

Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre desenvolvimento do díptero *Muscina stabulans* em laboratório

[Action of *Metarhizium anisopliae* fungi over the development of *Muscina stabulans* dipteran in laboratory]

C.R. Zimmer^{1,2}, M.C. Cárcamo², P.B. Ribeiro^{1,2}, J.S. Nascimento³

¹Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel" - UFPel
Caixa Postal 354
96010-900 – Pelotas, RS

²Instituto de Biologia - UFPel – Pelotas, RS

³Universidade Federal da Paraíba – João Pessoa, PB

RESUMO

Avaliou-se o desenvolvimento de *Muscina stabulans* (Diptera, Muscidae) após exposição ao fungo *Metarhizium anisopliae* (isolado CG34), sob condições de laboratório. Suspensões de esporos foram preparadas nas concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/mL⁻¹. Noventa larvas pós-alimentar por tratamento, distribuídas em cinco tratamentos e três repetições, foram mergulhadas por um segundo nas respectivas suspensões, transferidas para placas de Petri com papel filtro umedecido e mantidas em estufa BOD à temperatura de 25°C, umidade relativa de 80% e fotoperíodo de 12:12 horas até a emergência dos adultos. Foram avaliados a taxa de mortalidade pupal e o período de desenvolvimento pupal. As larvas apresentaram suscetibilidade à ação de *M. anisopliae* em diferentes concentrações. A mortalidade pupal assim como o tempo de desenvolvimento das pupas (de 8,8 a 10 dias) aumentaram conforme o aumento da concentração de conídios (de zero a 47%). A aplicação de *M. anisopliae* nesta fase do ciclo biológico comprometeu o desenvolvimento de *M. stabulans* e interferiu no controle natural de pragas que se desenvolvem no mesmo ambiente.

Palavras-chave: mosca sinantrópica, controle biológico, controle microbiano

ABSTRACT

The development of *Muscina stabulans* (Diptera, Muscidae) after exposure to *Metarhizium anisopliae* (CG34 isolated) fungi under laboratory conditions was evaluated. Suspensions of spores were prepared in concentrations of 10^5 , 10^6 , 10^7 , and 10^8 conidia/mL⁻¹. Ninety postfeeding larvae per treatment, divided into five treatments and three repetitions, were dived for one second in the respective suspensions, and transferred to Petri dishes with humidified filter paper and maintained in BOD at 25 °C with 80% relative humidity and a 12:12h photoperiod, until the emergency of adults. The rate of pupal mortality and the period of pupal development were evaluated. The larvae showed susceptibility to the action of *M. anisopliae* in different levels of concentration. The pupal mortality increased accordingly to the increase in the conidia concentration (from zero to 47%), as well as prolonged the time of development of the pupae (from 8.8 to 10 days). The application of *M. anisopliae* in this phase of the biological cycle compromised the development of *M. stabulans* and interfered in the natural control of pests that develop in the same environment.

Keywords: sinanthropic fly, biological control, microbial control

INTRODUÇÃO

As moscas sinantrópicas são potenciais causadores de danos econômicos para criadores de animais, pois grande população se instala nesses locais, onde a oferta de substrato para o desenvolvimento larval é grande (Lomônaco e Prado, 1994), ocasionando incômodo e reduzindo a produtividade (Linhares, 1989). Programas de controle para moscas são normalmente baseados na utilização de produtos químicos. Porém, existem riscos potenciais tanto para o meio ambiente como para a saúde humana e ainda problemas relacionados ao desenvolvimento de resistência aos inseticidas (Howard e Wall, 1996). A necessidade de reduzir os impactos ambientais, causados pelo uso excessivo de agrotóxicos, tem motivado estudos de formas alternativas para controle de pragas, entre elas, a utilização de fungos entomopatogênicos.

A identificação de linhagens fúngicas patogênicas a moscas são de fundamental importância para estabelecer de medidas alternativas de controle de pragas sinantrópicas potenciais, assim como para conhecer os efeitos do fungo sobre insetos predadores que atuam como inimigos naturais dessas pragas. O fungo *M. anisopliae* é um componente natural da microbiota do solo pelo mundo inteiro e é agente da doença muscardine verde, que infecta insetos (Wright et al., 2004).

A suscetibilidade de muscídeos a fungos entomopatogênicos, particularmente Deuteromicetos (atuais mitospóricos), foi citada por Steinkraus et al. (1990) e, mais recentemente, por Renn et al. (1999), demonstrando o potencial patogênico como agentes de biocontrole para *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera, Muscidae).

No Brasil, a utilização de fungos entomopatogênicos como agentes de controle biológico vem sendo aplicada utilizando-se principalmente as espécies *M. anisopliae* (Metchnikoff) (Mitospórico, Hyphomycetes) e *Beauveria bassiana* (Balsamo) (Ascomycata, Sordariomycetidae). Poucos são os estudos direcionados ao controle biológico de moscas por fungos entomopatogênicos (Senna-Nunes et al., 2002).

A “falsa mosca dos estábulos” como é popularmente conhecida, *M. stabulans* (Fallén, 1817) (Diptera, Muscidae), é um inseto de distribuição mundial (Skidmore, 1985), comumente encontrada em matéria orgânica animal em decomposição. As larvas são saprófagas, tornando-se carnívoras facultativas no terceiro ínstar, onde participam do controle natural de populações de algumas espécies de Diptera, que se desenvolvem no mesmo ambiente (Legner e Dietrich, 1989), como *M. domestica* (Skidmore, 1985).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial patogênico e alguns efeitos subletais do isolado fúngico *M. anisopliae* (CG34) sobre larvas de terceiro estágio de *M. stabulans* em condições artificiais.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se uma colônia de *M. stabulans* já adaptada às condições de laboratório, mantida durante todo o período de experimentação em câmara climatizada com temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar acima de 75% e com fotofase de 12 horas, localizada no Laboratório de Biologia de Insetos no Instituto de Biologia (IB) da Universidade Federal de Pelotas. Os adultos foram mantidos em gaiolas teladas (30x30x30cm) e alimentados com açúcar refinado e farinha de carne, na proporção de 2:1, respectivamente. A água foi oferecida em copos de *becker* com espuma de poliestireno cobrindo a superfície do líquido.

As larvas foram obtidas a partir de meio de cultura, exposto no interior das gaiolas, composto por farinha de carne e serragem na proporção de 2:1, adicionando-se água em quantidade suficiente para torná-lo pastoso. As posturas foram transferidas para um recipiente maior, contendo o mesmo meio, dentro de um funil de coleta. Nesse meio, após a eclosão, as larvas foram alimentadas até o terceiro ínstar, quando então abandonaram o substrato, e caíram em um recipiente contendo serragem úmida, para posterior pupariação.

O fungo *M. anisopliae* (CG34), preservado sob refrigeração em meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA) e repicado para tubo de ensaio contendo o mesmo meio de cultivo, foi incubado em estufa a 25°C , com fotoperíodo de 12h. Após

a esporulação da cultura, foram feitas suspensões de esporos nas concentrações de $1,0 \cdot 10^5$; $1,0 \cdot 10^6$; $1,0 \cdot 10^7$ e $1,0 \cdot 10^8$ conídios.mL⁻¹, em água destilada estéril adicionada de espalhante adesivo (Tween 80) na proporção de 0,01%.

Após a obtenção, as larvas foram mergulhadas por um segundo nas respectivas suspensões, sendo o tratamento-controle composto apenas por água destilada estéril adicionada de 0,01% de Tween 80. Em seguida, foram acondicionadas em placas de Petri, forradas com papel absorvente previamente umedecido, em grupos de 30 larvas, sendo três repetições por tratamento, totalizando 90 larvas por tratamento, mantidas em estufa BOD à temperatura de 25°C, umidade relativa de 80% e fotoperíodo de 12:12h. O experimento foi avaliado diariamente até a emergência dos adultos para verificações dos possíveis efeitos subletais. As variáveis

monitoradas foram mortalidade e período de desenvolvimento pupal.

Para o parâmetro período de desenvolvimento pupal, foi realizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis para verificação da disparidade entre os diferentes tratamentos, seguido de comparações entre as médias a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A mortalidade de *M. stabulans*, cujas larvas foram tratadas com fungo entomopatogênico, demonstrou uma tendência crescente com o aumento das concentrações de *M. anisopliae* (CG34), em que a maior eficiência se deu na concentração de $1,0 \cdot 10^8$ conídios.mL⁻¹, tanto na mortalidade total como na mortalidade pupal (Tab. 1).

Tabela 1. Porcentagem de mortalidade e de indivíduos com defeitos em larvas, pupas e adultos anômalos de *Muscina stabulans*, cujas larvas foram tratadas com *Metarhizium anisopliae* em condições de laboratório

	Concentração de <i>Metarhizium anisopliae</i>				
	10 ⁰ * (90)	10 ⁵ (90)	10 ⁶ (60)	10 ⁷ (90)	10 ⁸ (90)
Mortalidade total (%)	0	3,30	25,00	20,00	50,00
Mortalidade pupal (%)	0	3,30	6,20	5,30	47,10
Indivíduos com defeitos (%)	-	-	4,45	5,56	-

*Água destilada estéril adicionada de 0,01% de Twenn 80.
Valor entre parênteses refere-se ao número de larvas utilizadas no tratamento.
Mortalidade total: mortalidade de larvas mais pupas.

A suscetibilidade de distintas espécies de moscas a diferentes fungos entomopatogênicos foi demonstrada por diversos autores, como o potencial patogênico do fungo *M. anisopliae* sobre *M. domestica* (Barson et al., 1994; Bernardi et al., 2006), em adultos de *M. domestica* e *Bactrocera tryoni* (Frogatt) (Diptera, Tephritidae) (Carswel et al., 1998), em ovos, pupas e adultos da mosca do chifre, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae) (Angel-Sahagun et al., 2005), somente adultos de *H. irritans* (Lohmeyer e Miller, 2006) e também em espécies da família Calliphoridae como *Lucilia sericata* (Wright et al., 2004). O fungo *B. bassiana* também apresenta patogenicidade sobre dípteros como *M. domestica* (Watson et al., 1995; Angel-Sahagun et al., 2005), e ainda

existem citações para os fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophilum* sobre adultos de *M. domestica* (Senna-Nunes et al., 2002) e *Paecilomyces fumosoroseus* patogênico para *H. irritans* (Angel-Sahagun et al., 2005).

Em pesquisa com fungos entomopatogênicos em solos britânicos foi apontado que as espécies mais comuns foram *B. bassiana* e *Paecilomyces farinosus*, mas com maior prevalência em amostras de solo de florestas e não de solos com características de cultivo (Chandler et al., 1997). Porém, depois de uma inoculação inicial, *B. bassiana* apresentou persistência baixa no solo (Vänninen et al., 2000). Em comparação, *M. anisopliae* persistiu extremamente bem e, depois de três anos, permaneceu em números suficientes

Ação do fungo...

de propágulos infecciosos, infectando mais de 80% de larvas de *Tenebrio molitor* (Linnaeus) (Coleoptera, Tenebrionidae) usadas como iscas no solo. A concentração mais alta de *M. anisopliae* foi encontrada nos 5cm superiores da camada do solo (Vänninen et al., 2000). Esses mesmos autores salientaram, que durante o inverno, os fungos entomopatogênicos permanecem viáveis, até mesmo quando a temperatura do solo cai a 0°C e a temperatura do ar a -25°C, mas sem evidências de que eles, neste solo, são capazes de infectar os insetos nesta fase.

O isolado fúngico CG34 de *M. anisopliae* promoveu mortalidade total de pupas de terceiro ínstar pós-alimentar que variou de 3,3% a 50,0%, respectivamente, para as concentrações de $1,0 \cdot 10^5$ e $1,0 \cdot 10^8$ conídios.mL⁻¹, sugerindo uma relação diretamente proporcional (Tab. 1). Os valores obtidos de mortalidade são, em geral, comparáveis aos observados por outros autores, em que o grau de toxicidade depende da fase de desenvolvimento do inseto, do ínstar, da concentração da suspensão fúngica utilizada no bioensaio e do tipo e tempo de exposição em que o inseto foi submetido ao tratamento.

Barson et al. (1994), ao avaliarem o potencial entomopatogênico de seis espécies de fungos, citaram *M. anisopliae* como a espécie com maior potencial patogênico sobre larvas de terceiro ínstar de *M. domestica*, quando estas foram mergulhadas em suspensões de $1,0 \cdot 10^6$ e $1,0 \cdot 10^5$ conídios.mL⁻¹, emergindo apenas 1,0 e 16,0%, respectivamente, sendo que, com o aumento da concentração, ocorreu a morte de todas as larvas.

Wright et al. (2004), ao testarem *M. anisopliae* como agente potencial de biocontrole contra fêmeas adultas *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera, Calliphoridae), obtiveram, em teste com suspensão de esporos em óleo de silicone, porcentagens mais altas de infecção (50-70%) do que os formulados em 0,3g L⁻¹ do detergente Tween 80 (10-20%). A concentração de esporo mostrou efeito significativo sobre a infecção de moscas, com índices mais altos de mortalidade (64%) na suspensão de $1,0 \cdot 10^7$ conídios.mL⁻¹.

Bernardi et al. (2006) verificaram que o isolado de *M. anisopliae* (CG34) apresentou potencial

entomopatogênico sobre as pupas de *M. domestica*, isto é, 68% de mortalidade na concentração de $1,0 \cdot 10^7$ conídios.mL⁻¹. Já o isolado de *B. bassiana* (CG240) resultou em somente 2% de mortalidade na mesma concentração.

As concentrações $1,0 \cdot 10^6$ e $1,0 \cdot 10^7$ conídios.mL⁻¹ apresentaram considerável porcentagem de indivíduos com má-formação de asas, 4,4% e 5,6%, respectivamente (Tab. 1). A taxa de indivíduos malformados somados à taxa de mortalidade total mostram, que nas concentrações $1,0 \cdot 10^6$ e $1,0 \cdot 10^7$ conídios.mL⁻¹, o índice de mortalidade seria elevado para 29,4% e 25,6%, respectivamente, uma vez que indivíduos com anomalias de asas são incapazes de voar, conseqüentemente não se reproduzem e, assim, tornam-se moscas inviáveis.

O período de desenvolvimento pupal diferiu significativamente entre os tratamentos ($P < 0,001$) (Fig. 1), isto é, os tratados foram mais tardios que o do grupo-controle. No entanto, nas três concentrações intermediárias ($1,0 \cdot 10^5$; $1,0 \cdot 10^6$ e $1,0 \cdot 10^7$ conídios.mL⁻¹), não houve diferença significativa entre si, enquanto a maior concentração ($1,0 \cdot 10^8$ conídios.mL⁻¹) foi diferente de todos os outros tratamentos. O tempo de desenvolvimento foi diretamente proporcional ao aumento da concentração fúngica de *M. anisopliae*, isto é, a diferença entre o controle e o tratamento com maior período de desenvolvimento pupal foi de, aproximadamente, um dia.

O aumento no período de desenvolvimento, diretamente relacionado com o aumento da concentração de *M. anisopliae* e, conseqüentemente, com a mortalidade, pode ser atribuído à ação do fungo, que aumenta com o passar do tempo (Senna-Nunes et al., 2002), e à velocidade do processo germinativo, que depende do isolado fúngico, porém, em geral, estão envolvidos processos importantes para que ocorra a penetração e a colonização do fungo. Uma certa densidade de conídios é requerida para que ocorra a penetração efetiva do fungo na cutícula (Zhioua et al., 1997), como um mecanismo de ação em massa, o que explica a baixa patogenicidade encontrada nas suspensões de menor concentração de conídios.

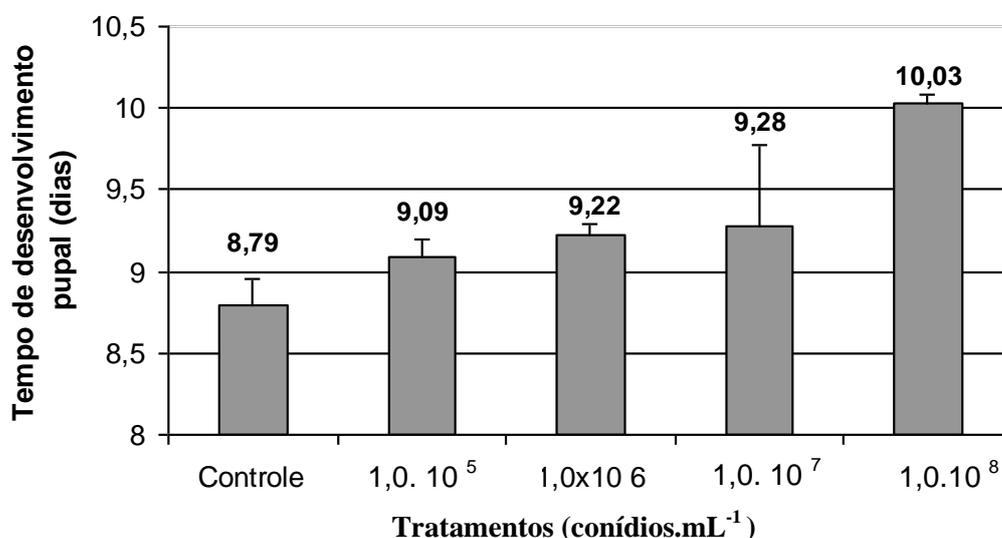


Figura 1. Tempo de desenvolvimento de pupas de *Muscina stabulans*, de acordo com a concentração de *Metarhizium anisopliae* em condições de laboratório. As barras representam o desvio-padrão da média.

Em situações adversas, os dípteros tendem a prolongar o tempo de desenvolvimento para completar seu ciclo (Mueller et al., 2005; Zimmer et al., 2006), e, com o aumento do período pupal, esses indivíduos permaneceriam mais tempo no ambiente de desenvolvimento, na fase de pupa, que, por se tratar de estágio imóvel, torna o inseto mais sensível a condições desfavoráveis.

Se se considerar o efeito cumulativo de mortalidade observado no experimento, juntamente com o prolongamento do período de desenvolvimento, constata-se que a patogenicidade de *M. anisopliae* foi efetiva contra larvas de terceiro estágio de *M. stabulans*. Desse modo, são necessários estudos adicionais com diferentes concentrações fúngicas, diferentes formas de aplicação, testes com outros estágios de desenvolvimento para, assim, entender o impacto do fungo entomopatogênico e sua dinâmica sobre a população de insetos não alvo, que apresentam relevante importância no controle natural de insetos praga como *M. domestica*.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o fungo *M. anisopliae* isolado CG34 exerce atividade patogênica sobre

larvas L3 de *M. stabulans*, reduz a viabilidade de pupas e aumenta o período de desenvolvimento pupal, indicando que a aplicação do fungo, nesta fase do ciclo biológico da mosca, compromete o seu desenvolvimento e interfere no controle natural que o inseto realiza sobre espécies pragas que se desenvolvem no mesmo ambiente.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela bolsa de doutorado ao primeiro autor e bolsa de mestrado concedida ao segundo autor. Aos biólogos Juliano Lessa Pinto Duarte, pelas correções no abstract e Eduardo Bernardi, pelo auxílio na preparação das suspensões fúngicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGEL-SAHAGÚN, C.A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA J. et al. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). *J. Insect Sci.*, v.5, p.1-8, 2005.
- BARSON, G.; RENN, N.; BYWATER, A. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly (*Musca domestica* L.), a pest of intensive animal units. *J. Inverteb. Pathol.*, v.64, p.107-113, 1994.

- BERNARDI, E.; PINTO, D.M.; NASCIMENTO, J.S. et al. Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre o desenvolvimento de *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) em laboratório. *Arq. Inst. Biol.*, v.73, p.127-129, 2006.
- CARSWELL, R.; SPOONER-HART; MILNER, R.J. Laboratory susceptibility of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) and *Bactrocera tryoni* (Frogatt) (Diptera: Tephritidae) to an isolate of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Entomol.*, v.37, p.1-284, 1998.
- CHANDLER, D.; HAY, D.; REID, A.P. Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. *Appl. Soil Ecol.*, v.5, p.133-141, 1997.
- HOWARD, J.; WALL, R. Control of the house fly, *Musca domestica*, in poultry units: current techniques and future prospects. *Agr. Zool. Rev.*, v.7, p.247-265, 1996.
- LEGNER, E.F.; DIETRICH, E.J. Coexistence of predatory *Muscina stabulans* and *Ophyra aenescens* (Diptera: Muscidae) with dipterous prey in poultry manure. *Entomophaga*, v.34, p.453-461, 1989.
- LINHARES, A.X. Perspectivas em controle biológico de dípteros muscoides. In: SEMINÁRIO SOBRE INSETOS E ÁCAROS, 3., 1989, Campinas, SP. *Anais...* Campinas, SP: Sociedade Entomológica do Brasil, 1989. p.123-133. (Resumo).
- LOHMEYER, K.H.; MILLER, J.A. Pathogenicity of three formulations of entomopathogenic fungi for control of adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.*, v.99, p.1943-1947, 2006.
- LOMÔNACO, C.; PRADO, A.P., Estrutura comunitária e dinâmica populacional da fauna de dípteros e seus inimigos naturais em granjas avícolas. *An. Soc. Entomol. Brasil*, v.23, p.71-80, 1994.
- MUELLER, L.D.; FOLK, D.G.; NGUYEN, N. et al. Evolution of larval foraging behaviour in *Drosophila* and its effects on growth and metabolic rates. *Physiol. Entomol.*, v.30, p.262-269, 2005.
- RENN, N.; BYWATER A.F.; BARSON, G. A bait formulated with *Metarhizium anisopliae* for the control of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) assessed in large-scale laboratory enclosures. *J. Appl. Entomol.*, v.123, p.309-314, 1999.
- SENNA-NUNES, M.; COSTA, G.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. et al. Avaliação in vitro dos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophilum* em larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Parasitol. Latinoam.*, v.57, p.9-14, 2002.
- SKIDMORE, P. *The biology of the Muscidae of the world*. Dordrecht: Dordrecht Kunk, 1985. 550p.
- STEINKRAUS, D.C.; GEDEN, C.J.; RUTZ, D.A. et al. First report of the natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Moniliales - Maniliaceae) in *Musca domestica* (Diptera, Muscidae). *J. Med. Entomol.*, v.27, p.309-312, 1990.
- WRIGHT, C.; BROOKS, A.; WALL, P.R. Toxicity of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to adult females of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Pest. Manag. Sci.*, v.60, p.639-644, 2004.
- VÄNNINEN, I.; TYNI-JUSLIN, J.; HOKKANEN, H. Persistence of augmented *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Finnish agricultural soils. *Biocontrol*, v.45, p.201-222, 2000.
- WATSON, D.W.; GEDEN, C.J.; LONG, S.J. et al. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). *Biol. Control*, v.5, p.405-411, 1995.
- ZHIOUA, E.; BROWNING, M.; JOHNSON, P.W. et al. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes acapularis* (Acari: Ixodidae). *J. Parasitol.*, v.83, p.815-818, 1997.
- ZIMMER, C.R.; PIRES, S.M.; CÁRCAMO, M.C. et al. Efeitos da competição larval intra-específica sobre caracteres biométricos de *Muscina stabulans* (Fallén, 1817) (Diptera: Muscidae) em laboratório. *Arq. Inst. Biol.*, v.73, p.203-209, 2006.