

PESQUISA DE AGENTES ENTOMOPATOGÉNICOS NA ILHA DO FAIAL (AÇORES)

J. S. ROSA, A. MARTINS, C. RIBEIRO, F. PALHA, F. BEM, F. FREITAS & N. SIMÕES

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

RESUMO

Durante a "Expedição Científica Faial 1993" 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" e a técnica de flutuação-centrifugação isolaram-se 2 nemátodos do género *Heterorhabditis*, todos morfologicamente próximos de *H. bacteriophora*, e 36 fungos, 21 identificados como *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e 15 do género *Paecilomyces*.

ABSTRACT

A survey for entomopathogens in soil samples was carried during the "Scientific Expedition Faial 1993" as part of a project of survey and characterization of insect parasites on the Azores. Two heterorhabditids were isolated with the "Galleria trap method", all morphologically close to *Heterorhabditis bacteriophora*, and 36 fungi, 21 identified as *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* and 15 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 identificação sistemática de nemátodos e fungos entomopatogénicos recolhidos durante a "Expedição Científica Faial 1993".

MATERIAL E MÉTODOS

Recolha das amostras de solo

Entre 27 de Junho e 1 de Julho de 1993 recolheram-se na Ilha do Faial amostras de solo em 142 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 (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 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 entomopatogéneos

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 de *G. mellonella* com sintomas de micose decorreu por inoculação em dextrose gelosada de "Sabouraud", suplementada com 1% de extrato de levedura (SDAY) (HUMBER, in press).

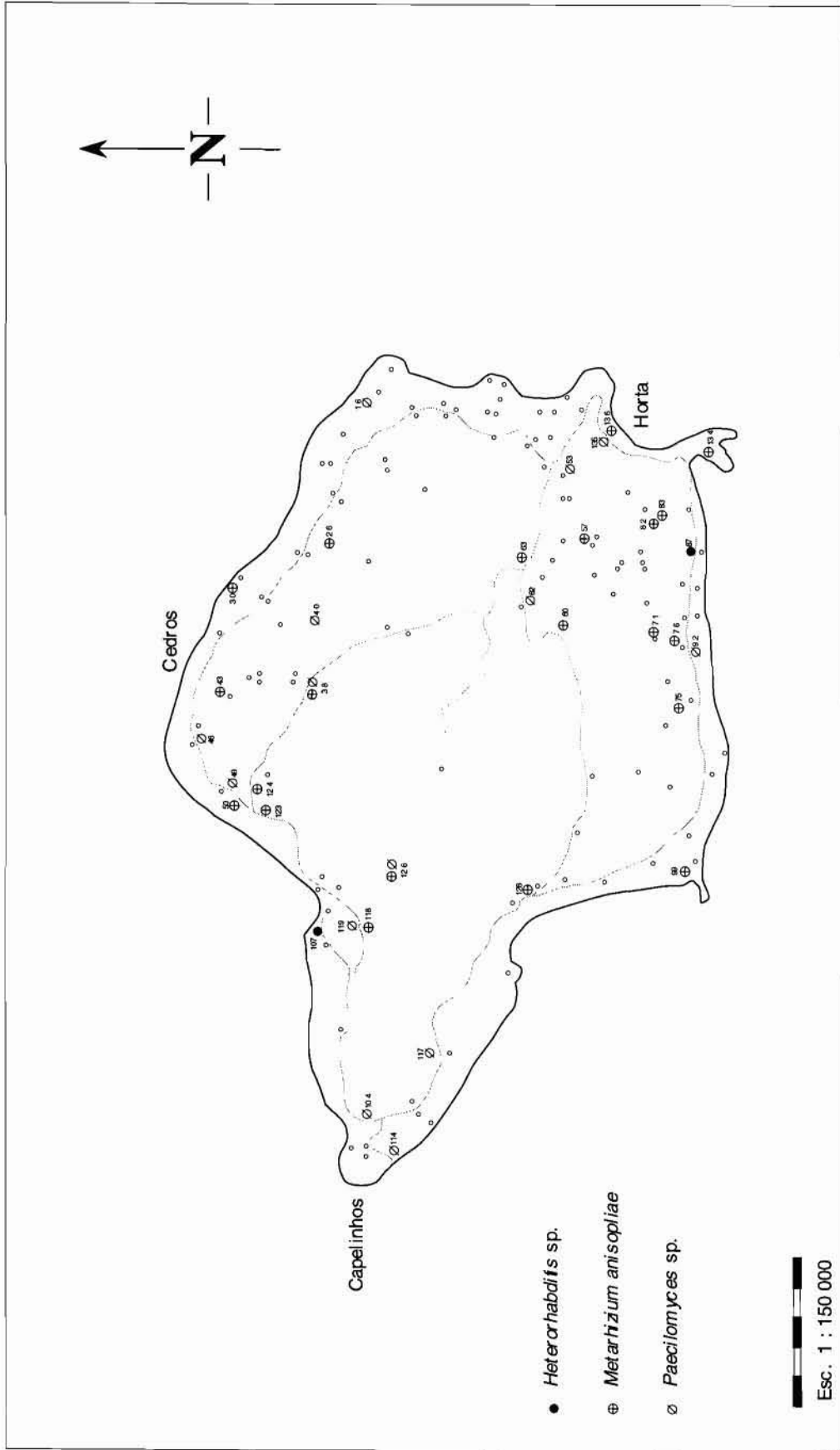


Figura 1. Distribuição das estações de recolha de solo na Ilha do Faial e localização dos agentes patogénicos isolados. Os números correspondem à identificação da estação.

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

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 estéril com arejamento permanente sob temperatura controlada (10°C) e as bactérias simbiotes do nemátodo e os fungos em criopreservação (-80°C).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tendo em conta a pesquisa que se pretende a amostragem realizada na ilha do Faial considera-se satisfatória uma vez que se conseguiu uma distribuição bastante homogénea. Das amostras de solo recolhidas 91,6% apresentavam nemátodos e 61,3% 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 142 amostras realizadas no Faial recolheram-se 2 isolados de nemátodos entomoparasitas e 36 de fungos entomopatogénicos (Quadro 2).

As amostras positivas de nemátodos diziam respeito a uma pastagem situada no Alto da Laginha (estação F 87) e a *Erica azorica*, situada na Fajã (estação F 107), ambas a 25 m de altitude.

Com base em dados biométricos os 2 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.

No respeitante a fungos entomopatogénicos, todos os isolados foram caracterizados como pertencendo à sub-divisão Deuteromycotina classe Hyphomycetes: 21 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e 15 do género *Paecilomyces* (Quadro 2).

Os isolados fúngicos foram sobretudo recolhidos nas amostras de solo cultivado e de pastagem (44,4% e 47,2% respectivamente em cada um destes cobertos vegetais). Os restantes isolados (8,3%) provieram de amostras de habitats diversos – cinza vulcânica, fruteiras e bosque de salgueiros. Nenhum isolado foi recolhido nas amostras recolhidas sob coberto florestal. Observou-se uma predominância da frequência de *M. anisopliae* sobre a de *Paecilomyces*, tanto em solo cultivado (17,5% e 7,9% das amostras recolhidas, respectivamente), como em pastagem (13,7% e 9,6% das amostras deste habitat, respectivamente). Dos isolados recolhidos em áreas cultivadas a maioria (56,3%) foram provenientes de campos de milho, sendo os restantes originários zonas de cultura de feijão (18,7%), batata (12,5%) e outras hortícolas diversificadas (12,5%). Atendendo às reduzidas dimensões da ilha e à fraca variação de altitude, esta não parece desempenhar um papel importante na distribuição dos patogénicos.

Estão em curso os ensaios para a determinação específica dos isolados de *Paecilomyces*. O material biológico recolhido faz parte da Coleção 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.
- DALMASSO, A. 1966. Méthode simple d'extraction des nématodes 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.

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

Estação	Local	Altitude	Habitat	Nemátodos	Fungos
F 1	EN - Praia do Almoxarife	140	Pastagem	+	—
F 2	EN - Praia do Almoxarife	140	Campo cultivado	+	—
F 3	EN - Pedro Miguel	140	Pastagem	+	—
F 4	Porto de P. Miguel	10	Pastagem	+	+
F 5	C ^o do porto de P. Miguel	50	Pastagem	+	—
F 6	Arrocheia (P. Miguel)	50	Junco	+	—
F 7	Grota Funda (P. Miguel)	70	Campo cultivado	+	—
F 8	Grota Funda (P. Miguel)	70	Pastagem	+	+
F 9	EN - P. Miguel	140	Campo cultivado	+	—
F 10	EN - P. Miguel	150	Pastagem	—	+
F 11	EN - P. Miguel	140	Pastagem	+	—
F 12	Chã da Cruz	100	Pastagem	+	+
F 13	Chã da Cruz	100	Campo cultivado	—	+
F 14	Farol da Ribeirinha	110	Pastagem	+	—
F 15	Ribeirinha	170	Pastagem	+	—
F 16	Ribeirinha	170	Pastagem	+	+
F 17	Atrás da Serra	190	Campo cultivado	+	—
F 18	Cabeço do Nunes	200	Campo cultivado	+	—
F 19	Cabeço do Nunes	200	Pastagem	—	—
F 20	Espalhafatos	230	Campo cultivado	+	+
F 21	Espalhafatos	230	Pastagem	+	—
F 22	EN - Ribeirinha	150	Campo cultivado	+	—
F 23	EN - Ribeirinha	190	Pastagem	+	—
F 24	Ribeirinha	300	Pastagem	+	+
F 25	Alto da Pedreira	480	Pastagem	+	—
F 26	Espalhafatos	280	Pastagem	+	+
F 27	Carapeto de Baixo (Salão)	180	Pastagem	+	+
F 28	Carapeto de Baixo (Salão)	180	Campo cultivado	+	+
F 29	Porto do Salão	50	Campo cultivado	—	—
F 30	Porto do Salão	50	Pastagem	+	+
F 31	Salão	100	Campo cultivado	+	+
F 32	Salão	100	Pastagem	+	—
F 33	Ribeira do Pinheiro	80	Campo cultivado	+	+
F 34	Outeiro (Cedros)	170	Campo cultivado	+	—
F 35	Outeiro (Cedros)	170	Campo cultivado	+	—
F 36	Cedros	280	Campo cultivado	+	—
F 37	Cedros	280	Campo cultivado	+	—
F 38	Miradouro dos Cedros	450	Pastagem	+	+
F 39	Cabouco Velho	510	Pastagem	+	—
F 40	Salão	250	Pastagem	+	+
F 41	Canada da D. Catarina	150	Pastagem	+	—
F 42	Rua de Cima (Cedros)	160	Campo cultivado	+	—
F 43	Miragaia (Cedros)	140	Campo cultivado	+	+
F 44	Miragaia (Cedros)	140	Pastagem	+	+
F 45	Cascalho de Baixo	130	Campo cultivado	+	+
F 46	Cascalho de Baixo	130	Campo cultivado	+	+
F 47	Cascalho de Baixo	130	Pastagem	+	—
F 48	R ^a de Joana Pires	200	Campo cultivado	+	+
F 49	R ^a de Joana Pires	200	Campo cultivado	+	+
F 50	R ^a de Joana Pires	200	Campo cultivado	+	+
F 51	Ribeira do André	500	Mata	+	—
F 52	Santo Amaro	110	Pastagem	+	+
F 53	Santo Amaro	110	Campo cultivado	+	+
F 54	Farrobo	120	Pastagem	+	+
F 55	Farrobo	120	Campo cultivado	+	+
F 56	Flamengos	130	Campo cultivado	—	+
F 57	Flamengos	120	Campo cultivado	—	+
F 58	Flamengos	120	Pastagem	+	+

Amostras positivas (+) e negativas (—).

Quadro 1. Caracterização das estações e recolhas de nemátodos e fungos efectuadas (cont.).

Estação	Local	Altitude	Habitat	Nemátodos	Fungos
F 59	Flamengos	120	Campo cultivado	+	—
F 60	Flamengos	370	Pastagem	+	+
F 61	EN - Flamengos	410	Mata	+	+
F 62	EN - Flamengos	410	Pastagem	+	+
F 63	Largo Jaime Melo	320	Mata	—	+
F 64	Rua Nova (Flamengos)	250	Pastagem	+	+
F 65	Rua Nova (Flamengos)	200	Campo cultivado	+	+
F 66	Cruz do Bravo	140	Pastagem	+	+
F 67	Lameiro Grande	130	Campo cultivado	+	—
F 68	Lameiro Grande	130	Pastagem	+	+
F 69	Portela (Feteira)	130	Campo cultivado	+	+
F 70	Cimo de S. Pedro	80	Campo cultivado	+	+
F 71	Farrobim do Sul	110	Pastagem	+	+
F 72	Farrobim do Sul	110	Campo cultivado	+	+
F 73	Farrobim do Sul	160	Campo cultivado	+	—
F 74	Ribeirinha	120	Pastagem	+	—
F 75	Ribeirinha	110	Campo cultivado	+	+
F 76	Travessa do Pedregulho	70	Campo cultivado	+	+
F 77	Travessa do Pedregulho	70	Campo cultivado	+	+
F 78	Feteira de Baixo	20	Campo cultivado	+	—
F 79	Cruz da Portela	120	Pastagem	+	+
F 80	Cruz da Portela	120	Campo cultivado	+	+
F 81	Cruz da Portela	120	Campo cultivado	+	+
F 82	Santa Bárbara	90	Campo cultivado	+	+
F 83	Santa Bárbara	70	Pastagem	+	+
F 84	Santa Bárbara	100	Campo cultivado	+	—
F 85	Monte Carneiro	150	Pastagem	+	—
F 86	Pasteleiro	10	Campo cultivado	+	—
F 87	Alto da Laginha	20	Pastagem	+	—
F 88	Alto da Laginha	20	Pastagem	+	+
F 89	Porto da Feteira	5	Campo cultivado	+	+
F 90	EN - Feteira	50	Campo cultivado	+	+
F 91	EN - Feteira	50	Campo cultivado	+	+
F 92	EN - Feteira	40	Pomares	+	+
F 93	Porto de Castelo Branco	10	Pastagem	+	—
F 94	Cº do porto (C. Branco)	20	Campo cultivado	+	+
F 95	Castelo Branco	110	Pastagem	+	+
F 96	Almancos de Baixo	150	Campo cultivado	+	+
F 97	Cº do Morro do Castelo	100	Campo cultivado	+	+
F 98	Cº do Morro do Castelo	80	Pastagem	+	+
F 99	Cº do Morro do Castelo	80	Campo cultivado	+	+
F 100	Lombega	150	Pastagem	+	—
F 101	Grota do Meio	200	Pastagem	+	—
F 102	Grota das Flores	300	Pastagem	+	—
F 103	Varadouro	100	Vinha	+	+
F 104	Caldeirinhas	150	Areia	+	+
F 105	Norte Pequeno	150	Campo cultivado	+	+
F 106	Fajã	70	Vinha	+	—
F 107	Fajã	10	Floresta	+	—
F 108	Fajã	50	Campo cultivado	+	—
F 109	Canto (Capelo)	120	Pastagem	—	+
F 110	Canto (Capelo)	120	Campo cultivado	+	+
F 111	Farol dos Capelinhos	50	Canavial	+	—
F 112	Costado da Nau	20	Chorões	+	+
F 113	Vulcão	20	Chorões	—	—
F 114	Porto dos Capelinhos	10	Chorões	—	+
F 115	Capelo	20	Canavial	+	+
F 116	Capelo	180	Pastagem	+	+

Amostras positivas (+) e negativas (—).

Quadro 1. Caracterização das estações e recolhas de nemátodos e fungos efectuadas (cont.).

Estação	Local	Altitude	Habitat	Nemátodos	Fungos
F 117	Capelo	180	Campo cultivado	+	+
F 118	Praia do Norte	270	Pastagem	+	+
F 119	Praia do Norte	280	Campo cultivado	+	+
F 120	Espanha	220	Campo cultivado	+	—
F 121	Espanha	220	Pastagem	+	—
F 122	Espanha	220	Campo cultivado	+	+
F 123	Ribeira Funda	290	Pastagem	+	+
F 124	Ribeira Funda	300	Pastagem	+	+
F 125	Ribeira Funda	300	Pastagem	+	+
F 126	Miradouro	450	Pastagem	+	+
F 127	Caldeira	1000	Pastagem	+	+
F 128	Ribeira do Cabo	300	Pastagem	+	+
F 129	Ribeira do Cabo	280	Campo cultivado	+	+
F 130	Ribeira do Cabo	250	Campo cultivado	+	—
F 131	Lombega	380	Pastagem	+	+
F 132	Cerrado do Martins	490	Pastagem	+	—
F 133	Tronqueiras (C. Branco)	320	Pastagem	+	—
F 134	Monte da Guia	100	Pastagem	+	+
F 135	Espalamaca	70	Pastagem	—	+
F 136	Espalamaca	70	Campo cultivado	+	+
F 137	Espalamaca	150	Pastagem	+	+
F 138	Fernandega	150	Campo cultivado	+	—
F 139	Canada da Ribeira	10	Pastagem	+	+
F 140	Canada da Ribeira	60	Pastagem	+	+
F 141	C ^o do Meio (P. Almojarife)	50	Pastagem	+	+
F 142	Praia do Almojarife	5	Pastagem	—	—

Amostras positivas (+) e negativas (—).

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

Estação	Local	Altitude	Habitat	<i>Heterorhabditis</i>	<i>M. anisopliae</i>	<i>Paeclomyces</i>
F 16	Ribeirinha	170	pastagem	—	—	Az 132
F 16	Ribeirinha	170	pastagem	—	—	Az 139
F 26	Espalhafatos	280	pastagem	—	Az 113	—
F 30	Salão	100	campo cultivado	—	Az 131	—
F 38	Cedros (Miradouro)	450	pastagem	—	—	Az 119
F 38	Cedros (Miradouro)	450	pastagem	—	Az 134	—
F 40	Salão	250	pastagem	—	—	Az 104
F 43	Cedros (Miragaia)	140	campo cultivado	—	Az 106	—
F 46	Cascalho Baixo	130	campo cultivado	—	—	Az 101
F 49	Ribeira Joana Pires	200	campo cultivado	—	—	Az 102
F 50	Ribeira Joana Pires	200	campo cultivado	—	Az 115	—
F 53	Santo Amaro	110	campo cultivado	—	—	Az 97
F 57	Flamengos	120	campo cultivado	—	Az 124	—
F 60	Flamengos	370	pastagem	—	Az 120	—
F 62	Flamengos (EN)	410	pastagem	—	—	Az 103
F 63	Flamengos (EN)	410	pastagem	—	Az 125	—
F 71	Farrobim do Sul	110	pastagem	—	Az 116	—
F 75	Ribeirinha	110	campo cultivado	—	Az 118	—
F 76	Feteira (Trav. Pedregulho)	70	campo cultivado	—	Az 108	—
F 82	Santa Bárbara	90	campo cultivado	—	Az 110	—
F 83	Santa Bárbara	70	campo cultivado	—	Az 121	—
F 87	Feteira (Laginha)	20	pastagem	Az 39	—	—
F 92	Feteira (EN)	40	fruteiras/vinha	—	—	Az 98
F 99	Cam. Morro do Castelo	80	campo cultivado	—	Az 128	—
F 104	Caldeirinhas	150	areia vulcânica	—	—	Az 126
F 107	Fajã	10	<i>Erica azorica</i>	Az 141	—	—
F 114	Capelinhos (Porto)	10	salgueiro	—	—	Az 99
F 117	Capelo	180	campo cultivado	—	—	Az 123
F 118	Praia do Norte	270	pastagem	—	Az 111	—
F 119	Praia do Norte	280	campo cultivado	—	—	Az 100
F 123	Ribeira Funda	290	pastagem	—	Az 107	—
F 124	Ribeira Funda	300	campo cultivado	—	Az 114	—
F 126	Miradouro	450	pastagem	—	—	Az 112
F 126	Miradouro	450	pastagem	—	Az 129	—
F 128	Ribeira do Cabo	300	pastagem	—	Az 130	—
F 134	Monte da Guia	100	pastagem	—	Az 109	—
F 135	Espalamaca	70	pastagem	—	—	Az 105
F 136	Espalamaca	70	campo cultivado	—	Az 117	—

As amostras negativas estão assinaladas com (—).