

## TRANSMISSÃO HORIZONTAL DE *Beauveria bassiana* E *Metarhizium anisopliae* EM *Periplaneta americana*

JUCELIO PETER DUARTE<sup>1</sup>; FRANCIELLY FELCHICHER<sup>2</sup>; MARCIAL CORRÊA CÂRCAMO<sup>3</sup>; EDUARDO BERNARDI<sup>4</sup>; PAULO BRETANHA RIBEIRO<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, IB, PPG em Entomologia – juceiod@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas, IB, PPG em Parasitologia – franciellybio@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas, IB, PPG em Parasitologia – marcial.carcamo@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas, IB – edubernardi@hotmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas, IB – bretanha@ufpel.tche.br

### 1. INTRODUÇÃO

*Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae) é uma barata sinantrópica com ampla distribuição geográfica e grande importância em saúde humana e de animais domésticos, uma vez que pode atuar como vetor mecânico de patógenos e parasitos (GARCÍA et al., 2012).

O controle desse inseto é geralmente feito com o uso de inseticidas químicos, porém fatores como poluição ambiental, intoxicação de humanos e animais domésticos e o surgimento de resistência em populações de baratas (LIMOEE et al., 2011) tem intensificado a busca por outros métodos de controle.

Uma alternativa para o controle desses insetos é o uso de agentes para controle biológico, dos quais se destacam os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* Vuillemin, 1912 (Hypocreales, Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, 1883 (Hypocreales, Clavicipitaceae).

Estes fungos parecem ser boas alternativas para o controle dessa espécie de inseto, em função do ambiente úmido em que estes insetos vivem e do seu comportamento gregário. Alguns autores já relataram a patogenicidade dos fungos em *P. americana* (MOHAN et al., 1999; LOPES; ALVES, 2011), mas pouco se sabe sobre a eficiência da autodisseminação desses fungos, o que pode aumentar o impacto sobre a população alvo (TOLEDO et al., 2007).

Visto isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da transmissão horizontal na eficácia de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre adultos de *P. americana*.

### 2. METODOLOGIA

Adultos de *P. americana* foram coletados na região de Pelotas – RS (31°48'S, 52°25'O) e criados em laboratório conforme VIANNA et al. (2000), diferindo apenas na dieta oferecida, que foi substituída por farinha de carne e açúcar, na proporção de 1:1.

Para os bioensaios, foram utilizados adultos com no máximo 30 dias após a emergência. Assim como as colônias estoque, os bioensaios foram montados em caixas teladas medindo 30x30x30cm e mantidos durante todo o período em câmara climatizada (25±2°C, UR=70±10% e fotofase de 12h).

Os isolados fúngicos de *B. bassiana* (CG240) e *M. anisopliae* (CG34) foram cedidos pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Foram repicados em tubos de ensaio contendo meio de cultivo batata-dextrose-agar (BDA), em seguida, incubados em estufa (25°C e fotofase de 12h). Após a esporulação das culturas, foram realizadas suspensões de ambos os fungos utilizando água destilada estéril adicionada de espalhante adesivo (Tween 80) na proporção de 0,01%. A estimativa da concentração foi determinada com câmara de Neubauer.

Para a avaliação da transmissão horizontal de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em *P. americana*, o estudo foi dividido em duas formas: a transmissão horizontal entre adultos vivos e a transmissão horizontal entre um cadáver e adultos vivos.

No bioensaio entre adultos vivos, para cada espécie fúngica foram montadas cinco repetições, e em cada repetição foram usados cinco casais saudáveis de *P. americana* e um macho infectado.

Os machos foram infectados colocando-os em um tubo contendo 1ml de suspensão de conídios na concentração de  $2 \times 10^7$  conídios  $\times \text{ml}^{-1}$  sendo agitado moderadamente por cinco segundos. Logo após foram deixados em frascos com papel filtro para retirar o excedente de suspensão. No grupo controle o macho foi exposto a uma solução de água com Tween 80 a 0,01%.

A mortalidade foi monitorada diariamente, durante 15 dias, sendo que os mortos eram colocados em câmara úmida. O desenvolvimento de fungos nos cadáveres foi avaliado com estereomicroscópio por até 15 dias após sua morte.

No segundo bioensaio, para cada espécie fúngica foram montadas cinco repetições, e em cada repetição foram usados cinco casais saudáveis de *P. americana* e um cadáver com esporulação do fungo. O bioensaio foi avaliado da mesma forma que o anterior.

O cadáver foi obtido contaminando insetos saudáveis da mesma forma que o bioensaio anterior, porém, nesse bioensaio, os insetos só foram usados após sua morte e esporulação do fungo (em torno de 12 a 18 dias). O grupo controle foi composto da mesma forma, diferindo pela exposição de um cadáver sem a presença de conídios.

As mortalidades foram analisadas por análise de variância (ANOVA), e a diferença entre as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p=0,05$ ). Para realização da ANOVA as porcentagens foram transformadas em arco seno  $\sqrt{0}$ %. O tempo letal médio (TL50) de cada bioensaio foram calculadas pela análise de probit. As curvas de sobrevivência foram comparadas por Log-rank test ( $p=0,05$ ). Todas as análises foram feitas no programa estatístico SPSS 11.0 for Windows (SPSS, 2002).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi possível observar mortes ocasionadas pela transmissão horizontal de *M. anisopliae* ou de *B. bassiana* entre adultos vivos, isso provavelmente se deve a baixa carga patogênica transferida aos indivíduos saudáveis.

Porém, foi observado comportamento de canibalismo dos adultos infectados por adultos saudáveis, o qual já havia sido documentado em indivíduos dessa espécie quando infectados com *M. anisopliae* (DUARTE et al., 2010).

No grupo controle, onde não houve indivíduos infectados, nenhum dos adultos foi encontrado morto nem canibalizado ao longo de 15 dias.

Os fungos foram horizontalmente transmitidos entre cadáver e insetos vivos, sendo que todos os indivíduos que morreram pela exposição a esses cadáveres apresentaram crescimento fúngico. Essa transmissão já foi documentada para *B. bassiana* em adultos dessa espécie (MOHAN et al., 1999) e *M. anisopliae* em *Blattella germanica* (Linnaeus, 1767) (Blattaria, Ectobiidae) (KAAKEH et al., 1996).

A transmissão horizontal dos fungos entomopatogênicos causou redução significativa no tempo de sobrevivência dos insetos ( $\chi^2=37,50$ ; GL=2;  $p<0,001$ ). Entre os fungos testados, *M. anisopliae* causa maior impacto no tempo de sobrevivência dos adultos quando a infecção se dá pela transmissão horizontal ( $\chi^2=15,30$ ; GL=1;  $p<0,05$ ) (Fig. 1). O tempo letal médio (TL50) (IC 95%) na transmissão de *B. bassiana* foi de 15,5 (14,1–16,8) dias ( $n=30$ ; inclinação=0,03;

$\chi^2=140,39$  e 12,7 (12,0–13,4) dias (n=30; inclinação=0,04;  $\chi^2=166,56$ ) para *M. anisopliae* (Fig. 1).

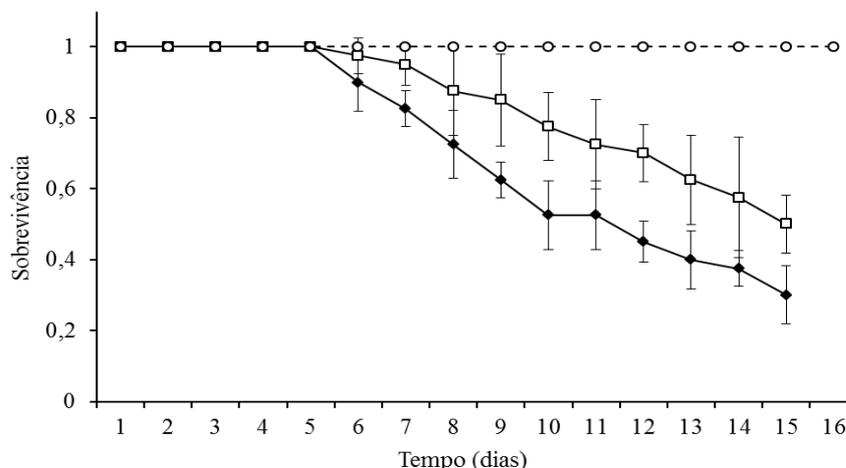


Figura 1 – Sobrevivência de adultos saudáveis de *Periplaneta americana* (Blattaria, Blattidae) expostos a adultos mortos não infectados (pontilhado e ○), adultos mortos com *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Cordycipitaceae) (sólido e □) e adultos mortos com *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales, Clavicipitaceae) (sólido e ◆). Os dados são das médias ± Desvio padrão.

As mortalidades acumuladas dos indivíduos de *P. americana* expostos a cadáveres com *B. bassiana* ou *M. anisopliae* foram de 50% e 70%, respectivamente, significativamente maiores que a do grupo controle (F=84,72; GL=2; p<0,001) (Fig. 1). O fungo *M. anisopliae* causou uma maior mortalidade acumulada que a do outro fungo testado (F=11,58; DF=1; p<0,05) (Fig. 1).

Foi encontrado tempo letal e mortalidade semelhantes ao encontrado por QUESADA-MORAGA et al. (2004) para a transmissão horizontal de *M. anisopliae* em adultos de *B. germanica*, porém KAAKEH et al. (1996) obtiveram resultados inferiores nessa forma de infecção, estimando uma TL50 de 20 dias e uma mortalidade acumulada (28 dias) de 67% para ninfas de *B. germanica*.

As semelhanças e diferenças entre os resultados encontrados podem estar associadas às metodologias empregadas pelos diferentes autores. Nesse estudo, bem como no de QUESADA-MORAGA et al. (2004), as baratas saudáveis foram expostas aos cadáveres infectados durante todo o período, enquanto KAAKEH et al. (1996) utilizaram tempos de exposição de 6 e 48 horas.

Na transmissão horizontal de *B. bassiana*, a mortalidade foi inferior que a observada por MOHAN et al. (1999), porém, esses autores relataram que 50% dos mortos dessa forma mostraram crescimento fúngico, enquanto que neste estudo, foi detectado em 100%. Maior número de cadáveres com crescimento fúngico aumenta a possibilidade de infecção aos outros indivíduos da colônia.

Esses resultados indicam esses dois fungos como potenciais agentes para controle biológico de *P. americana*, porém é necessário pesquisas adicionais em condições de campo, avaliando o verdadeiro impacto dessas cepas fúngicas em um programa de controle deste blatídeo.

#### 4. CONCLUSÕES

*Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* se desenvolvem sobre os cadáveres dos indivíduos infectados e são transmitidos horizontalmente, potencializando o uso dessas espécies fúngicas como agentes para controle de *Periplaneta americana*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DUARTE, J.P.; CÁRCAMO, M.C.; FELCHICHER, F.; BERNARDI, E.; RIBEIRO, P.B. Comportamento de adultos saudáveis de *Periplaneta americana* frente a adultos contaminados com *Metarhizium anisopliae*. In: **CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 19., Pelotas, 2010. Anais do XIX Congresso de Iniciação Científica, Pelotas, 2010.

GARCÍA, F.; NOTARIO, M.J.; CABANÁS, J.M.; JORDANO R.; MEDINA L.M. Incidence of Bacteria of Public Health Interest Carried by Cockroaches in Different Food-Related Environments. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v.49, n.3, p.1481-1484, 2012.

KAAKEH, W.; REID, B.L.; BENNETT, G.W. Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Imperfect Fungi: Hyphomycetes) and hydramethylnon among German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). **Journal of Entomological Science**, Tifton, v.31, p.378-390, 1996.

LIMOEE, M.; ENAYATI, A.A.; KHASI, K.; SALIMI, M.; LADONNI, H. Insecticide resistance and synergism of three field collected strains of the German cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae) from hospitals in Kermanshah, Iran. **Tropical Biomedicine**, Kuala Lumpur, v.28, n.1, p.111-118, 2011.

LOPES, R.B.; ALVES, S.B. Differential susceptibility of adults and nymphs of *Blattella germanica* (L.) (Blattodea: Blattellidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and assessment of delivery strategies. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.40, p.368-374, 2011.

MOHAN, C.H.M.; LAKSHMI, K.A.; DEVI, K.U. Laboratory evaluation of the pathogenicity of three isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin on the American cockroach (*Periplaneta americana*). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.9, p.29-33, 1999.

QUESADA-MORAGA, E.; SANTOS-QUIRÓS, R.; VALVERDE-GARCÍA, P.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.87, p.51-58, 2004.

SPSS. **SPSS 11.0 for Windows**. Chicago, 2002.

TOLEDO, J.; CAMPOS, S.E.; FLORES, S.; LIEDO, P.; BARRERA, J.F.; VILLASEÑOR, A.; MONTOYA, P. Horizontal Transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) Under Laboratory and Field Cage Conditions. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.100, n.2, p.91-97, 2007.

VIANNA, E.E.S.; BERNE, M.E.A.; CHERNAKI, A.M.; SILVEIRA, P.Jr.; RIBEIRO, P.B. Performance reprodutiva de *Periplaneta americana* Linneu, 1758 (Blattodea: Blattidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.67, n.1, p.99-107, 2000.