

Actas do I Congresso Nacional de Produção Integrada
VIII Encontro Nacional de Protecção Integrada

Produção e Protecção Integrada



Maria Luísa Roldão M. Moura
(Coord)

Beauveria bassiana, fungo entomopatogénico da traça-da-oliveira em Trás-os-Montes: caracterização morfológica e molecular

Paula Baptista¹, Valentim Coelho¹, Albino Bento¹, Teresa Lino-Neto² & José Alberto Pereira¹

¹ CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal; jpereira@ipb.pt

² Centro de Fisiologia Molecular e Biotecnologia de Plantas, Departamento de Biologia, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

Resumo

418 A traça-da-oliveira, *Prays oleae* (Bern.), é uma praga chave da oliveira na região de Trás-os-Montes. Uma possível alternativa à luta química contra esta praga, reside na utilização de fungos entomopatogénicos (FE). Dado o desconhecimento da presença e expressão destes fungos em Portugal foi recentemente efectuado o isolamento *in vitro* de fungos, associados a pupas de traça-da-oliveira parasitadas, provenientes de olivais localizados na região de Trás-os-Montes. No presente trabalho pretendeu-se caracterizar morfológicamente e molecularmente um dos isolados obtidos. A caracterização morfológica foi efectuada por observação microscópica e esteromicroscópica de micélio com crescimento em meio de cultura PDA. A identificação molecular foi efectuada pela amplificação termocíclica da região espaçadora transcrita interna (ITS) do rDNA nuclear, seguida de sequenciação. A análise morfológica das colónias fúngicas, das hifas e das suas estruturas de reprodução evidenciou características semelhantes às descritas na bibliografia para *Beauveria bassiana*. A análise comparativa da sequência nucleotídica obtida, com regiões ITS de rDNA de outras espécies fúngicas, revelou valores de identidade de 99,0% com *B. bassiana*, confirmando a identidade do isolado. Dado que *B. bassiana* tem sido referenciada como um importante agente de luta biológica, a presença deste fungo entomopatogénico na região transmontana abre novas perspectivas na luta contra a traça-da-oliveira.

Palavras chave: pragas da oliveira, meios de luta, *Beauveria bassiana*, fungo entomopatogénico.

Abstract

Title: *Beauveria bassiana*, an entomopathogenic fungus of the olive moth in the Trás-os-Montes region: morphological and molecular characterization

The olive moth - *Prays oleae* (Bern.) - is a key pest of the olive trees in the Trás-os-Montes region. A possible alternative to control this pest is the use of entomopathogenic fungi (EF). Given the lack of information about EF presence and expression in Portugal, the *in vitro* isolation of fungi from mycosed olive moth pupae, collected in Trás-os-Montes olive groves, was recently performed. In the present work, isolated fungi were morphologically and molecularly characterized. Morphological characterization was carried out by microscopic and stereomicroscopic observations of mycelium growing in PDA medium. Molecular identification was performed by sequencing of the amplified internal transcribed spacer (ITS) region of rDNA. Morphological analysis demonstrated that fungi isolates present similar characteristics to those described for *Beauveria bassiana* in the literature. Comparative analysis, between the ITS nucleotide sequence obtained and the ITS region from other fungal species, showed 99.0% of identity with *B. bassiana*. As this entomopathogenic fungus has been referred to as an important agent for biological control, its presence in Trás-os-Montes region can be a stimulus to its use as a biological agent on the control against olive moth.

419

Keywords: olive pests, means of control, *Beauveria bassiana*, entomopathogenic fungi

Introdução

As pragas de insectos são um dos mais significativos factores que limita a produção agrícola, provocando prejuízos superiores a 20% (Oerke, 2006). O uso de insecticidas químicos de síntese constitui a prática mais utilizada por parte dos agricultores, como forma de proteger as plantas dos estragos causados. Contudo, o elevado custo da luta química, a perda de eficiência de alguns dos produtos utilizados, os problemas ambientais advindos destas práticas e os problemas ao nível da intoxicação do homem e dos animais têm promovido a procura de alternativas aos meios de luta utilizados contra pragas. A luta biológica, com recurso a predadores, parasitóides e microrganismos entomopatogénicos tem vindo a ser utilizada de forma crescente, constituindo uma das alternativas viáveis à luta química. No caso dos insectos, a utilização de fungos entomopatogénicos (FE) como agentes de luta biológica, poderá constituir uma prática com elevado potencial. De entre os FE, as espécies mais utilizadas em luta biológica pertencem aos géneros *Metarhizium* (em especial *M. anisopliae*), *Paecilomyces* e *Beauveria* (em especial *B. bassiana*) (Stamets, 2005).

Em Portugal, os estudos conducentes à avaliação da diversidade de fungos entomopatogénicos associados às principais pragas das culturas agrícolas são muito escassos. Como consequência, a sua aplicação como agentes de luta biológica contra essas pragas é ainda muito reduzida. Na região de Trás-os-Montes foi detectada a presença expressiva de *B. bassiana*, associada à traça-da-oliveira, *Prays oleae* Bern., a qual constitui uma das principais pragas na região (Bento, 1999). Uma vez que esta espécie fúngica se encontra referenciada como um importante agente de luta biológica, procedeu-se ao seu isolamento, tendo em vista a sua futura utilização contra a referida praga. No presente trabalho são apresentados os resultados relativos à caracterização molecular e morfológica dos isolados autóctones de *B. bassiana* obtidos a partir de pupas parasitadas de traça-da-oliveira.

Material e Métodos

Cultura axénica dos isolados fúngicos

O isolamento de FE foi efectuado, a partir de pupas de traça-da-oliveira, parasitadas em meio PDA contendo cloranfenicol. As culturas axénicas dos isolados fúngicos foram efectuadas em meio PDA.

420

Identificação molecular dos isolados fúngicos

A identificação molecular foi efectuada pela amplificação termocíclica da região espaçadora transcrita interna (ITS) do rDNA nuclear, utilizando o par de iniciadores nucleotídicos *ITS5FO* e *ITS4RE* (White et al., 1990). A mistura de reacção, bem como as condições de amplificação, foram semelhantes às descritas por Baptista (2007). As reacções de amplificação foram efectuadas no termociclador MyCycler (BioRad). Após purificação dos fragmentos amplificados (*JETquick PCR product purification*, Genomed), procedeu-se à sua sequenciação utilizando os mesmos iniciadores nucleotídicos (STABVIDA). As sequências de DNA obtidas foram analisadas utilizando o programa de programas DNASTAR versão 2.58 (Lasergene). Recorrendo ao servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e utilizando o algoritmo BLAST, foi analisada a homologia das sequências obtidas com outras sequências presentes na base de dados GenBank.

Caracterização morfológica dos isolados fúngicos

As características macroscópicas das colónias fúngicas foram avaliadas ao nível da coloração do micélio, presença de micélio aéreo, presença de exsudados, margem da colónia (regular ou irregular) e produção de pigmentos difusíveis no meio de cultura .

A morfologia das hifas foi analisada por microscopia óptica e esteromicroscopia. Para observação ao microscópio óptico, porções de micélio foram coradas com azul de algodão 0,5% (v/v) e observadas num microscópio Leica, modelo CTR 5000. A observação esteromicroscópica foi realizada numa lupa binocular (Nikon SMZ-U).

Resultados e discussão

Identificação molecular de B. bassiana

Após amplificação termocíclica da região ITS, utilizando os iniciadores oligonucleotídicos universais *ITS5FO* e *ITS4RE*, foi obtido um único fragmento de 600 pb (fig. 1). Fragmentos de dimensões semelhantes têm vindo a ser descritos, após amplificação nas mesmas condições de DNA genómico da maioria das espécies fúngicas (Buscot et al., 2000). A sequência nucleotídica do fragmento amplificado encontra-se representada na fig. 2. Esta sequência compreende 599 pb e inclui a região ITS1 (com 215 pb), ITS2 (com 214 pb) e a região correspondente ao gene 5,8S com 170 pb (sombreado a cinzento na fig. 2) Ambas as regiões ITS1 e ITS2 não se encontram completas, devido à utilização dos iniciadores *ITS5FO* e *ITS4RE*. Quando efectuada a análise comparativa da sequência nucleotídica obtida, com regiões ITS de rDNA de outras espécies fúngicas, foram obtidos valores de identidade de 99,0% com a mesma sequência de *Beauveria bassiana* (nº acesso AJ560686.1), o que confirmou a identidade do fungo isolado.

421

Aspectos morfológicos de B. bassiana

Culturas axénicas de fungo entomopatogénico foram obtidas a partir de isolados fúngicos da superfície de traça-da-oliveira parasitadas (fig. 3A). Estas colónias apresentavam o micélio com coloração branca-amarelada e com crescimento aéreo. Em meio de cultura PDA, as colónias de *B. bassiana* apresentavam o micélio com uma coloração branca, exibindo crescimento de micélio aéreo e com aspecto algodinoso em toda a superfície da colónia (fig. 3B). No decurso do seu crescimento, as colónias de margens regulares desenvolveram um micélio muito pruinoso, que se apresentava mais evidente no centro. No reverso da placa, a colónia também exibiu coloração branca, mas ligeiramente mais amarelada no centro, não evidenciando exsudação de compostos pigmentados para o meio de cultura. As características morfológicas observadas são idênticas às descritas na bibliografia para outros isolados de *B. bassiana* (Varela & Morales, 1996; Fernandes et al., 2006).

Quando observadas em microscopia óptica, as hifas de *B. bassiana* apresentavam-se septadas, hialinas, com paredes finas, e com um diâmetro médio de 2,5 µm (fig. 4F). No micélio foi possível

observar hifas verticais, que apresentavam na sua extremidade conidióforos simples ou ramificados, onde eram produzidos os esporos (conídios) (fig. 4D, E). Os conídios eram ovóides ou globulosos, hialinos, e com um diâmetro variável de 2-4 μ m (fig. 4C). A observação esteromicroscópica das colónias de *B. bassiana* evidenciou a presença de uma enorme quantidade de montículos brancos pulverulentos com projecção aérea (fig. 4A, B), correspondendo a aglomerados de conidióforos. As características microscópicas mencionadas são semelhantes às referidas na bibliografia para outros isolados de *B. bassiana*, apesar dos meios de cultura considerados serem diferentes daquele utilizado no presente trabalho (Liu et al., 2003).

Conclusões

A análise molecular e morfológica de isolados fúngicos provenientes de pupas parasitadas de traça-da-oliveira, colhidas em olivais na região de Trás-os-Montes, permitiu a identificação do fungo entomopatogénico, *B. bassiana*. A sua presença vem abrir novas perspectivas para a luta biológica contra esta importante praga do olival.

422

Agradecimentos

Trabalho financiado pelo Programa INTERREG IIIA, Projecto PIREFI.

Referências

- Baptista, P.C.S. 2007. Macrofungos associados à cultura de castanheira: aspectos da sua biodiversidade e da interacção de *Pisolithus tinctorius* e de *Hypholoma fasciculare* com raízes de *Castanea sativa* Mill. Tese de Doutoramento em Ciências, área de conhecimento de Biologia, Escola de Ciências, Universidade do Minho, 267pp.
- Bento, A. 1999. Contribuição para o estabelecimento de um programa de protecção integrada contra a traça da oliveira, *Prays oleae* (Bern.) em Trás-os-Montes. Tese de Doutoramento, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 277pp.
- Buscot, F., Munch, J.C., Charcosset, J.Y., Gardes, M., Nehls, U. & Hampp, R. 2000. Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 601-614.
- Fernandes, E. K. K., Costa, G. L., Moraes, Á. M. L., Zahner, V. & Bittencourt, V. R. E. P. 2006. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. *Parasitology Research*, 98, 324-332.
- Liu, H., Skinner, M., Brownbridge, M. & Parker, B. L. 2003. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 82, 139-147.
- Oerik, E.C., 2006. Crop losses to pests. *Journal Agriculture Science*, 144, 31-43.

Stamets, P., 2005. *Mycopesticides*. In *Mycelium running – How mushrooms can help save the world*. Ten Speed Press, Berkeley.

Varela, A. & Morales, E., 1996. Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their Virulence toward the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67, 147–152.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, e T.J. White, eds.) Academic Press, San Diego, pp. 315-322.

Figuras

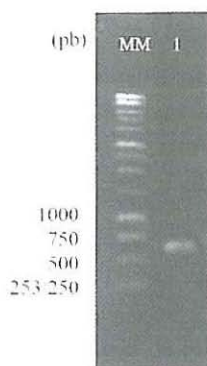


Figura 1 - Análise eletroforética dos produtos resultantes da amplificação de DNA genômico de *Beauveria bassiana*, na presença dos iniciadores nucleotídicos *ITS5FO* e *ITS4RE* (1). A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,2% (p/v). MM - marcador de massa molecular (1 kb DNA Ladder).

```

TTGAAAGTTAAAGTGTAAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACGAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTCAACTCCCAAACCCITATGTGAACCTACCTATCGT 100
TGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCCCGGACGCGGACTGGACCGAGCGGCCCGGGGACCATCAAACCTTTGTATTATCAGCATCTTCTGAATACGGCGCAAG 200
GC AAAACAATAAATTA AA ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATCC 300
AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCCTCGAACCCTCCCTTTGGGGAA 400
GTCCGCGTTTGGGACCGGCGAGCACAACCGCCGCCCTGAATGGAAGTGCAGCGCCGTCGCGGGCGACCTCTCGTAGTAACCAACTCGCACCAGGAAACCCC 500
GACGTGGCCACGCCGTAAACACCCAACTTCTGAACCTTGACCTCGAATCAGGTAAGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAGGGGGGAGGGAAA 599

```

Figura 2 - Sequência nucleotídica da região ITS do rDNA de *Beauveria bassiana*. A região correspondente ao gene de rRNA 5,8S encontra-se sombreada a cinzento. As regiões não codificantes ITS1 e ITS2 encontram-se, respectivamente, imediatamente antes (1-215) e depois (385-599) do gene 5,8S. Os números à direita referem-se aos nucleótidos.



Figura 3 - Aspecto de pupa de traça-da-oliveira parasitada por *Beauveria bassiana* (A) e aspecto macroscópico de colónias isoladas de *B. bassiana*, incubadas em meio PDA (B).

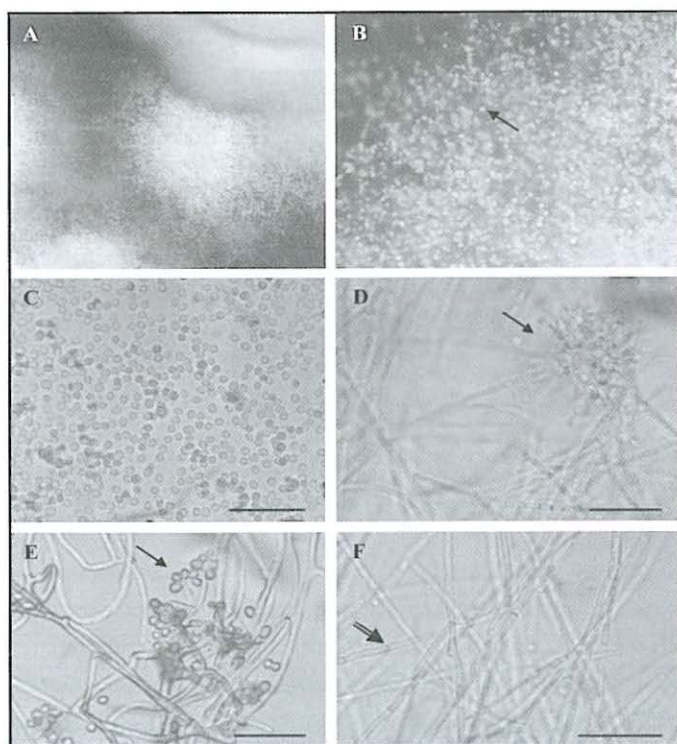


Figura 4 - Aspectos esteromicroscópicos (A, B) e microscópicos (C-F) de *Beauveria bassiana*. Aspecto das colónias de *B. bassiana* em meio PDA (A) e de conidióforos (B, D, E; setas com traço simples) onde são produzidos conídios (C). As hifas apresentam-se septadas (F; seta com traço duplo). Ampliação 10 \times (A) e 70 \times (B). Barra 10 μ m (C-F).