

São Jorge e Topo/92: Relatório (40-48)

**PESQUISA DE AGENTES ENTOMOPATOGÊNICOS
NA ILHA DE S. JORGE (AÇORES)**

ROSA, JOSE S., ROBERTO MEDEIROS, CARLA M. MENDES, CARLOS RIBEIRO,
ANTONIO MARTINS & NELSON SIMÕES

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

RESUMO

Durante a "Expedição Científica S. Jorge e Topo 1992" fez-se a recolha de amostras de solo para pesquisa de nematodos e fungos entomopatogênicos, no âmbito do projecto de colecção e caracterização da variabilidade genética de agentes entomopatogênicos nos Açores. Com o designado "*Galleria* trap method" e a técnica de flutuação-centrifugação isolaram-se 6 nemátodos do género *Heterorhabditis*, todos morfologicamente próximos de *H. bacteriophora*, e 13 fungos, 7 identificados como *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e 6 do género *Paecilomyces*.

ABSTRACT

A survey for entomopathogens in soil samples was carried during the "Scientific Expedition S. Jorge 1992" as part of a project of survey and characterization of insect parasites in the Azores. Six heterorhabditids were isolated with the "*Galleria* trap method", all morphologically close to *Heterorhabditis bacteriophora*, and 13 fungi, 7 identified as *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* and 6 belonging to the genus *Paecilomyces*.

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 de caracterização sistemática de nemátodos e fungos entomopatogênicos recolhidos durante a "Expedição Científica S. Jorge e Topo 1992".

MATERIAL E MÉTODOS

Recolha das amostras de solo

Entre 28 de Junho e 1 de Julho de 1992 recolheram-se na Ilha de S. Jorge amostras de solo em 163 estações escolhidas ao acaso (Fig. 1). Os locais de recolha representam vários tipos de solo e com diverso tipo de ocupação: campo cultivado, fruteiras/vinha, pastagem, floresta e coberto endémico (*Erica azorica*) (Quadro 1).

Cada estação de recolha foi representada por uma área de aproximadamente 100 m² com uma distribuição homogênea 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 entomopatogénos

Utilizou-se no tratamento das amostras recolhidas o método de flutuação-centrifugação (DALMASSO, 1966) e o método de "Galleria trap" (BEDDING e AKHURST, 1975). Neste, 6 larvas de um insecto, *Galleria 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 entomoparasitas

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

Todos os nemátodos isolados foram mantidos em laboratório sobre larvas de *G. mellonella*.

Isolamento de fungos entomopatogénicos

O isolamento de fungos entomopatogénicos a partir das larvas com sintomas de micose decorreu por inoculação em dextrose gelosada de "Sabouraud", suplementada com 1% de extrato de levedura (SDAY) (HUMBER, in press). Testou-se a patogenicidade de todos os isolados obtidos sobre *G. mellonella*, por inoculação tópica de conídios obtidos em cultura em SDAY, durante 10 dias a 22°C.

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 (POIKAR e THOMAS, 1967). As bactérias isoladas estão a ser caracterizadas por técnicas morfológicas, bioquímicas e metabólicas.

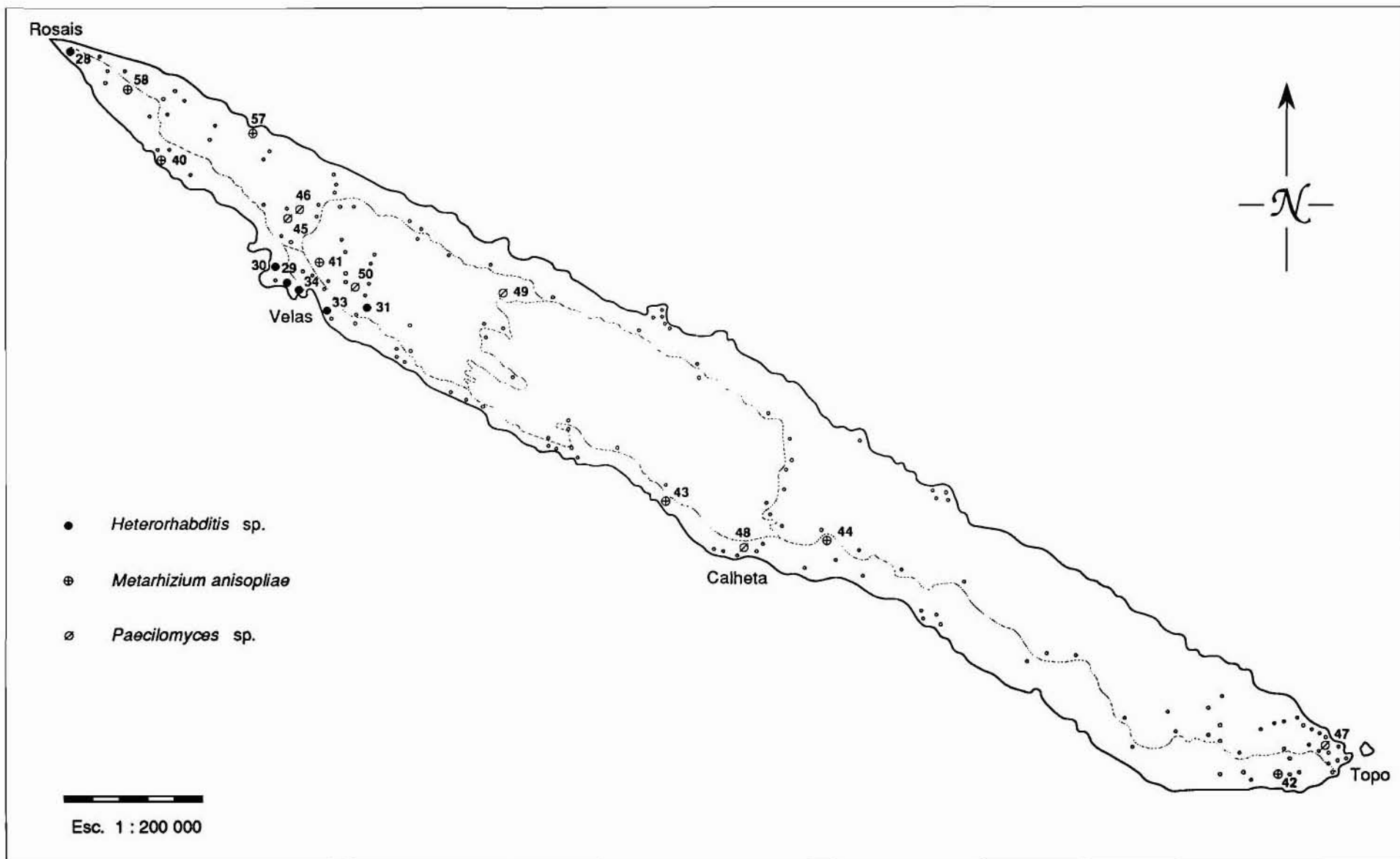


Figura 1. Distribuição das estações de recolha de solo na Ilha de S. Jorge e localização dos agentes patogénicos isolados. Os números correspondem à identificação de colecção.

Quadro 1. Caracterização das estações e recolhas de nemátodos e fungos efectuadas. Amostras positivas (+) e negativas (-).

Estação	Local	Altitude	Habitat	Nemátodos	Fungos
SJ 1	Pico dos Cutelos	380	Pastagem	+	-
SJ 2	Pico dos Cutelos	350	Pastagem	-	+
SJ 3	R. EN1	300	<i>Erica azorica</i>	-	+
SJ 4	Farol dos Rosais	250	<i>Erica azorica</i>	+	-
SJ 5	R. EN1 - C. dos Almos	350	Pastagem	+	-
SJ 6	R. EN1	400	Campo cultivado	+	+
SJ 7	Sete Fontes	425	<i>Criptomeria japonica</i>	+	-
SJ 8	Sete Fontes	425	Pastagem	+	+
SJ 9	Sete Fontes	400	Pastagem	+	-
SJ 10	Ponta	350	Campo cultivado	+	-
SJ 11	Ponta	350	<i>Criptomeria japonica</i>	-	-
SJ 12	Pedregulho	175	Campo cultivado	+	-
SJ 13	Pedregulho	200	Pastagem	+	-
SJ 14	Pedregulho	200	Floresta	-	+
SJ 15	Ponta Ruiva	250	Pastagem	+	-
SJ 16	Canada da Preguiça	325	Pastagem	+	+
SJ 17	Canada da Preguiça	350	Floresta	+	-
SJ 18	Tronqueira	425	Pastagem	-	+
SJ 19	Covas do Barro	400	Pastagem	+	-
SJ 20	Covas do Barro	400	Floresta	+	-
SJ 21	Canadinha Nova	350	Floresta	-	+
SJ 22	Canto da Relva	250	Campo cultivado	+	+
SJ 23	Canto da Relva	250	Pastagem	+	+
SJ 24	Canto da Relva	250	Pastagem	+	-
SJ 25	R.EN1 - Rosais	150	Campo cultivado	+	+
SJ 26	R.EN1 - Rosais	150	Pastagem	+	-
SJ 27	R.EN1 - Figueiras	150	Pastagem	+	-
SJ 28	Morro Grande - Velas	25	Pastagem	+	-
SJ 29	Morro Grande - Velas	25	Campo cultivado	+	-
SJ 30	Morro Grande - Velas	50	Pastagem	+	-
SJ 31	Fonte das Eiras	25	Pastagem	+	-
SJ 32	Cais do Topo	25	Pastagem	-	+
SJ 33	Topo	75	Campo cultivado	-	+
SJ 34	Ponta do Topo	75	Vinha	+	+
SJ 35	Ponta do topo	50	Vinha	-	-
SJ 36	Ponta do Topo	25	Pastagem	-	+
SJ 37	Cabeço da Forca	125	Pastagem	+	-
SJ 38	Cabeço da Forca	125	Campo cultivado	-	+
SJ 39	Correios - Topo	175	Pastagem	+	-
SJ 40	S. Pedro	100	Campo cultivado	+	+
SJ 41	Cabeço da Forca	125	Pastagem	-	+
SJ 42	Cabeço da Forca	125	Campo cultivado	-	+
SJ 43	Ponta de S. Gonçalo	75	Pastagem	-	+
SJ 44	Lomba	150	Pastagem	+	-
SJ 45	Lomba	150	Campo cultivado	-	+
SJ 46	Engenho	275	Pastagem	+	+
SJ 47	Engenho	275	Campo cultivado	+	-
SJ 48	Engenho	275	<i>Erica azorica</i>	-	-
SJ 49	Barreiro	275	Pastagem	-	+
SJ 50	Barreiro	275	Campo cultivado	+	-
SJ 51	Santa Rosa	200	Campo cultivado	-	+
SJ 52	Santa Rosa	175	Pastagem	+	-

Estação	Local	Altitude	Habitat	Nemátodos	Fungos
SJ 54	S. Antão	275	Pastagem	-	-
SJ 55	S. Antão	275	Campo cultivado	-	-
SJ 56	Caminho da Pedra	200	Campo cultivado	-	+
SJ 57	S. Antão	350	Campo cultivado	+	-
SJ 58	Caminho do Pico	350	Pastagem	+	+
SJ 59	Caminho do Pico	350	<i>Criptomeria japonica</i>	-	+
SJ 60	Caminho do Pico	400	Pastagem	+	-
SJ 61	Caminho do Pico	450	<i>Juniperus brevifolia</i>	+	-
SJ 62	Caminho do Pico	450	Pastagem	-	-
SJ 63	Pasto	425	Pastagem	+	+
SJ 64	Pasto	500	Pastagem	-	+
SJ 65	Caminho da F. de S. João	425	Pastagem	+	-
SJ 66	Terreiros	550	Pastagem	+	+
SJ 67	Pedras Brancas	725	Pastagem	-	+
SJ 68	EN2 - 10 Km	700	Floresta	+	-
SJ 69	EN2 - 10 Km	700	Pastagem	+	-
SJ 70	EN2 - 8 Km	650	Pastagem	+	+
SJ 71	EN2 - 5 Km	575	Pastagem	+	-
SJ 72	EN2 - Silvadão	325	Floresta	+	+
SJ 73	EN2 - 1 Km	225	Pastagem	+	+
SJ 74	Serra da Piedade	200	Campo cultivado	+	-
SJ 75	Serra da Piedade	200	Pastagem	+	-
SJ 76	Cais da Queimada	25	<i>Erica azorica</i>	+	+
SJ 77	Cais da Queimada	25	Vinha	+	+
SJ 78	Queimada	50	Campo cultivado	+	+
SJ 79	Queimada	50	Pastagem	+	-
SJ 80	Porto - F. de S. Amaro	10	Pastagem	+	-
SJ 81	Fajã de S. Amaro	10	Floresta	+	-
SJ 82	Fajã de S. Amaro	75	Eucaliptal	+	-
SJ 83	Fajã de S. Amaro	75	Figueiras	+	-
SJ 84	Cais das Manadas	25	Bananas	+	-
SJ 85	Cais das Manadas	25	Campo cultivado	+	+
SJ 86	Manadas	75	Campo cultivado	-	-
SJ 87	Fajã das Almas	100	Vinha	+	-
SJ 88	Ladeiras	200	Campo cultivado	-	-
SJ 89	Pedreira	325	Pastagem	+	-
SJ 90	Pedreira	325	Campo cultivado	+	-
SJ 91	Fenos	475	Pastagem	+	-
SJ 92	Valinhos	325	Campo cultivado	-	-
SJ 93	Valinhos	325	Pastagem	+	+
SJ 94	Portinho - F. Grande	10	Pastagem	+	-
SJ 95	Fajã Grande	25	Vinha	+	+
SJ 96	Calheta	10	Campo cultivado	+	-
SJ 97	Calheta	10	Vinha	+	+
SJ 98	Calheta	10	Campo cultivado	+	+
SJ 99	Rua de Baixo - Calheta	125	Campo cultivado	+	+
SJ 100	Ribeira Seca	100	Pastagem	-	-
SJ 101	Fajã dos Vimes	10	Pastagem	-	-
SJ 102	Fajã dos Vimes	10	Campo cultivado	+	+
SJ 103	Fajã dos Vimes	10	Campo cultivado	+	-
SJ 104	Fajã dos Vimes	25	Campo cultivado	-	-
SJ 105	Ribeira Seca	150	Campo cultivado	+	+
SJ 106	Ribeira Seca	125	Campo cultivado	-	-
SJ 107	Silveira	250	Pastagem	-	+

Estação	Local	Altitude	Habitat	Nemátodos	Fungos
SJ 109	EN1 - Nortes	325	Pastagem	+	-
SJ 110	EN1 - Nortes	325	Pastagem	+	-
SJ 111	EN1 - N. Pequeno, Km 29	425	Floresta	-	-
SJ 112	EN1 - Brenha	475	Pastagem	+	+
SJ 113	EN1 - Nortes	500	Pastagem	+	+
SJ 114	EN1 - Nortes	500	Campo cultivado	+	-
SJ 115	Norte Pequeno	475	Pastagem	+	-
SJ 116	Norte Pequeno	475	Pastagem	+	-
SJ 117	Ribeira da Areia	400	Pastagem	+	-
SJ 118	Ribeira da Areia	425	Campo cultivado	+	-
SJ 119	Urzelina	10	Campo cultivado	+	-
SJ 120	Urzelina	10	Pastagem	-	-
SJ 121	EN3 - Nortes	500	Pastagem	+	-
SJ 122	EN3 - Nortes	700	Pastagem	-	-
SJ 123	EN3 - Nortes	700	Pastagem	+	-
SJ 124	EN3 - Nortes	725	Pastagem	+	-
SJ 125	EN3 - Nortes. 12 Km	700	Pastagem	+	+
SJ 126	Fajã do Ouvidor	25	Vinha	-	-
SJ 127	Fajã do Ouvidor	25	Pastagem	+	+
SJ 128	Fajã do Ouvidor	25	Campo cultivado	-	+
SJ 129	Fajã do Ouvidor	25	Campo cultivado	+	-
SJ 130	Fajã do Ouvidor	25	Vinha	-	+
SJ 131	Norte Grande	300	Campo cultivado	+	+
SJ 132	Norte Grande	350	Pastagem	-	-
SJ 133	Santo António	525	Pastagem	+	-
SJ 134	Pico da Ponta Furada	600	Pastagem	+	-
SJ 135	Toledo	550	Pastagem	+	-
SJ 136	Cerrado dos Penedos	450	Campo cultivado	-	-
SJ 137	Cerrado dos Penedos	450	<i>Criptomeria japonica</i>	-	-
SJ 138	Cerrado dos Penedos	475	Pastagem	+	+
SJ 139	Santo Amaro	300	Pastagem	+	-
SJ 140	Santo Amaro	275	Campo cultivado	+	+
SJ 141	F. de Santo Amaro	150	Floresta	+	-
SJ 142	Urzelina	25	Floresta	+	-
SJ 143	Santo Amaro	375	Pastagem	+	-
SJ 144	Santo Amaro	350	Campo cultivado	+	-
SJ 145	Santo Amaro	275	Campo cultivado	+	-
SJ 146	Santo Amaro	300	Pastagem	+	+
SJ 147	EN1 - Velas	250	Pastagem	-	+
SJ 148	EN1 -Velas	250	Campo cultivado	+	-
SJ 149	Ribeira do Almeida	375	Campo cultivado	-	-
SJ 150	Ribeira do Almeida	375	<i>Criptomeria japonica</i>	-	+
SJ 151	Cimo do Corão	350	Campo cultivado	+	-
SJ 152	Cimo do Corão	350	Pastagem	+	+
SJ 153	Pico da Barroca	400	Pastagem	-	-
SJ 154	Pico da Barroca	375	Campo cultivado	+	-
SJ 155	Entrepicos	450	<i>Criptomeria japonica</i>	+	-
SJ 156	Entrepicos	450	Pastagem	-	+
SJ 157	Casa do Telhal	400	Pastagem	+	+
SJ 158	Casa do Telhal	400	<i>Criptomeria japonica</i>	-	-
SJ 159	Fajã de S. Cristo	10	Pastagem	-	+
SJ 160	Fajã de S. Cristo	10	Pastagem	-	-
SJ 161	Fajã dos Cubres	10	Pastagem	-	+
SJ 162	Fajã de S. Cristo	10	Campo cultivado	-	-
SJ 163	Fajã de S. Cristo	10	Pastagem	-	-

Identificação dos fungos parasitas de insectos

Os isolados de fungos parasitas de insectos foram identificados por análise morfológica (BARNETT e HUNTER, 1987; CARMICHAEL et al., 1980; HUMBER, in press), 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 esteril com arejamento permanente sob temperatura controlada (10°C) e as bactérias simbiotes do nemátodo e os fungos em crioconservação (-80°C).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tendo em conta a pesquisa que se pretende a amostragem realizada na ilha de S. Jorge considera-se satisfatória uma vez que se conseguiu uma distribuição bastante homogênea. Das amostras de solo recolhidas 67% apresentavam nemátodos e 40% apresentava 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 163 amostras realizadas em S. Jorge recolheram-se 6 isolados de nemátodos entomoparasitas e 13 de fungos entomopatogénicos (Quadro 2).

Em coberto endémico, *Erica azorica*, 50% das amostras recolhidas apresentavam nemátodos entomoparasitas enquanto que essa frequência em solo cultivado e em pastagem foi apenas de 4.2% e 2.5% respectivamente. 66% das amostras positivas para estes nemátodos ficam situadas abaixo dos 150 m com os 3 tipos de coberto vegetal referido. Os campos cultivados diziam respeito a um campo de milho situado nas Velas (estação SJ 29) e a um campo de trevoço em Sto. Amaro (estação SJ 140) a 25 e 275 m de altitude, respectivamente. As 2 pastagens ficavam situadas no Morro Grande das Velas (estação SJ 30) e na Fonte das Eiras das Velas (estação SJ 31) a 50 e 25 m de altitude, respectivamente.

Com base em dados biométricos os 6 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*. Os ensaios de determinação da espécie dos nemátodos estão a decorrer constituindo material de investigação para doutoramento do Lic. José Silvino Rosa e a caracterização das bactérias constitui o trabalho para APCC da Lic. Carla Mendes.

No respeitante a fungos entomopatogénicos, todos os isolados foram caracterizados como pertencendo à ordem Moniliales, família Moniliaceae: 7 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e 6 do género *Paecilomyces* (Quadro 2).

Apenas 7.6% dos isolados fúngicos foram recolhidos sob coberto florestal, o que corresponde a apenas 0.5% das amostras efectuadas neste habitat. Os restantes isolados foram provenientes das amostras de solo cultivado e de pastagem (46.2% em cada um destes cobertos vegetais). Em solo cultivado, observou-se uma predominância da frequência de *Paecilomyces* sobre a de *M. anisopliae* (8.3% e 4.2% das amostras recolhidas, respectivamente), enquanto que em pastagem se registou precisamente o inverso (2.5% e 4.9%, respectivamente). Dos isolados

recolhidos em áreas cultivadas 75% foram provenientes de campos de milho, sendo os restantes originários de batatal. Para além do coberto vegetal, a altitude parece também desempenhar um papel importante na distribuição destes patógenos, 85% dos isolados foram recolhidos em estações situadas acima dos 200 m de altitude, sendo todos os exemplares de *M. anisopliae* isolados de solos localizados entre 200 e 400 m.

Estão em curso os ensaios para a determinação específica dos isolados de *Paecilomyces*.

O material biológico recolhido faz parte da Colecção de Entomopatogenos dos Açores CEA (DB/UA), com a designação indicada no Quadro 2.

Quadro 2. Estações onde foram isolados nematodos e fungos entomopatogéneos. A designação dos isolados diz respeito à respectiva referência em colecção CEA (DB/UA). As amostras negativas estão assinaladas com (-)

Estação	Local	Altitude	Habitat	<i>Heterorhabditis</i>	<i>M. anisopliae</i>	<i>Paecilomyces</i>
SJ 4	Rosais (Farol)	250	<i>Erica azorica</i>	Az 28	-	-
SJ 6	R. EN1	400	campo cultivado	-	Az 58	-
SJ 14	Pedregulho	200	floresta	-	Az 40	-
SJ 18	Tronqueira	425	pastagem	-	Az 57	-
SJ 22	Canto da Relva	250	campo cultivado	-	-	Az 45
SJ 23	Canto da Relva	250	pastagem	-	-	Az 46
SJ 29	Velas (Morro Grande)	25	campo cultivado	Az 29	-	-
SJ 30	Velas (Morro Grande)	50	pastagem	Az 34	-	-
SJ 31	Fonte das Eiras	25	pastagem	Az 30	-	-
SJ 38	Cabeço da Forca	125	campo cultivado	-	-	Az 47
SJ 51	Santa Rosa	200	campo cultivado	-	Az 42	-
SJ 73	EN2 - Km 1	225	pastagem	-	Az 41	-
SJ 76	Queimada (Cais)	25	<i>Erica azorica</i>	Az 33	-	-
SJ 93	Valinhos	325	pastagem	-	Az 43	-
SJ 96	Calheta	10	campo cultivado	-	-	Az 48
SJ 107	Silveira	250	pastagem	-	Az 44	-
SJ 125	Nortes (EN3 - Km 12)	700	pastagem	-	-	Az 49
SJ 140	Santo Amaro	275	campo cultivado	Az 31	-	-
SJ 144	Santo Amaro	350	campo cultivado	-	-	Az 50

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.
- DALMASSO, A. 1966. Méthode simple d'extraction des nematodes du sol. *Rev. Ecol.*

- Biol. Sol.* 3: 473-478.
- HUMBER, R. A. in press. *Fungal Pathogens of Insects, Spiders, and Mites: Isolation, Preservation and Identification.*
- 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.