

Pico/1991: Relatório (69-73)

PESQUISA DE AGENTES ENTOMOPATOGÉNICOS  
NA ILHA DO PICO (AÇORES)

ANTÓNIO MARTINS  
CARLA MENDES  
CARLOS RIBEIRO  
JOSÉ ROSA  
NELSON SIMÕES

Departamento de Biologia, Universidade dos Açores  
Rua Mãe de Deus, 58. P-9502 PONTA DELGADA codex

RESUMO

Durante a "Expedição Científica Pico 1991" fez-se a recolha de amostras de solo para pesquisar nemátodos 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 dois nemátodos do género *Steinernema*. Um desses isolados é morfologicamente próximo de *S. glaseri* embora o "cross breeding" produza descendência infecunda e o "DNA probes" também indicie que se trata de uma espécie diferente de *S. glaseri*. Um segundo *Steinernema* identificado não parasita *Galleria mellonella*, *Mithymna unipuncta*, *Tenebrio molitor* e *Schistocerca* sp.

ABSTRACT

A survey for entomopathogens in soil samples was carried during the "Scientific Expedition Pico 1991" as a part of a project of survey and characterization of insect parasites in the Azores. Two steinernematids were isolated with the "*Galleria* trap method". One of this is morphologically close to *Steinernema glaseri* but in cross breeding tests they are unable to produce a viable generation and DNA probes indicated a distinct species from *S. glaseri*. The second steinernematid is also a *Steinernema* that is unable to parasitize *Galleria mellonella*, *Mithymna unipuncta*, *Tenebrio molitor* or *Schistocerca* sp.

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 que se está a realizar 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 de caracterização sistemática de nemátodos entomopatogénicos recolhidos durante a "Expedição Científica Pico 1991".

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Recolha das amostras de solo*

Entre 23 e 28 de Junho de 1991 recolheram-se na Ilha do Pico amostras de solo em 32 estações escolhidas ao acaso (Fig. 1). Os locais de recolha representam vários tipos de solo e com diverso tipo de ocupação, campo de cultivado, pasto e vinha. Cada estação de recolha foi representada por uma área de cerca de 10x10 m com uma distribuição homogénea da vegetação. Em cada estação fizeram-se entre 10 e 15 amostras parcelares de solo que foram homogenizadas recuperando-se cerca de 1 kg de solo em sacos de plástico devidamente identificadas e transportados ao laboratório para análise.

### *Tratamento das amostras para isolamento de nemátodos*

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

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 deixados a incubar durante 8 dias a 22°C em caixas de Petri individuais com alimento para pesquisa de doenças com revelação tardia. Testou-se a patogenicidade de todos os isolados assim obtidos sobre *G. mellonella* e sobre *Mithymna unipuncta*.

### *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, ao comportamento do estado infectante e "DNA probes".

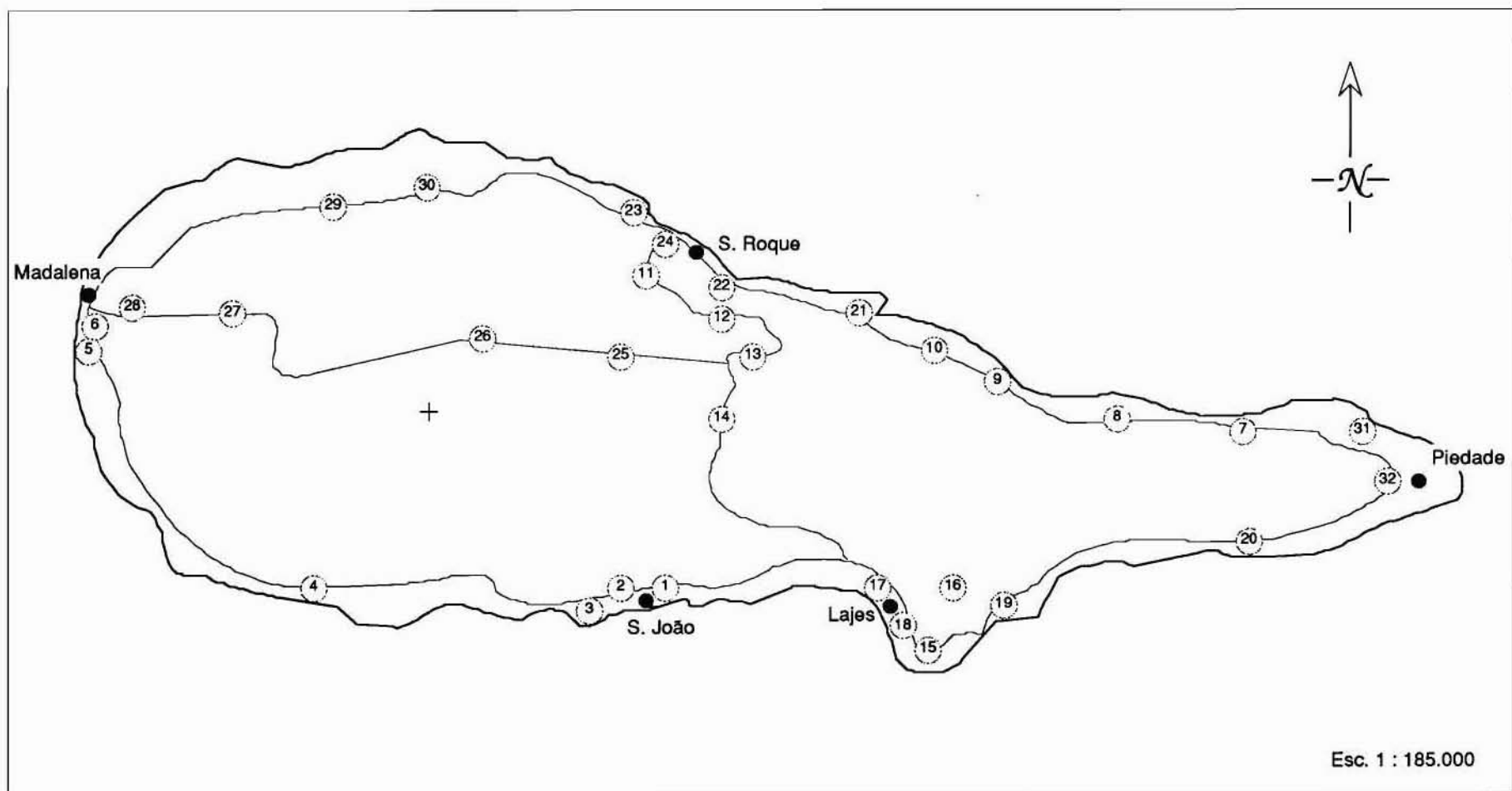
Das larvas infectantes dos nemátodos recuperados procedeu-se à obtenção da bactéria simbiote pelo método da gota pendente (Poinar e Thomas, 1967). As bactérias isoladas estão a ser caracterizadas por técnicas morfológicas, bioquímicas e metabólicas.

### *Conservação do material biológico*

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

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostragem obtida no Pico considera-se satisfatória para o tipo de pesquisa em causa. As amostras distribuem-se por toda a ilha (Fig. 1). Das amostras de solo recolhidas 65% apresentavam nemátodos. As amostras positivas estão distribuídas de um modo muito homogéneo pelos solos com diferentes ocupações (Quadro 1). A maioria dos nemátodos encontrados eram nemátodos de



**Fig. 1.** Distribuição das estações de recolha de solo na Ilha do Pico.

Quadro 1. Caracterização das estações e recolhas de nemátodos efectuadas.

Estação	Local	Altitude	Habitat	Recolha	Nemátodos	<i>Steinernema</i>	<i>Heterorhabditis</i>
P1	Porto de S. João	10	Vinha	23.06.91	+	-	—
P2	Companhia de Cima	75	Vinha	«	+	+ a)	—
P3	Ponta S. João	25	Campo cultivado	«	—	—	—
P4	Porto de S. Mateus	25	Vinha	«	—	—	—
P5	Areia Larga	10	Vinha	«	+	—	—
P6	Areia Larga	10	Vinha	«	—	—	—
P7	Ribeirinha	225	Pastagem	24.06.91	+	—	—
P8	Ribeirinha	300	Pastagem	«	—	—	—
P9	S. Amaro	100	Campo cultivado	«	+	—	—
P10	Prainha	75	Campo cultivado	«	+	—	—
P11	Canárias (S. Roque)	175	Pastagem	«	—	—	—
P12	Cabeço da Serreta	400	Pastagem	«	—	—	—
P13	Covas da Barreira	725	Pastagem	«	+	—	—
P14	Bosque da Junqueira	700	Pastagem	«	—	—	—
P15	Ladeira da Vila	100	Campo cultivado	«	+	—	—
P16	Lajes	350	Pastagem	«	+	—	—
P17	Lajes	10	Campo cultivado	«	+	—	—
P18	Lajes	10	Pastagem	«	—	—	—
P19	Arrife	50	Pastagem	«	+	—	—
P20	Forros	200	Campo cultivado	«	+	—	—
P21	Prainha de Cima	200	Pastagem	25.06.91	—	—	—
P22	S. Roque	100	Pastagem	«	+	—	—
P23	Cais do Pico	25	Pastagem	«	—	—	—
P24	Cais do Pico	25	Pastagem	«	—	—	—
P25	Testada Nova	775	Pastagem	«	+	—	—
P26	Alto do Barreiro	500	Pastagem	«	+	—	—
P27	EN3 — Madalena	250	Campo cultivado	«	+	—	—
P28	Madalena	25	Campo cultivado	«	—	—	—
P29	Canada das Bandeiras	625	Pastagem	26.06.91	+	—	—
P30	Bandeiras	100	Campo cultivado	«	+	—	—
P31	Cais do Calhau	10	Vinha	28.06.91	+	—	—
P32	Caminho dos Motas	250	Campo cultivado	«	+	+ b)	—

Amostras positivas (+) e negativas (—).

a) Az 27

b) Az 26

vida livre e fitoparasitas que, como é óbvio, estão fora do alcance deste trabalho.

No tocante a nemátodos entomoparasitas obtiveram-se dois isolados, um em solo cultivado, um campo de milho situado na Piedade (estação *Pico 32*) a 250 m de altitude e outro em vinha situado em S. João (estação *Pico 2*) a 75 m de altitude (Quadro 2). Ao primeiro atribuiu-se a designação de colecção *Az 26* e ao segundo a de *Az 27*.

Quadro 2. Presença de Nematoda nos solos, segundo o habitat.

Habitat	Amostras		
	Total	com Nematoda	com <i>Steinernema</i>
campo cultivado	10	8	1
vinha	6	4	1
pastagem	16	9	—

Com base em dados biométricos os dois nemátodos isolados (*Az26* e *Az27*) foram caracterizados como pertencendo à família Steinernematidae e ao género *Steinernema*. Os ensaios de determinação da espécie estão a decorrer constituindo material de investigação para mestrado e doutoramento do Lic. José Silvino Rosa. O isolado *Az26* é um nemátodo morfológicamente próximo de *S. glaseri* contudo, os resultados obtidos por cross-breeding (Poinar 1966; Bedding & Akhurst, 1978) conduziram a uma descendência estéril. "DNA probes" também afastam este nemátodo das espécies *S. carpocapsae* e *S. glaseri*. Deste nemátodo isolou-se uma bactéria simbiote do género *Xenorhabdus* cuja identificação e caracterização está a constituir trabalho de APCC da Lic. Carla Mendes.

O isolado *Az27* está a colocar grandes problemas de multiplicação sobre os hospedeiros ensaiados (*G. mellonella*, *M. unipuncta*, *Tenebrio molitor*, *Schistocerca* sp.) bem como em meios massa usuais. Deste nemátodo não foi possível isolar nenhuma bactéria simbiote. Espera-se pesquisar o hospedeiro natural deste parasita numa próxima missão. A aparente especificidade deste *Steinernema* desperta uma particular curiosidade uma vez que apenas está identificada uma espécie deste género com grande especificidade, *S. scapterisci* (Nguyen & Smart, 1990)

O material biológico recolhido faz parte da Colecção de Entomopatógenos dos Açores CEA (DB/UA).

#### REFERÊNCIAS

- AKHURST, R. J., E R. A. BEDDING., 1978. A simple cross-breeding technique to facilitate species determination in the genus *Neoaplectana*. *Nematologica* 24: 328-330.
- BEDDING, R. A., E R. J. AKHURST., 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 21: 109-116.
- POINAR JR., G. O., 1966. The presence of *Achromobacter nematophilus* in the infective stage of a *Neoaplectana* sp. (Steinernematidae: Nematoda). *Nematologica* 12: 105-108.
- POINAR JR., G. O., E G. M. THOMAS., 1967. The nature of *Achromobacter nematophilus* as an insect pathogen. *J. Invertebr. Pathol.* 9: 510-514.
- NGUYEN, K.B. E G.C. SMART., 1990. *Steinernema scapterisci* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae). *J. of Nematol.* 22: 187-199