

PESQUISA DE AGENTES ENTOMOPATOGÉNICOS NA ILHA TERCEIRA (AÇORES)

J. S. ROSA¹, J. J. AMARAL², J. REIS², P. AGUIAR¹, A. MARTINS¹ & N. SIMÕES¹

¹Universidade dos Açores, Dept. de Biologia, PT-9500 Ponta Delgada (Açores), Portugal.

²Laboratório do Escaravelho Japonês, D.R.D.A., Vinha Brava, PT-9700 Angra do Heroísmo (Açores), Portugal.

RESUMO

Durante a "Expedição Científica Terceira 1994" fez-se a recolha de amostras de solo para pesquisa de nemátodos e fungos entomopatogénicos no âmbito do projecto de colecção e caracterização da variabilidade genética de agentes entomopatogénicos nos Açores. Com o designado "*Galleria trap method*" isolaram-se 4 nemátodos do género *Heterorhabditis*, todos morfologicamente próximos de *Heterorhabditis bacteriophora*, e 1 fungo, identificado como *Beauveria bassiana*.

ABSTRACT

A survey for entomopathogens in soil samples was carried during the "Scientific Expedition Terceira 1994" as part of a project of survey and characterization of insect parasites in the Azores. Four heterorhabditids were isolated with the "*Galleria trap method*", all morphologically close to *Heterorhabditis bacteriophora*, and one fungi, identified as *Beauveria bassiana*.

INTRODUÇÃO

A prospecção de agentes parasitas de insectos que se está a levar a cabo inscreve-se num projecto de colecção e caracterização da variabilidade genética destes microrganismos nos Açores, na perspectiva da sua conservação e utilização.

O trabalho em curso no âmbito deste projecto consiste na i) recolha de amostras de solo para pesquisa de microrganismos parasitas de insectos, ii) caracterização morfológica dos isolados, iii) conservação de uma colecção de microrganismos recolhidos em condições de viabilidade, iv) caracterização bioecológica dos isolados com vista à sua utilização como agentes de controlo microbiológico, e v) criação de uma base de dados em que serão referenciadas informações bioecológicas de cada um dos microrganismos.

Neste relatório referem-se os trabalhos de recolha e identificação sistemática de nemátodos e fungos entomopatogénicos recolhidos durante a "Expedição Científica Terceira 1994".

MATERIAL E MÉTODOS

Recolha das amostras de solo

Entre 26 de Junho e 2 de Julho de 1994 recolheram-se na Ilha Terceira amostras de solo em 199 estações escolhidas ao acaso (fig. 1). Os locais de recolha representavam vários tipos de solo e com diverso tipo de ocupação: campo cultivado, fruteiras,

vinha, pastagem, floresta, coberto endémico e outros (Quadro 1).

Cada estação de recolha foi representada por uma área de aproximadamente 100 m² com uma distribuição homogénea da vegetação. Em cada estação fizeram-se entre 10 e 15 amostras parcelares de solo que foram homogeneizadas recuperando-se cerca de 1 kg de solo em sacos de plástico devidamente identificados e transportados ao laboratório para análise.

Tratamento das amostras para isolamento de entomopatogénos

Utilizou-se no tratamento das amostras recolhidas o método de "*Galleria trap*" (Bedding e Akhurst, 1975). Neste, 6 larvas de um insecto, *G. mellonella*, eram colocadas numa caixa contendo 1 kg de solo e incubadas 8 dias a 22°C, findos os quais os insectos eram recuperados e analisados para identificação patológica.

Isolamento de nemátodos entomopatogénicos

As larvas com sintomas de parasitismo causado por nemátodos eram colocadas numa armadilha de White verificando-se diariamente a saída de nemátodos do interior do insecto. Os insectos que apresentavam outros sintomas eram preparados para observação microscópica. Os insectos saudáveis eram incubados durante 8 dias a 22°C em caixas de Petri individuais com alimento para pesquisa de doenças com revelação tardia.

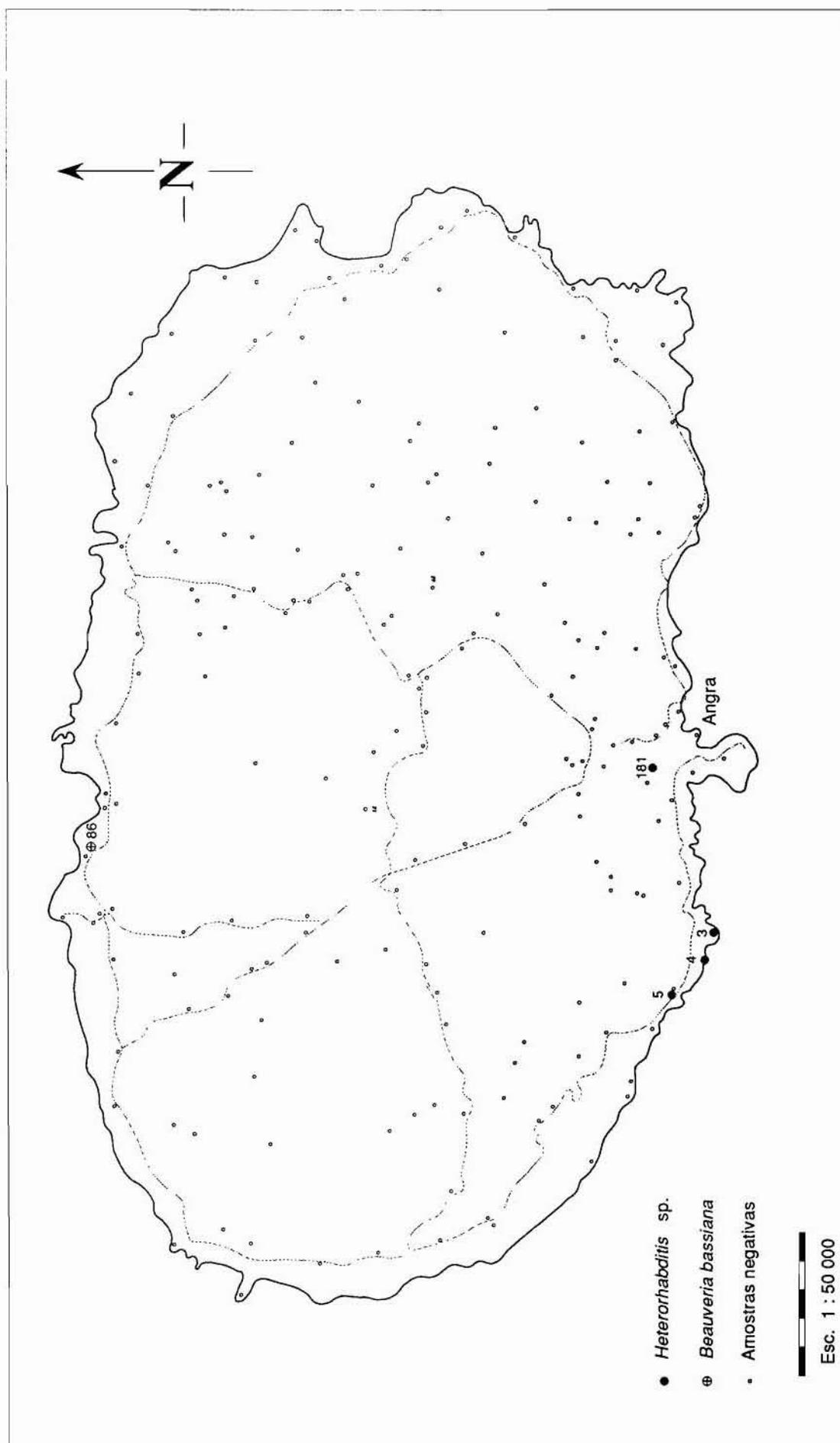


Fig. 1. Distribuição das estações de recolha de solo na Ilha Terceira e localização dos agentes patogénicos isolados. Os números correspondem às amostras positivas.

Quadro 1 . Caracterização das estações de recolha efectuadas na ilha Terceira. Amostras positivas (+) e negativas (—).

Estação	Local	Altitude	Habitat	Nemátodos	Fungos
T 1	Rua da Luz (Terra Chã)	70	Vinha	—	+
T 2	Rua de Belém	10	Campo cultivado	—	+
T 3	Igreja Velha (S. Mateus)	5	Pastagem	+	+
T 4	Negrilo	5	Pastagem	+	—
T 5	Carneiros	20	Pastagem	+	—
T 6	Pesqueiro (S. Bartolomeu)	5	Campo cultivado	—	+
T 7	Porto (Cinco Ribeiras)	20	Campo cultivado	—	+
T 8	Canada das Terreiras	210	Campo cultivado	—	+
T 9	Ermida N ^o . Sr ^a . da Ajuda	50	Pastagem	—	+
T 10	Doze Ribeiras	210	Campo cultivado	—	—
T 11	Doze Ribeiras	250	Campo cultivado	—	+
T 12	Serreta	300	Pastagem	—	—
T 13	Ponta da Serreta	20	terreno rochoso	—	+
T 14	Serreta	260	Floresta	—	—
T 15	Raminho	100	Floresta	—	—
T 16	Canada da Ribeira Borges	260	Pastagem	—	+
T 17	Silveira Grande	190	Pastagem	—	—
T 18	Cruz do Mato (Altares)	100	Campo cultivado	—	+
T 19	Altares	100	Pastagem	—	+
T 20	Arrochela	250	Vinha	—	+
T 21	Porto (Biscoitos)	20	Vinha	—	+
T 22	Biscoitos	60	Vinha	+	—
T 23	Cancela (Biscoitos)	250	Floresta	—	+
T 24	Canada de S. António	390	Pastagem	—	—
T 25	Trempes (Km8)	480	Floresta	—	—
T 26	Bagacina	520	Pastagem	—	+
T 27	Bagacina (Km11)	530	Pastagem	+	—
T 28	Cancela estaleiro (Km9)	490	<i>Criptomeria japonica</i>	+	—
T 29	Cancela estaleiro (Km8,5)	490	Pastagem	+	+
T 30	Pico das duas (Km7)	500	Floresta	+	—
T 31	Pico C. Vieira (Km17)	710	Floresta	—	+
T 32	Serra S. Bárbara (Km19)	950	Floresta	—	+
T 33	Serra S. Bárbara (Km21)	1000	Musgo	+	—
T 34	Cerrado das Sete	500	Pastagem	—	+
T 35	Pico das Dez (Km2)	360	Pastagem	—	+
T 36	Macieira (Km14)	420	Pastagem	—	—
T 37	Pico Gordo	510	Pastagem	+	—
T 38	Furna do Enxofre	610	Fetos	+	—
T 39	Cancela das Lagoas	530	Pastagem	—	—
T 40	Caldeira G. Moniz	510	Pastagem	+	—
T 41	Cabrito (Km34)	450	Pastagem	—	+
T 42	Achada/Cabrito	370	Floresta	+	—
T 43	Canada do Sidral	310	Pastagem	+	+
T 44	Cruzamento da Unicol	220	Campo cultivado	—	+
T 45	Posto Zootécnico	150	Pastagem	—	+
T 46	Cabo da Praia	10	Terreno inculto	—	+
T 47	Pico das Cruzinhas	120	Floresta	—	+
T 48	Posto rádio (Km2)	360	Pastagem	—	+
T 49	Cabouco do Cume (Km2)	340	Pastagem	—	+
T 50	Serra do Cume	350	Pastagem	+	—
T 51	Serra do Cume	525	Pastagem	+	—
T 52	Serra do Cume	542	Pastagem	+	—
T 53	Pico da Caldeira	245	Pastagem	+	—
T 54	Areeiro	80	Pastagem	+	—
T 55	Cruz do Marco	45	Pastagem	—	—
T 56	Cabo da Praia	5	Pastagem	—	+
T 57	Porto Martins (Km2)	60	Campo cultivado	—	+
T 58	Porto Martins	5	Pastagem	—	+

Quadro 1. Caracterização das estações de recolha efectuadas na ilha Terceira (continuação). Amostras positivas (+) e negativas (—).

Estação	Local	Altitude	Habitat	Nemátodos	Fungos
T 59	S. Sebastião	10	Pastagem	—	+
T 60	Salgueiros	70	Pastagem	—	+
T 61	Contendas	35	Vinha	—	—
T 62	Salga	40	Vinha	—	—
T 63	S. Sebastião	30	Campo cultivado	+	—
T 64	S. Sebastião (Km2)	125	Pastagem	—	—
T 65	S. Sebastião (Km2)	130	Campo cultivado	+	+
T 66	Cruzes	170	Campo cultivado	—	+
T 67	Fonte de Bastardo	155	Pastagem	—	+
T 68	Praia da Vitória (Km2)	75	Pastagem	+	+
T 69	Casa da Ribeira	5	Campo cultivado	—	+
T 70	Canada Joaquim Alves	65	Pastagem	—	+
T 71	Base Aérea 4	65	Campo cultivado	+	+
T 72	Lages	55	Campo cultivado	—	+
T 73	Canada de S. João	50	Campo cultivado	—	+
T 74	Nossa S ^a da Ajuda	50	Campo cultivado	—	—
T 75	Vila Nova	85	Campo cultivado	+	+
T 76	Outeiro Filipe	135	Pastagem	+	—
T 77	Achada/Aqualva	335	Pastagem	+	—
T 78	Aqualva (Km2)	310	Pastagem	+	+
T 79	Aqualva (Km2)	310	Floresta	+	+
T 80	Aqualva/Vila Nova	200	Pastagem	+	+
T 81	Vila Nova/Biscoitos	120	Pastagem	+	—
T 82	Cabouco de Tráz	145	Pastagem	—	+
T 83	Boqueirão	125	Campo cultivado	+	+
T 84	Boqueirão	125	Pastagem	—	+
T 85	Boqueirão	125	Floresta	+	+
T 86	Forno de S. António	95	Pastagem	—	+
T 87	Forno de S. António	95	Pomares	—	+
T 88	Biscoitos	60	Pastagem	—	+
T 89	Biscoitos	60	Vinha	+	+
T 90	Altares	90	Pastagem	—	+
T 91	Altares	300	Pastagem	+	+
T 92	Serviços de A. de água	395	Campo cultivado	—	+
T 93	Serviços de A. de água	395	Pastagem	+	+
T 94	Pico Gordo	520	Pastagem	+	—
T 95	Ribeirinha (serra)	350	Pastagem	—	+
T 96	Ribeirinha (serra)	350	Pastagem	+	+
T 97	Barro Vermelho	245	Pastagem	—	+
T 98	Amaro	95	Pastagem	—	—
T 99	Feteira	125	Campo cultivado	—	—
T 100	Ribeira do Teste	155	Pastagem	—	+
T 101	Canada do J. Pacheco	150	Pastagem	—	+
T 102	Canada do Cume	270	Pastagem	—	+
T 103	Canada dos Fetos	320	Pastagem	—	+
T 104	Canada do Q. grande	345	Pastagem	—	+
T 105	Sant'Ana	310	Pastagem	—	+
T 106	Canada do Tapete	255	Pastagem	—	+
T 107	Estádio J. Paulo II	55	Pastagem	+	+
T 108	Lixeira	310	Pastagem	+	—
T 109	Clube de Tiro	325	Pastagem	+	+
T 110	Granja	365	Pastagem	+	+
T 111	Ginjal (Km2)	340	Pastagem	—	+
T 112	Ginjal (Km4)	310	Pastagem	—	+
T 113	Canada de Sant'Ana	260	Pastagem	—	+
T 114	Cinco Picos	200	Pastagem	+	+
T 115	Cinco Picos	200	Campo cultivado	+	+
T 116	Senhora da Esperança	40	Campo cultivado	+	—

Quadro 1. Caracterização das estações de recolha da ilha Terceira (continuação). Amostras positivas (+) e negativas (—).

Estação	Local	Altitude	Habitat	Nemátodos	Fungos
T 117	Senhora da Esperança	40	Pastagem	+	+
T 118	Testo	250	Pastagem	—	+
T 119	km2 da amostra 120/121	310	Pastagem	+	+
T 120	Km1,3 da amostra 49	320	Campo cultivado	—	+
T 121	Km1,3 da amostra 50	320	Pastagem	—	+
T 122	a 2 Km da Fajã	340	Floresta	+	—
T 123	a 2 Km da Fajã	340	Pastagem	+	+
T 124	Canada Larga	215	Pastagem	+	+
T 125	S. Braz	170	Pastagem	+	+
T 126	Lages	145	Pastagem	—	+
T 127	Canada do Boqueirão	130	Pastagem	—	+
T 128	Canada do Boqueirão	130	Campo cultivado	+	+
T 129	Bica Canada da Bezerra	85	Pastagem	—	+
T 130	Bica Canada da Bezerra	85	Campo cultivado	+	+
T 131	Pasto da Bezerra (Km4)	5	Pastagem	+	—
T 132	Pasto da Bezerra (Km2)	40	Pastagem	+	+
T 133	Amoreiras	60	Campo cultivado	—	+
T 134	a 2 Km das Amoreiras	50	Pastagem	—	+
T 135	Portela	100	Pastagem	—	+
T 136	Ponta do Facho	30	Pastagem	—	+
T 137	Ponta da P. da Vitória	10	Pastagem	—	+
T 138	Lages/Fontinha	15	Pastagem	—	+
T 139	Fontinhas	100	Pastagem	—	+
T 140	Canada da Fonte	115	Pastagem	—	+
T 141	Canada das Covas	105	Floresta	—	+
T 142	Canada das Covas	105	Campo cultivado	—	+
T 143	Canada das Covas	105	Pastagem	—	+
T 144	Canada dos Terreiros	210	Campo cultivado	+	—
T 145	Carneiros (S. Mateus)	20	Campo cultivado	—	+
T 146	Cinco Ribeiras (porto)	20	Pastagem	—	—
T 147	Terra Chã	70	Campo cultivado	—	—
T 148	Doze Ribeiras	210	Campo cultivado	+	—
T 149	Canada dos Patameiros	380	Pastagem	—	+
T 150	Canada do Boqueirão	320	Pastagem	—	+
T 151	Caminho de Cima	300	Pastagem	—	—
T 152	Cinco Ribeiras	180	Campo cultivado	—	—
T 153	Cruz dos Regatos	210	Campo cultivado	—	—
T 154	Canadinha Cruz Dourada	100	Campo cultivado	—	—
T 155	Terra Chã	110	Campo cultivado	—	—
T 156	Silveira	30	Campo cultivado	—	+
T 157	Carreirinha	120	Campo cultivado	—	+
T 158	Santo Amaro	60	Pastagem	—	—
T 159	Ribeirinha (serra)	380	Pastagem	—	+
T 160	Cabouco	210	Terreno inculto	—	—
T 161	Pico da Cruz	410	Pastagem	—	+
T 162	Pico da Arena	410	<i>Erica azorica</i>	—	+
T 163	Algar do Carvão	560	Musgo	—	+
T 164	Pico Rachado	580	Pastagem	—	+
T 165	Biscoito Rachado	640	Pastagem	—	+
T 166	Caldeira da Aqualva	480	Pastagem	—	+
T 167	Aqualva	200	Campo cultivado	—	+
T 168	Faiais (Aqualva)	140	Pastagem	+	—
T 169	São Joões	170	Pastagem	+	—
T 170	Golfe	410	Pastagem	+	—
T 171	Barraca	350	Pastagem	—	+
T 172	Curral da Ovelhas	390	Pastagem	—	+
T 173	Cabrito	430	Pastagem	—	—
T 174	Estação Agrícola	160	Campo cultivado	—	+

Quadro 1. Caracterização das estações de recolha da ilha Terceira (continuação). Amostras positivas (+) e negativas (—).

Estação	Local	Altitude	Habitat	Nemátodos	Fungos
T 175	Posto Santo	190	Campo cultivado	+	+
T 176	Posto Santo	200	Campo cultivado	—	+
T 177	Posto Santo	240	Pastagem	+	+
T 178	Canada do Brigadeiro	180	Campo cultivado	—	+
T 179	Canada Nova	250	Pastagem	—	+
T 180	Figueiras Pretas	100	Terreno inculto	+	—
T 181	Castelinho	10	Pastagem	—	+
T 182	Quinta do Freixo	190	Campo cultivado	+	+
T 183	Figueiras	100	Musgo	+	+
T 184	Lagoa do Negro	510	Musgo	—	+
T 185	Pico do Gaspar	370	Pastagem	—	+
T 186	Cerrado do Canto	390	Pastagem	—	—
T 187	a 2,2 Km da amostra 186	450	<i>Erica azorica</i>	—	+
T 188	a 4,4 Km da amostra 186	600	Pastagem	—	+
T 189	a 6,0 Km da amostra 186	750	Floresta	—	+
T 190	Serreta	220	Pastagem	—	+
T 191	Serreta	250	Pastagem	+	—
T 192	Caminho de Cima	320	Campo cultivado	—	+
T 193	S. Bartolomeu	130	Pastagem	+	+
T 194	Pico do Vime	350	Pastagem	—	+
T 195	Terra Chã	106	Floresta	+	+
T 196	Terra Chã (acampamento)	100	Pastagem	—	+
T 197	Silveira	40	Campo cultivado	—	+
T 198	Fanal (S. Pedro)	20	Pastagem	—	+
T 199	Angra	80	Pastagem	—	+

Testou-se a patogenicidade de todos os isolados assim obtidos sobre *G. mellonella* e sobre *M. unipuncta*.

Isolamento de fungos entomopatogénicos

O isolamento de fungos entomopatogénicos a partir das larvas de *G. mellonella* com sintomas de micose decorreu por inoculação em dextrose gelosada de "Sabouraud", suplementada com 1% de extrato de levedura (SDAY).

Identificação dos nemátodos parasitas de insectos e das bactérias associadas

Os isolados de nemátodos parasitas de insectos foram identificados recorrendo à morfologia externa e morfometria do estado infectante e do macho adulto e ao comportamento do estado infectante.

Das larvas infectantes dos nemátodos recuperados procedeu-se à obtenção da bactéria simbiote pelo método da gota pendente (Poinar e Thomas, 1967). As bactérias isoladas estão a ser caracterizadas por técnicas morfológicas, bioquímicas e metabólicas.

Identificação dos fungos parasitas de insectos

O isolado do fungo parasita de insectos foi identificado por análise morfológica (Barnett e

Hunter, 1987; Carmichael *et al.*, 1980), após cultura em lâmina (Riddell, 1950).

Conservação do material biológico

O material biológico isolado foi conservado segundo técnicas adequadas – os nemátodos foram mantidos em água esterilizada com arejamento permanente sob temperatura controlada (10°C) e as bactérias simbiotes do nemátodo e o fungo em crioconservação (–80°C).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tendo em conta a pesquisa que se pretende, a amostragem realizada na ilha Terceira considera-se satisfatória, uma vez que se conseguiu uma distribuição bastante homogénea. Das amostras de solo recolhidas 33,7% apresentavam nemátodos e 70,4% apresentavam fungos. A maioria dos nemátodos encontrados eram nemátodos de vida livre e fitoparasitas e a maioria dos fungos era de natureza saprofítica. Uns e outros estão fora do alcance deste trabalho. Efectivamente, nas 199 amostras realizadas na Terceira recolheram-se 4 isolados de nemátodos entomoparasitas e 1 de fungos entomopatogénicos (Quadro 2).

Quadro 2. Estações onde foram isolados nemátodos e fungos entomopatogénicos. A designação dos isolados diz respeito à respectiva referência em colecção (AzECC/DB.UA).

Estação	Local	Altitude	Habitat	<i>Heterorhabditis B. bassiana</i>	
T 3	Igreja Velha (S. Mateus)	5	pastagem	Az 161	—
T 4	Negrilo	5	pastagem	Az 162	—
T 5	Carneiros (S. Bartolomeu)	20	pastagem	Az 163	—
T 86	Forno de Santo António	95	pastagem	—	Az 297
T 181	Figueiras Pretas	100	terreno inculto	Az 164	—

As amostras positivas de nemátodos diziam respeito a 3 pastagens situadas na Igreja Velha (S. Mateus) (estação *T 3*), no Negrilo (estação *T 4*), nos Carneiros (S. Bartolomeu) (estação *T 5*) e um terreno inculto, situado nas Figueiras Pretas (estação *T 181*), todas abaixo dos 100 m de altitude.

Com base em dados biométricos os 4 nemátodos entomoparasitas isolados foram caracterizados como pertencendo à família Heterorhabditidae e ao género *Heterorhabditis*, morfológicamente próximos de *H. bacteriophora*. Destes nemátodos isolaram-se as respectivas bactérias simbiotes do género *Photorhabdus*.

No respeitante a fungos entomopatogénicos, o isolado foi caracterizado como pertencendo à sub-divisão Deuteromycotina classe Hyphomycetes: 1 *Beauveria bassiana* (Quadro 2).

O isolado fúngico foi recolhido numa amostra de pastagem.

O material biológico recolhido faz parte da Colecção de Culturas Entomopatogénicas dos Açores (Azores Entomopathogenic Culture

Collection – AzECC/DB.UA), com a designação indicada no Quadro 2.

BIBLIOGRAFIA

- Barnett, H. L., B. B. Hunter, 1987. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th Ed.* New York, NY: Macmillan Publish. Co.
- Bedding, R. A., R. J. Akhurst, 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 21: 109-116.
- Carmichael, J. W., W. B. Kendrick, I. L. Conners, L. Sigler, 1980. *Genera of Hyphomycetes.* Alberta, Canada: University of Alberta Press.
- Poinar, G. O., JR., G. M. Thomas, 1967. The nature of *Achromobacter nematophilus* as an insect pathogen. *J. Invertebr. Pathol.* 9: 510-514.
- Riddell, R. W., 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia* 42: 265-270.