

A serologia para avaliação do papel dos predadores em olival biológico

Santos, S.,² Rodrigues, M-C.¹; Pereira, J.A.²; Rei, F.³; Cortez, I.¹; Torres, L.¹ e Pereira, A-M.¹

1-CECEA-Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2-Escola Superior Agrária de Bragança, 3-Universidade de Évora

Resumo

A oliveira, sendo uma planta mediterrânea, encontra-se bem adaptada em Portugal. Apesar de ser uma cultura com poucos problemas fitossanitários, por vezes é sujeita à acção de algumas pragas e doenças. De entre as pragas de artrópodos destacam-se a traça da oliveira, *Prays oleae* (Bern.), a mosca da azeitona, *Bactrocera oleae* (Gmel.) e a cochonilha negra, *Saissetia oleae* (Oliv.). No entanto, as populações destes inimigos podem ser mantidas abaixo do nível económico de ataque por factores abióticos e/ou por outros artrópodos, espécies predadoras e parasitóides, que contribuem para a estabilidade da biocenose no olival. A valorização destes auxiliares é, assim, um factor preponderante na protecção contra pragas da oliveira, nomeadamente em modo de produção biológico.

A utilização de técnicas serológicas, particularmente ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), para avaliação da predação em artrópodos, já é bastante utilizada em vários países mas, ainda não em Portugal.

Este trabalho refere a caracterização de antissoros policlonais para monitorizar as três pragas nos seus principais predadores. Evidencia-se o comportamento dos antissoros para os respectivos antígenos homólogos e heterólogos, assim como o primeiro teste com *Chrysoperla carnea* (predador comum nos olivais) em condições laboratoriais. Os antissoros serão utilizados na avaliação do papel dos predadores em olivais conduzidos de acordo com o modo de produção biológico, em Trás-os-Montes e no Alentejo.

Palavras-chave: protecção de plantas, *Prays oleae*, *Bactrocera oleae*, *Saissetia oleae*, antissoro policlonal, ELISA.

Abstract

Olive tree, being a mediterranean plant, is well adapted in Portugal. However, sometimes is attacked by pests, namely the olive moth, *Prays oleae* (Bern.), the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmel.) and the black scale, *Saissetia oleae* (Oliv.). Populations of those insects may be sustained under the economic threshold by abiotic and/or biotic factors. Among those we may include predators and parasitoids. The valorization of arthropods is, therefore, a preponderant factor in olive crop protection, namely in organic farming.

Serological techniques, namely ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), to study arthropod predation are already frequently used but, not yet in Portugal.

This work refers to the characterization of polyclonal antisera for monitoring the three main olive pests in their predators. The behavior of the antisera with homologous and heterologous antigens is presented as well a preliminary assay with *Chrysoperla carnea* (common predator in olive orchards) in laboratory conditions. The antisera will be used for validation of arthropod predation in organic olive groves, in Trás-os-Montes and in Alentejo.

Keywords: crop protection, *Prays oleae*, *Bactrocera oleae*, *Saissetia oleae*, polyclonal antiserum, ELISA.

1. Introdução

A oliveira (*Olea europae* L.), sendo uma cultura mediterrânea, encontra-se bem adaptada em Portugal mas apesar de ser uma cultura com poucos problemas fitossanitários, por vezes é sujeita à acção de algumas pragas e doenças. De entre as pragas de artrópodos destacam-se a traça da oliveira, *Prays oleae* (Bern.), a mosca da azeitona, *Bactrocera oleae* (Gmel.) e a cochonilha negra, *Saissetia oleae* (Oliv.) (Andrés-Cantero, 1997). No entanto, as populações destes inimigos podem ser mantidas abaixo do nível económico de ataque por factores abióticos e/ou por outros artrópodos, espécies predadoras e parasitóides, que contribuem para a estabilidade da biocenose no olival (Teixeira *et al.*, 2000). A valorização destes auxiliares é, assim, um factor preponderante na protecção contra pragas da oliveira, nomeadamente em olivicultura biológica.

As técnicas serológicas, particularmente as variantes de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) (Clark *et al.*, 1986), têm sido ultimamente utilizadas para avaliação da predação em artrópodos em várias culturas (e.g. Greenstone, 1996; Lozano *et al.*, 1999; Lozano *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 2002). O único trabalho referente à detecção por ELISA de predadores de *Prays oleae* em olivais portugueses utilizou antissoro produzido em Espanha (Lozano *et al.*, 2002)

No âmbito do Projecto AGRO 236, com amostras de traça, mosca e cochonilha colhidas em Trás-os-Montes e no Alentejo, produziram-se antissoros policlonais para os três inimigos da oliveira e iniciou-se a sua caracterização (Rodrigues *et al.*, 2003). Este trabalho, evidencia agora o comportamento dos antissoros com os respectivos antigénios homólogos e heterólogos, assim como o primeiro teste com *Chrysoperla carnea* (predador comum nos olivais) em condições laboratoriais. Os antissoros serão utilizados na avaliação do papel dos predadores em olivais conduzidos de acordo com o modo de produção biológico.

2. Material e Métodos

Antissoros utilizados - a colheita do material para a obtenção dos três antigénios (traça, mosca e cochonilha) e a imunização dos coelhos para a produção dos respectivos antissoros policlonais foi previamente descrita (Rodrigues *et al.*, 2003).

Caracterização dos antissoros - a caracterização dos antissoros inteiros foi feita por ELISA indirecto (ID-ELISA) segundo adaptação de protocolo de Clark *et al.* (1986). Os antigénios utilizados são os previamente descritos por Rodrigues *et al.* (2003). Assim, para as curvas de diluição, a concentração do antigénio-traça variou de 3,61 a 0,0004 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a concentração do antigénio-mosca variou de 4,21 a 0,0004 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e a concentração do antigénio-cochonilha variou de 3,74 a 0,0004 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os soros foram usados na diluição de 1:1 000. A enzima utilizada foi a peroxidase de rábano com OPD (ortofenilalanina) como substrato. A reacção foi mantida no escuro e a absorvância medida a 492 nm, normalmente após paragem da reacção com ácido sulfúrico 2,5M. Todas as amostras foram testadas em duplicado.

Teste de predação com *Chrysoperla carnea* - larvas do 2º instar de *Chrysoperla carnea* (Fiplant, Portugal) foram mantidas, em tubos Eppendorf, no seu alimento de origem até ao 4º instar. Foram então divididas em dois grupos e durante 24 horas, um grupo ficou em jejum e o segundo grupo foi alimentado com larvas de traça da oliveira (*Prays oleae*). As larvas de *C. carnea*, dos dois grupos, foram depois guardadas -20°C até serem testadas por ID-ELISA.

3. Resultados e Discussão

Caracterização dos antissoros - a caracterização preliminar dos antissoros policlonais produzidos para os três inimigos da oliveira foi previamente descrita (Rodrigues *et al.*, 2003). Quando, por ID-ELISA, é agora comparado o comportamento dos mesmos soros perante o seu antigénio homólogo e os dois antigénios heterólogos (Fig.1) verifica-se que, apesar de haver ligeira reacção cruzada, há uma boa diferenciação quando a concentração do antigénio homólogo é igual (ou superior) a 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (correspondendo à diluição de 1:31 600 do extracto da praga).

Teste de predação com *Chrysoperla carnea* - o primeiro teste de predação em laboratório, feito ainda apenas para a traça da oliveira, evidencia a potencialidade do soro produzido para detectar traça em *C. carnea* (predador) (Fig. 2). A quantidade de traça detectada, em 4 indivíduos de *C. carnea* alimentados em laboratório durante 24h, variou com o indivíduo mas foi sempre detectada por ID-ELISA com o soro produzido.

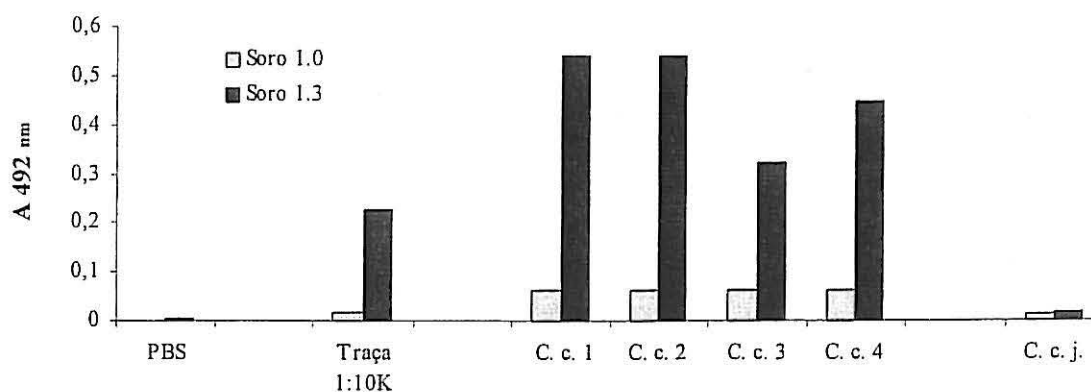


Fig. 2 - Detecção do antigénio-traça em larvas de *Chrysoperla carnea*. (Resultados 1h após adição do substrato; C.c.1 - C.c.4 = quatro larvas de *C. carnea* alimentadas com traça; C.C.j. = mistura de quatro larvas de *C. carnea* em jejum; Soro 1.0 = soro normal, Soro 1.3 = soro para traça).

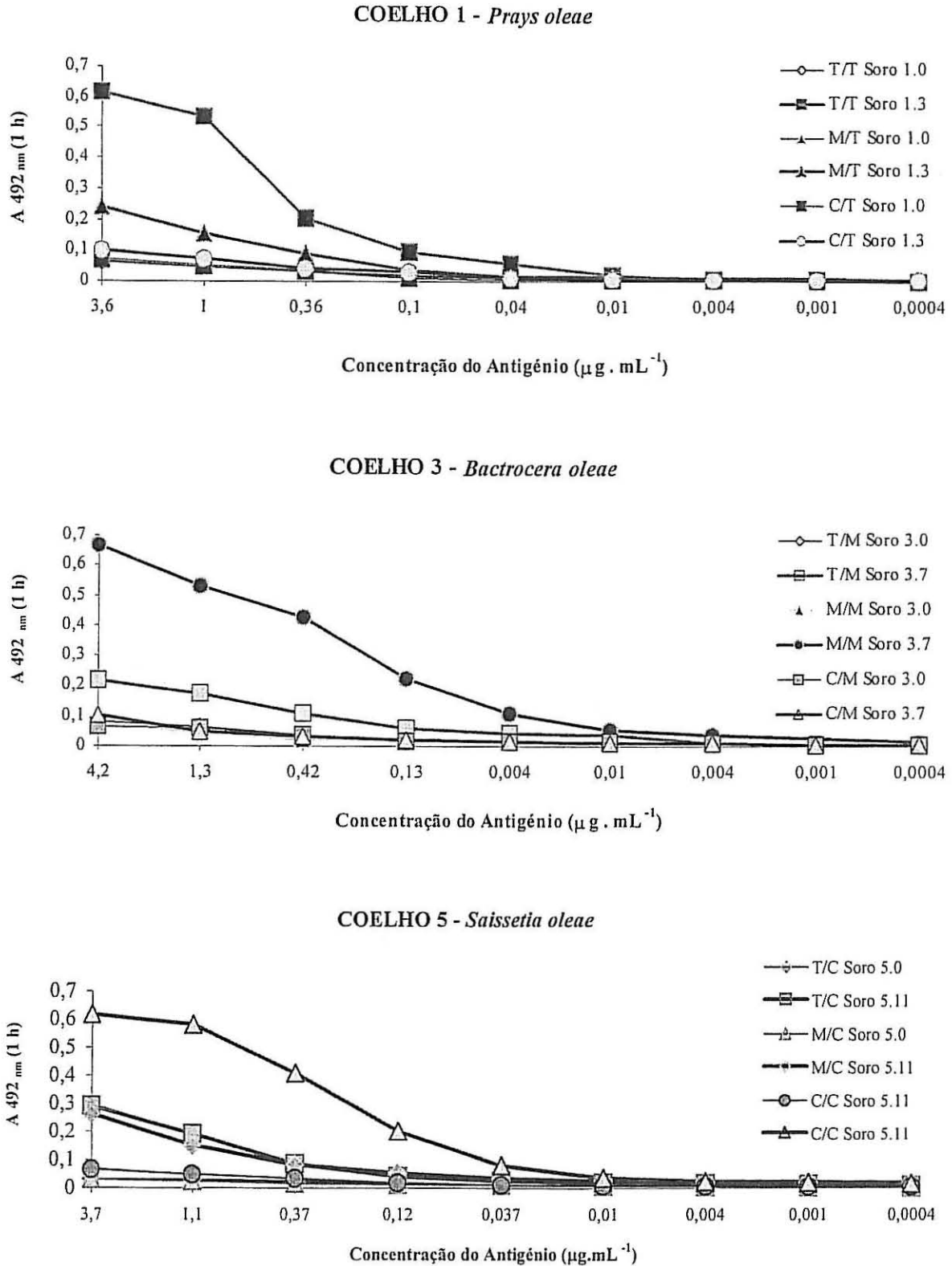


Fig. 1 – Comportamento do antissoro perante o seu antígeno homogêneo e os dois antígenos heterólogos (Coelho1 - Traça da oliveira, *Prays oleae*, Soro 1.0 = soro normal, Soro 1.3 = soro para traça; Coelho3 - Mosca da azeitona, *Bactrocera oleae*, Soro 3.0 = soro normal, Soro 3.7 = soro para mosca; Coelho 5 - Cochonilha negra, *Saissetia oleae*, Soro 5.0 = soro normal e Soro 5.11 = soro para cochonilha).

Três antissoros específicos de três importantes inimigos da oliveira previamente preparados (Rodrigues *et al.*, 2003) evidenciam bom funcionamento dos anticorpos para o respectivo antígeno homólogo e baixa reactividade com os dois antígenos heterólogos.

Por ID-ELISA em *C. carnea*, mantida em condições laboratoriais, é evidenciada a potencialidade do antissoro produzido para detectar a traça da oliveira no seu predador. Os testes deverão continuar para os outros soros e respectivos antígenos.

Para se avaliar o papel dos predadores em olivais conduzidos de acordo com o modo de produção biológico, é essencial estudar as reacções destes soros com várias famílias de artrópodos, principais predadores dos inimigos da oliveira (crispídeos, coccinelídeos, formicídeos e aracnídeos). Predadores capturados em 2004 em olivais biológicos em Trás-os-Montes e no Alentejo serão testados com os soros caracterizados para avaliação de possíveis reacções cruzadas e para avaliação da predação. A valorização dos auxiliares é um factor preponderante na protecção contra pragas da oliveira, nomeadamente em olivais conduzidos de acordo com o modo de produção biológico.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo Projecto AGRO 236 "Protecção contra pragas em olivicultura biológica".

Referências Bibliográficas

- Andrés-Cantero, F. 1997. Enfermedades y plagas del olivo. 3ª edição, Riquelme y Vargas Ediciones, S. L., Jaen.
- Clark, M., Lister, R., e Bar-Joseph, M. 1986. ELISA techniques. *Methods in Enzymology* 118:742-766.
- Greenstone, M. H. 1996. Serological analysis of arthropod predation: past, present and future. *In* The Ecology of Agricultural Pests, W. Symondson and J. Liddell (Eds), Chapman & Hall, London.
- Lozano, C., Morris, T. e Campos, M. 1999. Development and characterization of a polyclonal antiserum for detection of predators of *Euzophera pinguis* (Lep: Pyralidae). *Acta Hort.* 474:563-566.
- Lozano, C., Morris, T., Campos, M., Pereira, J.A., e Bento, A. 2002. Detection by ELISA of predators of *Prays oleae* (Lepidoptera: Plutellidae) in portuguese olive orchards. *Acta Hort.* 586:831-834.
- Morris, T. I., Symondson, W., Kidd, N. e Campos, M. 2002. The effect of different ant species on the olive moth, *Prays oleae* (Bern.), in Spanish olive orchard. *J. Appl. Ent.* 126: 224-230.
- Rodrigues, M-C. , Santos, S., Pereira, J.A., Rei, F., Cortez, I., Torres, L. e Pereira, A-M. 2003. Produção de antissoros policlonais para detecção de predadores das principais pragas da oliveira. *In* 6º Encontro Nacional de Protecção Integrada, 14-16 de Maio, Escola Superior Agrária, Castelo Branco (*in press*).
- Teixeira, R., Bento, A. e Gonçalves, M. 2000. Avaliação da fauna auxiliar associada ao olival em produção biológica em Trás-os-Montes. *Bol. San. Veg. Plagas* 26: 629-636.