

Efeito de fungos entomopatogênicos em ninfas de *Periplaneta americana*

Rayssa Fátima HUBNER-CAMPOS, Christian LUZ, Renan Nunes LELES, Juscelino RODRIGUES

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: hubnercampos@yahoo.com.br

Palavras chaves: Fungos entomopatogênicos, *Periplaneta americana*, controle biológico.

INTRODUÇÃO - *Periplaneta americana* é uma barata sinantrópica de importância médico-sanitária, que produz alérgenos capazes de induzir asma e outras alergias e ainda disseminar patógenos causadores de doenças infecto-contagiosas em ambiente hospitalar (Fathpour et al. 2003, Sarinho et al. 2004, Vahabi et al. 2007). Os inseticidas químicos são produtos de primeira escolha e os mais difundidos no combate às baratas (Miller et al. 2003). Contudo o uso permanente de compostos químicos tem sido continuamente questionado devido aos resultados insatisfatórios, contaminação do ambiente e intoxicação de pessoas (Alarcon et al. 2005). Fungos entomopatogênicos têm sido utilizados na agricultura, no controle integrado de pragas com resultados promissores, mas ainda não há produtos a base de fungos entomopatogênicos disponíveis para uso em baratas sinantrópicas ou para quaisquer outros insetos pragas urbano (Júnior et al. 2008). Até hoje existem poucas informações publicadas sobre o efeito de fungos em baratas. Os trabalhos relataram em grande parte o sinergismo entre produtos químicos e *Metarhizium anisopliae* em adultos de *Blattella germanica* (Kaakeh et al. 1997, Zurek et al. 2002, Quesada-Moranga et al. 2004, Adebí & Dayer 2005). Para nosso melhor conhecimento, até o momento há apenas um único trabalho sobre fungos entomopatogênicos e *P. americana* que reporta o efeito de *Beauveria bassiana* nessa espécie (Mohan et al. 1999). Atualmente não há alternativas a inseticidas químicos para combater baratas bem como informações sobre quais espécies e/ou gêneros possuem potencial para controle de *P. americana*. Assim, no intuito de conhecer o potencial de fungos entomopatogênicos em *P. americana*, avaliou-se o efeito de 11 fungos pertencente a sete gêneros diferentes em ninfas de *P. americana*.

METODOLOGIA

Origem e criação de *P. americana* - A criação de *P. americana* foi originada de adultos capturados na cidade de Goiânia, Goiás, Brasil em 2009. Os insetos foram criados sob condições de laboratório, em caixas plásticas (30 x 30 x 30 cm) com até 50 casais cada. Em cada caixa foram colocadas quatro bandejas para ovos de galinhas (10 x 10 x 10 cm) sobrepostas destinadas ao esconderijo e sítio de posição de ootecas. As caixas foram vedadas com filó para impedir fuga e propiciar aeração. Os insetos foram mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ umidade relativa (UR) e fotofase natural. As baratas foram alimentadas com ração seca comercial para gatos previamente triturada e com água fornecida através de algodão umedecido acondicionado em copos plásticos (200 ml). As ootecas foram retiradas do substrato e acondicionadas individualmente em placa de Petri (40 x 11 mm) e incubadas em incubadora própria, a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ até eclosão das ninfas. As ninfas foram transferidas para caixa plástica (30 x 30 x 30 cm) e mantidas sob as mesmas condições dos adultos.

Origem e cultivo dos fungos - Foram utilizados os fungos *Beauveria bassiana* (IP 3), *B. bassiana* (IP X), *Isaria farinosa* (ARSEF 1065), *I. catenobliqua* (ARSEF 6244), *Metarhizium anisopliae* (IP 46), *M. robertsii* (IP 34), *M. frigidum* (ARSEF 4561), *Paecilomyces lilacinus* (IP 320), *Simplicillium lanosoniveum* (ARSEF 8822), *Sporothrix insectorum* (IP 268) e *Tolypocladium cylindrosporum* (ARSEF 962), provenientes da coleção do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) Brasil e do acervo do USDA-ARS Robert W. Holley Center for Agriculture and Health, USA. Os fungos foram cultivados em meio de cultura BDA (batata, dextrose, ágar) distribuído em placas de Petri (100 x 20 mm), mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $75 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 h durante 15 dias.

Preparo do formulado em óleo-água - Conídios de cada fungo foram raspados com uma espátula da superfície do meio de cultura, transferidos para tubos de vidro contendo 10 ml de Tween 80[®] (0,1%) e pérolas de vidro, agitados em vortex por 3 min, filtrados através de algodão hidrófilo e a concentração definida pela contagem de conídios em câmara de Neubauer. Os conídios foram formulados em 10% de óleo vegetal emulsionável (Graxol[®]) na concentração final de 10^8 conídios/ml. No início de cada experimento, a viabilidade dos conídios (> 90 %) foi confirmada pela inoculação de 100 µl da suspensão de conídios, em

placa de Petri contendo meio SDAY (Sabouraud dextrose ágar levedura), incubados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por até 24 h.

Preparo de ninfas para bioensaio, aplicação de formulado e incubação - Ninfas (N1) com 24 a 72 h após a eclosão foram colocadas em placas de Petri com papel filtro estéril e expostas a 4°C por 20 minutos, para diminuir a movimentação durante o tratamento. Através de uma micropipeta semiautomática $0,5 \mu\text{l}$ de formulado foi aplicado sobre a região dorsal do tórax e abdome de cada ninfa, resultando numa dose final de 5×10^4 conídios/ninfa. As ninfas de controle foram tratadas apenas com formulado óleo-água. As placas com as ninfas foram acondicionadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $> 98\%$ UR. As ninfas foram alimentadas com ração seca comercial para gatos (Whiskas[®]) (0,5 g) previamente triturada e água através de algodão umedecido (0,1 ml), ambos fornecidos em copos de alumínio (1 ml). A mortalidade foi verificada diariamente por 25 dias. Ninfas mortas foram transferidas para câmara úmida a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e avaliado o crescimento de fungo na superfície por até 15 dias.

Análise dos resultados - Seis repetições independentes, para ninfas e ootecas, cada uma usando nova cultura de fungo foram realizadas. A mortalidade relativa acumulada de ninfas foi transformada em arcsin e examinada com Análise de Variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls-Test (SNK). As médias foram consideradas significativamente diferentes com $P < 0,05$.

RESULTADOS - Em geral, ninfas, imediatamente após aplicação tópica do formulado óleo-água com ou sem conídios, iniciaram um comportamento de limpeza de seus próprios corpos. Durante cinco a 10 minutos as ninfas, passaram sucessivas vezes, suas antenas primeiramente sobre a superfície corporal e depois pelo seu aparelho bucal. Nos dias seguintes ninfas tratadas com *B. bassiana* IP X, *M. robertsii* IP 34 e *M. anisopliae* IP 46 demonstraram sintomas de paralisia, que resultaram na morte de uma parte dos insetos tratados. Primeiras ninfas mortas foram encontradas com dois dias pós tratamento com IP X, IP 34, IP 46, *B. bassiana* IP 3, *M. frigidum* e *P. lilacinus*. Nenhuma mortalidade foi obtida com *I. catenibliqua*, *I. farinosa*, *S. lanosoniveum*, *S. insectorum*, *T. cylindrosporum* e o controle. Um efeito altamente significativo dos fungos testados na mortalidade acumulada foi detectado para ambos, 10 e 25 dias de incubação ($F_{10,55} \geq 18,3$; $P \leq 0,0001$). O crescimento de micélio sobre os insetos mortos iniciou após terceiro dia de incubação em câmara úmida

em regiões intersegmentais das patas e antenas. A maioria das ninfas ($\geq 91,5\%$) que morreu após a inoculação de *B. bassiana* spp, *Metarhizium* spp e *P. lilacinus* desenvolveu conídios sobre os indivíduos mortos nos dias seguintes.

DISCUSSÃO - *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *M. robertsii* provaram ser patogênicos para *P. americana*. Até agora havia somente um único estudo publicado que demonstrou a entomopatogenicidade de um fungo (*B. bassiana*) em adultos de *P. americana* (Mohan 1999). Todos os outros fungos testados no presente estudos foram considerados não patogênicos para *P. americana*, mas é importante notar que podem existir isolados patogênicos de espécies que não foram patogênicas para *P. americana*, ou isolados de *B. bassiana*, *M. anisopliae* ou *M. robertsii* com maior virulência contra esta barata que foram revelados nos isolados testados aqui. A redução da eficácia de fungos em ninfas pode estar relacionada com o comportamento de limpeza que foi notadamente estimulado pela formulação oleosa. Os dados obtidos no presente estudo e em outros, sugerem que fungos como *B. bassiana* e *Metarhizium* spp eventualmente tem um papel importante como antagonistas de *P. americana* e de outras baratas (Kaakeh et al. 1997, Mohan 1999, Zurek et al. 2002, Quesada-Moranga et al. 2004, Adebí & Dayer 2005). A distinta variabilidade intraespecífica e intragênica da virulência de *B. bassiana* e *Metarhizium* contra ninfas, enfatiza a importância de um screening de amplo espectro com diferentes espécies e gêneros de fungos, especialmente se há somente poucas informações sobre a especificidade e virulência de fungos entomopatogênicos ou isolados contra uma espécie alvo, como a *P. americana*.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS - De acordo com os dados obtidos no presente estudo os fungos *M. anisopliae* IP 46, *M. robertsii* IP 34 e *B. bassiana* IP X são patogênicos para ninfas de *P. americana* e possuem potencial para o controle biológico de *P. americana*. Futuros esforços devem centrar-se sobre a virulência dos fungos do gênero *Beauveria* e *Metarhizium*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abedi A, Dayer MS 2005. Evaluation of the effect of the fungus *Metarhizium anisopliae*, as a biological control agent, on German cockroaches *Blattella germanica*. J Med Sci 8: 31-36.

- Alarcon WA, Calvert GM, Blondell JM, Mehler LN, Sievert J, Propeck M, Tibbetts DS, Becker A, Lackovic M, Soileau SB, Das R, Beckman J, Male DP, Thomsen CL, Stanbury M 2005. Acute illnesses associated with pesticide exposure at schools. *J Med Aler* 294: 455-465.
- Fathpour H, Emtiazi G, Ghasemi E 2003. Cockroaches as reservoirs and vectors of drug resistant *Salmonella* spp. *Iran Biomed J* 7: 35-38.
- Júnior WDP, Lacava PT, Messias CL, Azevedo JL, Lacava PM 2008. Biossay assessment of *Metarhizium anisopliae* Sorokin (Deuteromycota:Hyphomycetes) against *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae). *Braz J Microbiol* 39: 128-132.
- Kaakeh W, Reid BL, Bohnert TJ, Bennett GW 1997. Toxicity of imidacloprid in the German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) and the synergism between imidacloprid and *Metarhizium anisopliae* (Imperfect Fungi: Hyphomycetes). *J Econ Entomol* 90: 473-482.
- Miller DM, Koeler PG 2003. [página da internet]. Least toxic methods of cockroach control. [acessado em 08 de Junho de 2011; citado em 09 de junho de 2011]. Disponível em: http://edis.ifas.ufl.edu/document_ig105.
- Mohan CHM, Lakshmi KA, Devi KU 1999. Laboratory evaluation of the pathogenicity of three isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin on the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Biocontrol Sci Technol* 9: 29-33.
- Quesada-Moranga E, Quirós RS, Garcia PV, Álvarez CS 2004. Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *J Invertebr Pathol* 87: 51-58.
- Sarinho E, Schor D, Veloso MA, Rizzo JA 2004. There are more asthmatics in homes with high cockroach infestation. *Braz J Med Biol Res* 37: 503-510.
- Vahabi A, Rafinejad J, Mohammadi P, Biglarian F 2007. Regional evaluation of bacterial contamination in hospital environment cockroaches. *Iran J Environ Health Sci Eng* 4: 57-60.
- Zurek L, Watson DW, Schal C 2002. Synergism between *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) and boric acid against the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Biol Control* 23: 296-302.