

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE REFRIGERAÇÃO PARA ESTOCAGEM DA
SUSPENSÃO FÚNGICA DE *Metarhizium anisopliae* (CG34) NA SOBREVIVÊNCIA
DE *Periplaneta americana* L. (Blattaria, Blattidae)

**FELCHICHER, Francielly¹; CÁRCAMO, Marcial Corrêa²; DUARTE, Jucelio
Peter³; KRÜGER, Rodrigo Ferreira⁴**

1. Bolsista Iniciação Científica Cnpq (DEMP/IB/UFPEL) (franciellybio@yahoo.com.br)

2. Bolsista Doutorado Cnpq (DEMP/IB/UFPEL) (marcial.carcamo@gmail.com)

3. Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMP/IB/UFPEL) (juceliiod@hotmail.com)

4. Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMP/IB/UFPEL) (rfkruger1974@yahoo.com.br)

RIBEIRO, Paulo Bretanha¹

1. Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMP/IB/UFPEL) (bratanha@ufpel.tche.br)

1 INTRODUÇÃO

Periplaneta americana Linnaeus, 1758 (Blattaria, Blattidae), apresenta elevada sinantropia e pode atuar como vetor mecânico de diversos patógenos, além de causar desconforto a humanos e outros animais (GUTRHIE e TINDALL, 1968; CONSOLI e OLIVEIRA, 1998). Um fator que pode contribuir na capacidade vetorial desses insetos é a alternância de habitats, pois durante o dia repousam em ambientes escuros, úmidos e quentes, como tubulações de esgoto, fossas sépticas e latrinas e à noite, invadem habitações como armazéns, restaurantes, cozinhas e hospitais (VIANNA; BERNE; RIBEIRO, 2001).

O uso constante de inseticidas para o controle de baratas pode fazer com que surja resistência ao tratamento químico. A utilização de fungos entomopatogênicos como agentes de controle biológico vem sendo aplicada como alternativa de controle destes insetos. Dentre os fungos mais usados encontra-se *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) (Hypocreales, Clavicipitaceae), que apresenta um grande número de hospedeiros, sendo comprovadamente entomopatogênico (ALVES et al., 1998; LOPES, 2005).

Uma das dificuldades do uso de fungos para o controle biológico é a sua estocagem, poucas são as informações sobre as formas de armazenamento e o impacto dessa na ação dos entomopatógenos. A estabilidade de *M. anisopliae* na formulação é importante para a determinação do período de atividade do fungo (LOPES, 2005). Técnicas de produção e formulação geralmente não atendem a quantidade e qualidade do patógeno, necessárias para o controle do inseto (LEITE et al., 2003).

O objetivo do trabalho foi avaliar a influência do tempo de refrigeração da suspensão de *M. anisopliae* sobre a sobrevivência de adultos de *P. americana*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os casais de *Periplaneta americana* foram obtidos de colônias pré-estabelecidas em câmara climatizada (26 °C ± 2 °C; UR>75%; fotofase de 12h) em que eram alimentados com açúcar refinado e farinha de carne, na proporção 1:1 e água. Os espécimes foram mantidos em gaiolas teladas (30x30x30cm) durante todo experimento.

O isolado de *M. anisopliae* (CG34) mantido sob refrigeração em meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA) foi repicado para tubos de ensaio com meio de

cultivo e estocados em estufa a 25°C com fotofase de 12h. Após a esporulação das culturas, foram feitas suspensões na concentração de 10^7 conídios/ml, em água destilada estéril adicionada de espalhante adesivo (Tween 80) na proporção de 0,01%.

A suspensão de *M. anisopliae* na concentração de 10^7 conídios/ml foi armazenada sob refrigeração a 4°C por diferentes períodos (0, 48, 96 e 144 horas). Para cada período foram utilizados dez casais de *P. americana*. Cada adulto foi banhado em 2 ml de solução durante 10 segundos. Para o grupo controle foram utilizados dez casais que foram mergulhados em água estéril, sem a presença de conídios. Os tratamentos e o grupo controle foram alimentados do mesmo modo que as colônias de manutenção e revisados diariamente para retirada dos indivíduos mortos. Os mortos foram isolados em placa de Petri com algodão úmido para posterior confirmação da mortalidade pelo fungo.

Os tratamentos foram observados por um período de 30 dias, para a análise de sobrevivência com distribuição de Weibull ($Y = e^{-\mu^{-\alpha} \times \text{tempo}^{\alpha}}$), considerando probabilidade de qui-quadrado (X^2) menor que 0,05, seguida de análise de contrastes para verificação das diferenças entre as concentrações para cada estágio. Todos os testes foram realizados no programa estatístico R (R Development Team 2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O tempo de estocagem da suspensão de *M. anisopliae* influenciou a sobrevivência de *P. americana* ($X^2=57,84$; G.L.=2; $p<0,001$), não havendo diferença entre os tratamentos 48h e 96h ($p=0,402$) pela análise de contrastes. O tempo letal médio foi de cerca de três, 10, 10 e 31 dias para os tratamentos 0, 48, 96 e 144h, respectivamente (Figura 1).

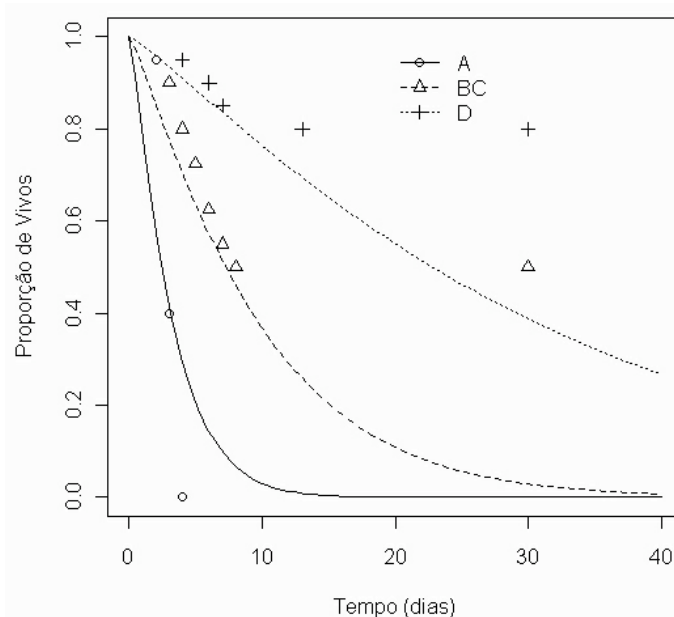


Figura 1. Curva de sobrevivência de *Periplaneta americana* em função do tempo (dias) a 25°C, UR >70% e fotofase de 12h, em laboratório. A: tratamento com zero hora de estocagem; B: tratamento com 48 horas de estocagem; C: tratamento com 96 horas de estocagem; D: tratamento com 144 horas de estocagem.

Nos períodos de estocagem da suspensão de *M. anisopliae* a 0, 48, 96 e 144 horas o total de adultos de *P. americana* mortos foi de 20, 11, nove e quatro respectivamente, sendo que todos estes apresentaram o crescimento de *M. anisopliae*. No grupo controle não houve mortalidade de adultos durante o período do experimento. Lopes (2005) avaliou a viabilidade de conídios em isca armazenada e formulação de talco a 27°C e não observou a redução da viabilidade dos conídios armazenados até 72 horas de armazenamento. No entanto, após 120 horas o número de conídios foi até 100 vezes menor, se comparado com o número de conídios após uma hora de armazenamento. Neste mesmo trabalho o autor utiliza o armazenamento de conídios de *M. anisopliae* à -40°C, temperatura em que obtém viabilidade acima de 95%.

A metodologia de estocagem da suspensão de *M. anisopliae* sob refrigeração a 4°C, temperatura encontrada em geladeiras, não foi viável porque houve influência do período de armazenamento da suspensão na sobrevivência dos indivíduos de *P. americana*. Talvez a diferença se deva ao fato de que foi utilizada uma suspensão fúngica, enquanto que Abreu et al. (1983) afirmam que a forma mais adequada para uso de fungos no controle biológico é o conídio seco, sendo mais resistente a condições ambientes, podendo ser preservado por até um ano. Marques, Alves e Marques (2000) ao utilizarem conídios secos do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) (Ascomycetes: Sordariomycetidae) armazenados em freezer à -7°C, obtiveram após 80 meses, 100% de viabilidade e elevada virulência, pois causou 94% de mortalidade em lagartas de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae).

A umidade elevada é necessária para a germinação de esporos de *M. anisopliae* para que ocorra infecção do hospedeiro, com penetração na quitina e colonização da hemocele do inseto (CASTRILLO; ROBERTS; VANDERBERG, 2005). Conforme Walstad, Anderson e Stambaugh (1970) a germinação de esporos em um período de 24 horas, com UR de 100%, é de até 57%, já com umidade abaixo de 92,5% ocorre inibição da germinação dos esporos. Além disso, a sobrevivência dos esporos é afetada pela temperatura de estocagem, à temperatura de 8°C os esporos se mantêm viáveis pelo menos por 12 meses, já em 21°C sobrevivem por apenas 2,5 meses (WALSTAD; ANDERSON; STAMBAUGH, 1970).

As limitações no uso de fungos entomopatogênicos para controle de baratas são: o período necessário para obtenção de altos índices de mortalidade e o desempenho dos produtos em condições de campo. Tais razões levaram a retirada de produtos do mercado americano, como a isca Bio-Path™. No entanto, a associação do fungo com inseticida químico tem sido utilizada para eliminar os problemas da eficiência em campo (KAAKEH; REID; BENNETT, 1996).

4 CONCLUSÕES

Quanto maior o período de estocagem da suspensão de *M. anisopliae*, na concentração de 10⁷ conídios/ml, a 4°C, menor é seu impacto na redução da sobrevivência de *P. americana*.

5 REFERÊNCIAS

ABREU, O.C.; VALARINI, P.J.; CRUZ, B.P.B.; OLIVEIRA, D.A.; GABRIEL, D. Viabilidade do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, em função do

período e condições de armazenamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.50, n.1, p.57-63, 1983.

ALVES, Sérgio B.; ALMEIDA, J E.M.; MOINO, A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq, 1998.

CASTRILLO, Louela A.; ROBERTS, Donald W.; VANDERBERG, John D. The fungal past, present and future: Germination, ramification and reproduction. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.89, p.46-56, 2005.

CONSOLI, Rotraut A.G.B.; OLIVEIRA, Ricardo L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998.

GUTRHIE, David M.; TINDALL, Alexander R. **The biology of the cockroach**. London and Beccles: Edward Arnold Publ., 1968.

KAAKEH, Walid; REID, Biron L.; BENNETT, Gary W. Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Imperfect fungi: Hyphomycetes) and hydramethylon among German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). **Journal of Entomological Science**, v.31 n.04, p.378-390, 1996.

LOPES, Rogério Biaggioni. **Controle de *Blattella germanica* (L.) com *Metarhizium anisopliae* e inseticidas reguladores de crescimento**. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, jan. 2005.

LEITE, Luís G.; FILHO, Antonio B.; ALMEIDA, José E. M.; ALVES, Sérgio Batista. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: Esalq, 2003.

MARQUES, Edmilson J.; ALVES, Sérgio Batista; MARQUES, Irene M.R. Virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) após armazenamento de conídios em baixa temperatura. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29, n.2, p.303-307, 2000.

VIANNA, Élvia Elena Silveira; BERNE, Maria Elisabeth Aires; RIBEIRO, Paulo Bretanha. Desenvolvimento e longevidade de *Periplaneta americana* Linneu 1758 (Blattodea: Blattidae) **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7 n.2, p.111-115, 2001.

WALSTAD, J.D.; ANDERSON, R.F.; STAMBAUGH, W.J. Effects of environmental conditions on two species of muscadine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.16, p.221-226, 1970.