

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



P. Baptista¹; V. Coelho¹, A. Bento¹, T. Lino-Neto² & J.A. Pereira¹

¹ CIMO/Escola Superior Agrária de Bragança, Quinta de Sta. Apolónia, Apt. 1172, 5301-855 Bragança, Portugal. jpereira@ipb.pt

² Departamento de Biologia/Centro de Biologia, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal



Introdução e objectivos

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). Contudo, a presença e expressão destes fungos em Portugal é praticamente desconhecida. Recentemente

foi 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 – *Beauveria bassiana*.

Material e métodos

Os isolados fúngicos foram obtidos a partir de pupas de traça-da-oliveira parasitadas, colhidas em vários olivais na região de Trás-os-Montes, em 2007.

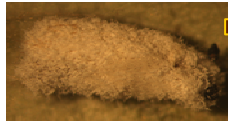


Fig. 1 - Aspecto de pupa de traça-da-oliveira parasitada

O isolamento *in vitro* dos fungos foi efectuado em meio PDA contendo cloranfenicol.

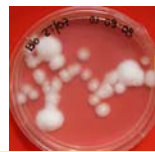


Fig. 2 - Aspecto de colónias de *B. bassiana* incubadas em meio PDA

Identificação molecular: amplificação termocíclica da região espaçadora transcrita interna (ITS) do rDNA nuclear, utilizando o par de iniciadores nucleotídicos *ITS5FO* e *ITS4RE* [1].
Caracterização morfológica: avaliação das características macroscópicas e microscópicas.

Resultados

Identificação molecular

Após amplificação termocíclica da região ITS, utilizando *ITS5FO* e *ITS4RE*, foi obtido um único fragmento de 600 pb (Fig. 3)

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 (sombreada a cinzento na Fig. 4). Ambas as regiões *ITS1* e *ITS2* não se encontram completas, devido à utilização dos iniciadores *ITS5FO* e *ITS4RE*.

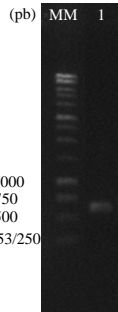


Fig. 3 - Análise electroforética dos produtos resultantes da amplificação de DNA genómico de *Beauveria bassiana*, na presença dos iniciadores nucleotídicos *ITS5FO* e *ITS4RE* (1). A electroforese foi realizada em gel de agarose 1,2% (p/v). MM - marcador de massa molecular (1 kb DNA Ladder).

```
TTCGAAAGTTAAAGTCGTAACAAGGTCCTCCGTTGGTGAACCGGGAGGGATCATACCGAGTTTCAACTCCCAACCCCTATGTGAACCTACCTATCGT 100
TGCTTGGGGGACTCGCCCGAGCGGAGCGGACTGACACAGCGCGCGCGGGGAGCCATCAACTCTGTATTATCAGCATCTCTGTAATAGGGCGCAAG 200
GCMAACAATAAATAAAGGTTTCAACACGATCTCTGGCTCTGGCATCGATGAAGACGGAGCGAATGCGATAGTATGTAATGCGAATCC 300
AGTGAATCATGCAATCTTTGAACGCACATTTGCGCCCGCCAGCATTTCTGGCGGCGATCGCTGTCGAGCGTCATTCAACCCCTCAGCCCTCCCTTTGGGGAA 400
GTCCGCGCTTGGGGAGCGCGACACACCGCCCGCCCTGAAATGAGTGGCGGCGCGCCGCGGACCTCTGGTAGTAACCAACTCGCCCGGAAACCGG 500
GACGTGGCCACCGCCGTAACACCGCCAGCTTCTGAAGCTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCGCGCTGAAGTAAAGCATATCAATAGGGGGGAGGGAAA 599
```

Fig. 4 - 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.

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.

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.

Caracterização morfológica

A observação esteromicroscópica das colónias de *B. bassiana* evidenciou a presença de uma enorme quantidade de montículos brancos pulverulentos com projecção aérea (Fig. 5A, B), correspondendo a aglomerados de conidióforos.

A observação microscópica revelou que as hifas de *B. bassiana* apresentavam-se septadas, hialinas, com paredes finas, e com um diâmetro médio de 2,5 µm (fig. 5F). No micélio foi possível observar hifas verticais, que apresentavam na sua extremidade conidióforos simples ou ramificados, onde eram produzidos os esporos (conídios) (fig. 5D, E). Os conídios eram ovóides ou globulosos, hialinos, e com um diâmetro variável de 2-4 µm (fig. 5C).

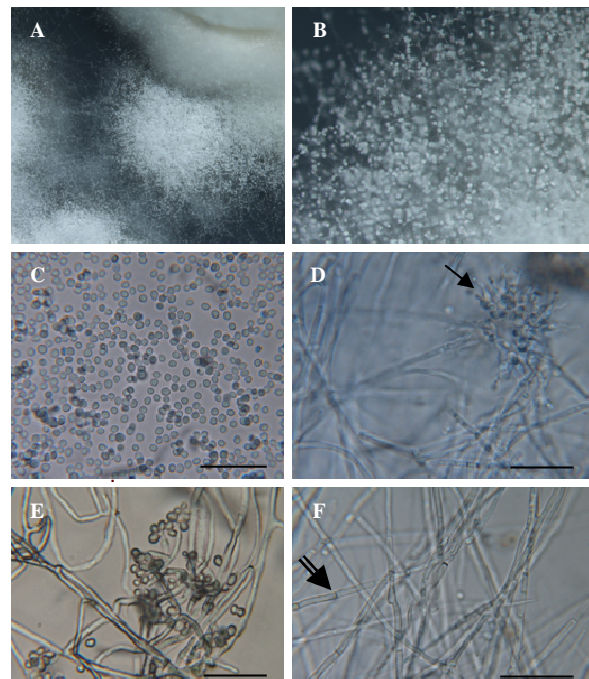


Fig. 5 - Aspectos esteromicroscópicos (A, B) e microscópicos (C-F) de *Beauveria bassiana*. Aspecto das colónias de *B. bassiana* em meio PDA (A) e de conidióforos (B, D, E; setas com traço simples) onde são produzidos conídios (C). As hifas apresentam-se septadas (F; seta com traço duplo). Ampliação 10x (A) e 70x (B). Barra 10 µm (C-F).

[1] White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PRC Protocols: A Guide to Methods and Applications. (MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, e T. J. White, eds.) Academic Press, San Diego, pp. 315-322.