

ATIVIDADE LARVICIDA DE *TOLYPOCLADIUM CYLINDROSPORUM* E *METARHIZIUM* SPP. EM MOSQUITOS

SOUSA, Paulo Oliveira de¹; **SANTOS**, Adelair Helena dos²; **ELIAS**, Carmeci Natalina³; **LUZ**, Christian⁴

Palavras-chave: controle biológico, mosquitos, fungos entomopatogênicos.

1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

Mosquitos são importantes vetores de doenças como viroses ou parasitoses. Estes vetores são combatidos principalmente com inseticidas sintéticos. O uso destes pesticidas químicos em larga escala, em todo o mundo, tem causado graves desequilíbrios ecológicos. O impacto nocivo desses produtos, para o homem e o meio ambiente, e o risco do aparecimento de novos casos de resistência, exigem um maior empenho nas investigações sobre medidas de um controle alternativo dos insetos vetores. A utilização de microrganismos patogênicos como vírus, bactérias e fungos, abre novas possibilidades para o controle de insetos nocivos na área agrícola, médica e veterinária. Bioinseticidas à base de bactérias, como o *Bacillus thuringiensis* ou *B. sphaericus*, ou de fungos, como *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, foram utilizados com grande êxito no combate de insetos nocivos. Bactérias e fungos têm também potencial para combate de mosquitos. Hyphomycetes, como *Beauveria* spp., *Metarhizium* spp. e *Tolypocladium* spp. e outros gêneros, foram testados em mosquitos, como *Aedes* spp., *Anopheles* spp. e *Culex* spp. (KANZOK & JACOBS-LORENA, 2006) e são candidatos promissores para controle de mosquitos. O objetivo deste trabalho foi testar a atividade de *T. cylindrosporum* em larvas de *Aedes* spp. e *C. quinquefasciatus*, além de testar a atividade de isolados de *Metarhizium* spp. em larvas de *A. aegypti*.

2. METODOLOGIA

2.1 Origem, cultivo e preparação dos fungos

Oito linhagens de *T. cylindrosporum*, originários do USDA/ARS (EUA) (ARSEFs 705, 962, 1027, 1580, 2777, 2912, 2920 e 3392) foram cultivados em meio completo (MC) a 25°C, umidade relativa (UR) de 75±5% e fotofase de 12h, durante 10d, para produção de conídios. Os conídios foram recolhidos em 10ml de água com 0,1% de Tween 80, sendo a suspensão agitada com pérolas de vidro em vórtex e filtrada com algodão hidrófilo. Os conídios foram quantificados com câmara de Neubauer e foram preparadas suspensões com concentrações de 10⁷ conídios/ml. Seis isolados de *Metarhizium* spp. provenientes de amostras de solos de Cerrado do Estado de Goiás (IP 23, IP 46, IP 75, IP 84, IP 117, IP 139) foram cultivados em meio BDA (Batata Dextrose Ágar) para obtenção de conídios. Os conídios foram quantificados de maneira semelhante ao *T. cylindrosporum* e preparadas suspensões com concentração de 10⁷ conídios/ml. Após testes preliminares, foram avaliadas as concentrações letais (LC_{50/90}) de conídios e blastosporos para o isolado ARSEF

1580 para larvas das três espécies de mosquito, em 5 concentrações: 10^6 , $3,3 \times 10^6$, 10^7 , $3,3 \times 10^7$, 10^8 propágulos/ml. Blastosporos do isolado ARSEF 1580 foram produzidos em 125ml de MC líquido a 25°C e 240 rpm durante 5d. Os blastosporos foram recolhidos por filtração do meio líquido, lavados, centrifugados e preparadas suspensões com concentrações específicas, semelhante aos conídios.

2.2 Criação de mosquitos

Mosquitos das espécies *A. aegypti*, *A. albopictus* e *C. quinquefasciatus* foram criados em câmara climatizada a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, com UR de $80 \pm 5\%$ e fotofase de 12h, conforme método de SILVA & SILVA (1998).

2.3 Testes da atividade larvicida

Foram utilizadas 20 larvas do segundo estágio (L_2) recém mudadas das espécies citadas. As larvas foram transferidas para copos plásticos de 3,5x4,2cm com 18ml de água autoclavada para larvas de *Aedes spp* e copos de 6x6cm com 45ml de água para larvas de *C. quinquefasciatus*. Após a transferência, as larvas foram incubadas durante 24h a 25°C, sem alimentação. Em seguida, foram aplicados 2ml da suspensão de propágulos para *Aedes spp* e 5ml para *C. quinquefasciatus*. A mortalidade das larvas foi acompanhada diariamente. Os valores de mortalidade foram transformados em arcsin e examinados com análise de variância e teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls. Médias foram consideradas significativamente diferentes com $P < 0,05$. Os valores de $LC_{50/90}$ foram calculados com análise de Probit.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A mortalidade das larvas foi avaliada em relação à espécie de mosquito, isolado, propágulo, concentração do fungo e tempo de exposição. Foi observada mortalidade de larvas das três espécies testadas, 24h *post inoculationem* (*p. i.*) em ambos os fungos e tipos de propágulos. A mortalidade de larvas tratadas com conídios de *T. cylindrosporum* variou de acordo com a espécie. Para *A. aegypti* a mortalidade larval variou entre 5% (ARSEF 2912) e 25% (ARSEF 1580), 5d *p. i.* e entre 15% (ARSEF 2777) e 63,7% (ARSEF 1580), 15d *p. i.* Para *A. albopictus*, a mortalidade larval variou entre 41,2% (ARSEF 2912) e 48,7% (ARSEF 1580), 15d *p. i.* Para *C. quinquefasciatus* a mortalidade larval variou entre 21% (ARSEF 2777) e 51,2% (ARSEF 2912) 10d *p. i.* A mortalidade larval acumulada nos controles foi inferior a 20%, nas três espécies tratadas, 10d *p. i.* Verificou-se ainda que o isolado ARSEF 1580 induziu maior mortalidade larval nos 20d *p. i.*, não sendo encontrado diferença significativa entre as três espécies de mosquitos ($1,3 < F_{7, 31} < 2,0$; $P > 0,09$). Após os testes preliminares, foram avaliadas as concentrações letais ($LC_{50/90}$) de conídios e blastosporos para o isolado ARSEF 1580, em 5 concentrações: 10^6 , $3,3 \times 10^6$, 10^7 , $3,3 \times 10^7$, 10^8 propágulos/ml, nas três espécies de mosquitos. Não foi observada diferença significativa entre os valores de CL_{50} encontrados 5d *p. i.* de $8,88 \times 10^7$ conídios e $6,28 \times 10^8$ blastosporos em *A. aegypti*. Nos demais dias analisados, houve diferença significativa entre os valores de CL_{50} obtidos para os propágulos: $4,46 \times 10^7$ (conídios) e $1,45 \times 10^7$ (blastosporos) para o dia 10 *p. i.*, e $2,88 \times 10^6$ (conídios) e $4,36 \times 10^6$ (blastosporos) no dia 15 *p. i.* Já para CL_{90} , não houve diferença significativa entre conídios e blastosporos nos mesmos dias analisados. Para *C. quinquefasciatus*, foi observada mortalidade larval em 80% das concentrações de conídios e em todas as concentrações de blastosporos 24h *p. i.* Para conídios, a mortalidade variou entre 25%, nas concentrações $3,3 \times 10^6$ e 10^7 conídios/ml, em 5d *p. i.* Quinze dias *p. i.* a mortalidade variou entre 30% na concentração de 10^6 e 95%

na concentração de 10^8 conídios/ml. Para blastosporos, a mortalidade variou entre 70% nas concentrações de $3,3 \times 10^7$ e 10^8 blastosporos/ml e menores que 30% nas demais concentrações. Já em *Metarhizium* spp., 3 isolados (IP 23, IP 46 e IP 75) induziram mortalidade larval acumulada de 60%, em 5d *p. i.* Aos 10d *p. i.*, os isolados IP 23 e IP 46 induziram mortalidade larval acima de 90% em larvas de *A. aegypti*. A atividade das linhagens do *T. cylindrosporum* testadas no presente trabalho foi contraditória. Os resultados obtidos nos testes sobre a atividade de propágulos diferentes em mosquitos mostraram que blastosporos foram mais virulentos quando comparados com conídios. Soares (1985) testando *T. cylindrosporum* também encontrou alta atividade de blastosporos em larvas de *A. aegypti*. Os resultados da atividade de *Metarhizium* spp. em *A. aegypti* mostraram uma variabilidade entre isolados, evidenciando que, entre os isolados testados, o IP 46 obteve maior atividade. Os valores de mortalidade acumulada de larvas de *Aedes* spp., nos controles, não ultrapassaram 20% a partir de 10d *p. i.* Entretanto, para *C. quinquefasciatus* a mortalidade de larvas no controle foi superior a 20%, que aliada a baixa mortalidade das larvas tratadas inviabilizou o cálculo da CL_{50} e CL_{90} para essa espécie.

4. CONCLUSÕES

O potencial das linhagens testadas de *T. cylindrosporum* para combater larvas de *Aedes* spp. e *C. quinquefasciatus* foi variável, sendo o isolado ARSEF 1580 o que apresentou maior potencial. Outras linhagens mais virulentas deveriam ser estudadas. Dos isolados testados de *Metarhizium* spp., o IP 46 apresentou maior atividade sobre as larvas de *A. aegypti*. Mais estudos serão realizados para esclarecer melhor a atuação nas larvas e em outras fases de desenvolvimento e a aplicação desse fungo para combate do mosquito.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KANZOK, S. M., JACOBS-LORENA, M. Entomopathogenic fungi as biological insecticides to control malaria. **Trends in Parasitology**, Vol. 22, No. 2, 49-51, 2006.
- SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G.; LIRA, K. S. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. **Revista de Patologia Tropical** 27: 53-63, 1998.
- SOARES-JR., G. G.; RIBA, G.; CAUDAL, A.; VINCENT, J. J. Comparative studies of eleven isolates of the fungal entomopathogen *Tolypocladium cylindrosporum* and two isolates of *Tolypocladium extingens*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 46: 115-120, 1985.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/PIBIC

¹ Bolsista de Iniciação Científica. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública / UFG – Laboratório de Patologia de Invertebrados, bio_hunter@pop.com.br

² Professora / Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública / UFG – adelair@iptsp.ufg.br

³ Laboratorista -Secretaria Municipal de Saúde/ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública / UFG- Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos

⁴ Orientador / Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública / UFG – Laboratório de Patologia de Invertebrados wolf@iptsp.ufg.br