que as diferenças na velocidade de processamento da presa pelos diversos predadores devem ser levadas em conta em pesquisas com serologia. Os testes devem ser feitos logo após a captura. Quando isto não for possível, o material deve ser congelado, evitando a continuidade do processo metabólico, procurando-se preservar as características protéicas da presa.



Figs 1-2. (1) Reações serológicas entre o antissoro para ovos de *Orphulella punctata* (AS-O) e antígenos obtidos pela maceração de indivíduos machos (AG-M) e fêmeas (AG-F) da espécie; (2) reações serológicas heterólogas entre o antígeno obtido pela maceração de uma aranha alimentada com um exemplar adulto de *O. punctata* (AG-Ar) e os antissoros para ovos de *Orphulella punctata* (AS-O) e para machos (AS-M) da espécie.)

CONCLUSÃO

Concluiu-se que é possível obter antissoro para ovos de *O. punctata*. Esse antissoro é capaz de diferenciar os estágios de ovo, ninfa e adulto (macho e fêmea) e de detectar predadores da espécie.

AGRADECIMENTOS. Ao CNPq, pelo financiamento da pesquisa. Ao Prof. Dr. Toledo Pizsa (*in memoriam*) pela identificação da espécie usada no trabalho. Ao Centro de Pesquisa Pecuária do Sudeste - Embrapa, São Carlos, São Paulo, pela permissão para coletas em suas dependências.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRERA, M. & S.Z. TURK. 1977. Acridios del Noa: Contribución al conocimiento de huevos, desoves y hábitos de postura de algunas especies de tucuras (Orthoptera: Acrididae) de la Provincia de Tucumán. *Acta Zool. Lilloana* 32 (9): 167-188.
- DEMPSTER, J.P. 1960. A quantitative study of the predators on the eggs and larvae of broom beetle *Phytodecta olivaceae* Forster, using the precipitation test. *Jour. Anim. Ecol.* 29: 149-167.

- EBERT, J.D. 1970. **Mecanismos do Desenvolvimento**. São Paulo, Livraria Pioneira, Edusp, 274p.
- FIGUEIREDO, M.B.; A.P.C. ALBA & A.R. OLIVEIRA. 1977. Sorologia aplicada ao estudo de fungos fitopatológicos. **Summa Phytopathol.** 3: 233-259.
- FOX, C.J.S. & C.R. MACLELLAN. 1956. Some Carabidae and Staphylinidae shown to feed on a wireworm, *Agriotes sputator* (L.), by the precipitin test. **Can. Entomol.** 88: 228-231.
- GORAYEB, I.S. & R.P. PINGER. 1978. Detecção de predadores naturais das larvas de *Simulium fulvinothum*, Cerq. e Mello, 1968 (Diptera: Nematocera). **Acta Amazon.** 8 (4): 629-637.
- GREENSTONE, M.H. 1989. Foreign exploration for predators: a proposed new methodology. **Environ. Entomol.** 18 (2): 195-200.
- JOERN, A. & T.N. RUDD. 1982. Impact of predation by the robber fly *Proctacanthus milbertii* (Diptera: Asilidae) on grasshopper (Orthoptera: Acrididae) populations. **Oecologia** 55 (1): 42-46.
- MOLLET, J.A. & E.J. ARMBRUST. 1977. Age specific serological identification of adult stages of alfalfa weevil, *Hypera postica*. **Ann. Entomol. Soc. Am.** 71 (2): 207 - 211.
- MUKERJI, M.K. & A.B. EWEN. 1984. Field evaluation of cypermethrin and carbaryl as sprays and baits for grasshopper (Orthoptera: Acrididae) control in Saskatchewan. **Can. Entomol.** 116: 5-9.
- OLIVEIRA, A.R. 1975. Considerações sobre antissoros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonódulo. **Summa Phytopathol.** 1: 61- 64.
- ORIANI, M.A.G.; J.M. PACHECO & C.R. SOUSA-SILVA. 1996. Estudo de herbivoria em *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) através de técnica serológica. **Anais VII Semin. Reg. Ecol.** 7: 121-126.
- OTTE, D. 1978. Revision of the grasshoppers tribe Orphulellini (Acrididae: Gomphocerinae). **Proc. Acad. Nat. Sci. Phil.** 131: 52-88.
- OUCHTERLONY, O. 1958. Diffusion in gel methods for immunological analysis, p. 1-78. In: S. KARGER (Ed.). **Progress in allergy**. New York, Plenum Press, 312p.
- SERRÃO, J.E.; M. SILVA; C.R. SOUSA-SILVA & J.M. PACHECO. 1997. Uso de serologia na identificação de predadores de *Orphulella punctata* (de Geer)(Orthoptera: Acrididae). **An. Soc. Entomol. Brasil** 26 (2): 375-378.
- SILVA, A.G.A.; C.R. GONÇALVES; D.M. MONTEIRO; A.J.L. GONÇALVES; J. GOMES; M.N. SILUR & L. SIMONI. 1968. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil**. Rio de Janeiro, Escola Nac. Agronomia, 622p.
- SOUSA-SILVA, C.R.; A.R. OLIVEIRA & J.M. PACHECO. 1988. Diferenciação serológica dos estágios fisiológicos de *Deois flavopicta* (Stål, 1854) (Homoptera: Cercopidae). **An. Soc. Entomol. Brasil** 17: 61-65.
- . 1990. Serologia aplicada à determinação de predadores de *Deois flavopicta* (Stål, 1854) (Homoptera: Cercopidae). **An. Soc. Entomol. Brasil** 19: 121-125.
- TELFER, W.H. 1954. Immunological studies of insect metamorphosis. II. The role of a sex-limited blood protein in egg formation by *Cecropia* silkworm. **Jour. Gen. Physiol.** 37: 539- 558.
- TITOVA, E.V. 1970. Use of precipitin test in a study of interrelationship between *Eurygaster intergriceps* Put (Hemiptera: Scutelleridae) and predatory arthropods. **Entomol. Rev.** 49: 155-162.
- WEST, A.S. 1950. The precipitin test as an entomological tool. **Can. Entomol.** 82: 241-244.