

Atividade Ovicida de Fungos Entomopatogênicos em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Tai, Marina H. H. e Luz, Christian

DMIPP, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, CP 131,
74001-970 Goiânia, GO, Brasil

Palavras-chave: Culicidae, Aedini, controle biológico, fungos

Introdução

Aedes aegypti (L.) é o principal vetor urbano de flavivírus causadores de dengue e febre amarela. Os níveis de infestação do mosquito têm aumentado devido a mudanças climáticas, urbanização descontrolada e expansão do comércio internacional (Monath 2001, Lounibos 2002). O controle vetorial é feito ,principalmente, baseado no uso de inseticidas sintéticos. A detecção de novos casos de resistência de *Ae. Aegypti* a estes inseticidas estimulou estudos e a integração de novos métodos de controle deste mosquito, como os reguladores de crescimento e microorganismos entomopatogênicos (Rodriguez et al. 2000, Polanczyk et al. 2003, Braga et al. 2004). Os fungos surgiram como candidatos a controladores biológicos de mosquitos. Embora a susceptibilidade de larvas de mosquitos a fungos como *Lagenidium* Schenk, *Coelomomyces* Keilin, *Culicinomyces* Couch et al., *Beauveria* Vuillemin, *Metarhizium* Sorokin, e a outros seja bem estudada (Scholte et al. 2004, Silva et al. 2004), há pouca informação sobre atividade ovicida contra mosquitos. *Penicillium citrinum* Thom foi encontrado sobre ovos de *Ae. aegypti* em testes de campo e pode agir como agente de controle natural (Russell et al. 2001). Em outro estudo, com ovos do mesmo mosquito, não houve evidência de atividade ovicida em condições laboratoriais com *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, um conhecido fungo entomopatogênico (Clark et al. 1968). Ovos de *Ae. aegypti* que são geralmente depositados em ambientes próximos a coleções de água têm suas larvas dentro de ovos sobrevivendo por longo tempo até que os ovos sejam submersos em

água, desta forma, ovos estão expostos à contaminação e infecção por fungos terrestres.

Objetivos

O presente trabalho teve o objetivo de mostrar atividade de 21 fungos entomopatogênicos contra ovos de *Ae. Aegypti* contribuindo possivelmente para um controle integrado deste vetor.

Metodologia

Se não for mencionado diferentemente, ovos foram inoculados com conídios obtidos a partir de 15 d de culturas esporuladas em meio batata dextrose ágar (BDA) ajustados a pH 7 em placas de Petri (100 por 20 mm), à 25°C e 12-h de fotofase ([Silva et al. 2005](#)). *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson foi cultivado em meio batata-maltose-ágar, preparada de forma similar ao meio BDA, utilizando maltose em vez de dextrose. Conídios foram obtidos através de raspagem direta com espátula da superfície de cultura e suspensos em 10 ml de solução estéril de 0.1% Tween 80. A suspensão foi agitada por 3 min com pérolas de vidro, filtrada com gaze para remover debris de hifas e ajustada a concentrações definidas através de câmara de Neubauer. *Evlachovaea kintrischica* Borisov & Tarasov, *Hirsutella thompsonii* Fisher, e *Isaria amoenorozea* P. Hennings produziram quantidade insuficiente de conídios para os testes. Para estas espécies, corpos hifais foram produzidos em meio líquido de Sabouraud-dextrose (SDY) ([Goettel and Inglis 1997](#)) e estes foram inoculados com micélio ou conídios suspensos em 100 ml de SDY e incubados em um frasco Erlenmeyer de 250-ml por 5 d à 25°C e 240 rpm numa centrífuga. Corpos hifais foram, então, separados da massa de micélio através de filtração com gaze e, após, centrifugados por 5 min, lavados duas vezes com 50 ml de água estéril deionizada e ajustados a concentrações pré-definidas. A viabilidade de conídios ou corpos hifais de todos os fungos testados foi confirmada a cada teste, 50 µl de 10⁶ propágulos por ml foram inoculados em SDY com 18 g/litro de agar em placas de petri (60 por 15 mm). A germinação ou crescimento foi avaliada para 100 conídios ou corpos hifais,

respectivamente, em quatro áreas separadas por placa após 24-h de incubação à 25°C e fotofase de 12-h. *Ae.aegypti* de larvas livres de vírus coletadas em Goiânia, Brasil, em 1991, foram criadas em laboratório de acordo com Silva et al. (1998). Ovos com 3 a 5 dias de idade foram cuidadosamente retirados com pincel de papéis filtro utilizados pelas fêmeas para oviposição e 25 ovos foram colocados sobre pequenos "barquinhos" de papel filtro estéril com bordas (1mm altura) e superfície total de 1 cm². Os barquinhos foram distribuídos em cima de papel filtro sobre o fundo de uma placa de petri (100 por 20 mm). Ovos foram expostos à luz UVC por 15 min para redução de microbiota. Um efeito deletério de UVC em larvas dentro dos ovos de *Ae. Aegypti* e sobre sua eclosão subsequente foi eliminada em testes prévios. Ovos foram então tratados topicamente com 50 µl de propágulos fúngicos suspensos numa concentração final de 5 × 10⁶ conídios ou corpos hifais por cm², ou apenas água como controle, secados por 1 h a UR 75 ± 5% e 25 ± 1°C e após, incubados em câmara úmida de (40 por 37 por 27 cm) à 25°C e UR próxima de saturação. A umidade relativa >98% foi regulada com solução saturada de K₂SO₄ (Winston and Bates 1960). Após 24 h, ovos foram avaliados em microscópio (80×) verificando-se danos físicos. Testes prévios mostraram que um breve contato com a suspensão durante tratamento induziu à eclosão de 10–20% das larvas. Estas não sobreviveram e tiveram suas cascas parcialmente abertas e dessecaram, morrendo dentro de horas. Considerando tal fato, apenas 20 ovos sem danos visíveis foram deixados em cada barquinho de teste, depois eles foram incubados à mesma temperatura e UR por até 25 d. Após um período de 5, 10, 15 e 25 d, ovos foram checados quanto ao crescimento fúngico e os barquinhos foram submersos em copinhos de plástico (3.5 por 5 cm) com 20 ml de água da torneira autoclavada. Uma pequena quantidade de ração triturada para gatos (Black Jack, Alisul Alimentos S.A., São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brazil) foi salpicada sobre os copinhos e deixados a 25°C, 75 ± 5% UR, e 12-h fotofase. Eclosão larval foi estimulada através de incubação por 15 min em banho-maria a 37°C e avaliada 2 h depois. Presença de larvas foi examinada diariamente por 10 d após submersão dos ovos em água. Os níveis de água foram substituídos a cada dia e as larvas foram alimentadas em dias alternados como

mencionado anteriormente. Quatro repetições independentes de 20 ovos foram testadas, cada teste com diferentes culturas fúngicas, para cada espécie de fungo. Valores encontrados foram transformados em Arcsine-square root e analisados com análise de variância e Student–Newman–Keuls (SNK) multiple range test. Médias foram consideradas estatisticamente diferentes a $P > 0.05$.

Resultados

Micélio e conídios novos foram detectados primeiramente sobre ovos tratados com *Cladosporium cladosporioides* (Fresenius) deVries, *Isaria farinosa* (Holm: Fries) Fries, *Isaria fumosorosea* (Wize), *Paecilomyces carneus* (Duché & Heim) Brown & Smith, *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson, and *Penicillium* sp., 5 d após aplicação e incubação. Nos dias seguintes houve mumificação de ovos, micélio abundante e conídios foram encontrados em grande quantidade de ovos (80%) tratados com *C. cladosporioides*, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, *Penicillium* sp., and all *Isaria/Paecilomyces* spp., except *I. amoenosea* and *Paecilomyces variotii* Bainier. Após submersão de ovos, as larvas de primeiro instar foram observadas em alguns minutos com contato com água, independentemente do tempo de incubação prévia. A maioria das eclosões ocorreu durante os 6 primeiros dias após submersão (Fig. 1). Subsequentemente, a eclosão não ultrapassou 25 % do total de eclosões independentemente do fungo ou período de incubação testado. Embora não houvesse diferença estatística significativa entre os fungos testados quando tratados com corpos hifais, houve uma alta significância do efeito de conídios das diferentes espécies sobre a eclosão ($F = 3.5$; $df = 17,270$; $P < 0.001$) e também no tempo de exposição de ovos tratados ($F = 31.8$; $df = 3,284$; $P < 0.001$) sobre a eclosão acumulada. As faltas de eclosões aumentaram com o aumento do tempo de exposição de ovos tratados com conídios e a 25 d de exposição houve menos eclosões ($F = 38.01$; $df = 17,54$; $P < 0.001$). As faltas de eclosão aumentaram com o tempo de exposição de ovos tratados com conídios e foi máxima com 25 d de exposição ($F = 38$; $df = 17, 54$; $P < 0.001$).

Um período curto de incubação (5-d) de ovos tratados de alguma forma atrasou a eclosão em comparação com 10 e 15 d de exposição. Embora as eclosões tenham chegado a 58.8% (*M. anisopliae*) após exposição em até 15 d, a eclosão de larvas decresceu distintamente entre ovos incubados por 15 d. Nesse período de exposição, a eclosão acumulada não excedeu 50% para as nove espécies, independentemente do propágulo fúngico testado, com valores mínimos encontrados para *I. farinosa* (1.3%), *P. carneus* (2.5%), *Paecilomyces marquandii* (Masse) Hughes (5.1%), *I. fumosorosea* (6.3%), *M. anisopliae* (11.3%), *Penicillium* sp. (20%), *P. lilacinus* (21.3%), *B. bassiana* (28.8%), and *E. kintrischica* (40%). As larvas que eclodiram com sucesso tornaram-se pupas a partir de 5 d após submersão em água de ovos tratados com *B. bassiana*, *Penicillium* sp., *P. lilacinus*, e de ovos controle. Um dia após, pelo menos uma pupa foi observada em 85.7% dos testes e a pupação continuou pelo restante da observação.

Discussão

Entre as espécies fúngicas testadas, *B. bassiana*, *E. kintrischica*, *M. anisopliae*, *P. carneus*, *I. farinosa*, *I. fumosorosea*, *P. marquandii*, *P. lilacinus*, and *Penicillium* sp. mostraram forte atividade ovicida contra *Ae. aegypti*. A efetividade de *B. bassiana* e *M. anisopliae* contra larvas e adultos foi demonstrada previamente, mas não sobre uma atividade ovicida desses ou de outros fungos contra o mesmo (Clark et al. 1968; Riba et al. 1986; Miranpuri and Khachatourians 1990; Silva et al. 2004, 2005). Fungos hifomicéticos dos gêneros *Fusarium*, *Paecilomyces*, e outros que não foram testados nesse estudo foram encontrados em campo em mosquitos adultos, mas eles não foram considerados como altamente efetivos contra larvas ou adultos de mosquitos (Scholte et al. 2004). Contudo, neste estudo, larvas não-eclodidas pareceram ser altamente susceptíveis à maioria das espécies de *Isaria/Paecilomyces* spp. testadas. *Tolypocladium cylindrosporium* W. Gams pode atingir larvas de *Ae. aegypti* larvae (Soares et al. 1985, Riba et al. 1986), mas não teve efeito sobre ovos desta espécie. Com exceção de *M. anisopliae*, que reduziu eclosões após 15-d ou mais de incubação, larvas dentro de ovos tratados não

foram afetadas e sobreviveram quando incubados até 15 d à 25°C e UR >98%. A 15 d, a maior parte das larvas eclodiu com sucesso e conseguiu chegar à pupação com taxas comparadas às dos controles, apesar da atividade ovicida observada em alguns fungos após longos períodos de exposição. A contaminação e infecção das larvas dentro dos ovos pela invasão fúngica e seu subsequente efeito sobre o desempenho de pupas e adultos pode ocorrer, mas não foi testada. À incubação a longos períodos larvas dentro de ovos foram obviamente afetadas por alguns dos fungos testados impedindo as mesmas de eclodirem, não está claro, porém, se as larvas haviam morrido pela invasão fúngica e infecção. Contudo, houve desenvolvimento abundante de micélio e conídios sobre a superfície dos ovos, acompanhado por deformação significativa de ovos pela maioria dos fungos que reduziu eclosão após 25 d de exposição. Supõe-se que as larvas não-eclodidas tenham morrido devido a micoses. Umidade elevada durante desenvolvimento fúngico na superfície da cutícula de insetos foi demonstrada como sendo fator chave para matar rapidamente grande quantidade de triatomíneos e outros insetos (Luz and Fargues 1999, Fargues and Luz 2000, El Damir 2006).

Conclusões

Criadouros de *Ae. aegypti* são geralmente próximos a coleções de água e a umidade nestes microhabitats, especialmente em pontos subterrâneos, são comparáveis àqueles de condições mostradas experimentalmente para permitir desenvolvimento fúngico. Larvas de aedini dentro dos ovos podem sobreviver por semanas ou até meses até que sejam inundadas com água para que haja eclosão. Nossos resultados mostraram que fungos entomopatogênicos, especialmente *M. anisopliae* e *Isarial/Paecilomyces* spp., têm potencial como um agente de controle natural para atacar não somente adultos e larvas de aedine mas também seus ovos.

Referências

Braga I. A., Lima J.B.P., Soares S. S., Valle D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99: 2004. 199–203.

Clark T. B., Kellen W. R., Fukuda T., Lindgren J. E. Field and laboratory studies of the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.* 11: 1968. 1–7.

El Damir M. Variation in germination, virulence and conidial production of single spore isolates of entomopathogenic fungi in response to environmental heterogeneity. *J. Biol. Sci.* 6: 2006. 305–315.

Fargues J., Luz C. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the infection potential of *Beauveria bassiana* for *Rhodnius prolixus*. *J. Invertebr. Pathol.* 75: 2000. 202–211.

Goettel M. S., Inglis G. D. Fungi: Hyphomycetes. Lacey L. *Manual of techniques in insect pathology. Biological Techniques Series.* 1997. 213–249 Academic. New York.

Lounibos L. P. Invasions by insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 2002. 233–66.

Luangsa-ard J. J., Hywel-Jones N. L., Manoch L., Samson R. A. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. *Mycol. Res.* 109: 2005. 581–589.

Luz C., Fargues J. Dependence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, on high humidity for infection of *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia*. 146: 1999. 33–41.

Miranpuri G. S., Khachatourians G. G. Larvicidal activity of blastospores and conidiospores of *Beauveria bassiana* (strain GK 2016) against age groups of *Aedes aegypti*. *Vet. Parasitol.* 37: 1990. 155–162.

Monath T. P. Yellow fever: an update. *Lancet Inf. Dis.* 1: 2001. 11–20.

Polanczyk R. A., Garcia M. O., Alves S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Rev. Saúde Pública*. 37: 2003. 813–816.

Riba G., Keita A., Soares G. G. Jr, Ferron P. Comparative studies of *Metarhizium anisopliae* and *Tolypocladium cylindrosporum* as pathogens of mosquito larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2: 1986. 469–473.

Rodriguez C.M.M., Bisset L.J.A., Fernandez D. M., Soca A. Malathion resistance in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* after its use in *Aedes aegypti* control programs. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 16: 2000. 324–330.

Russell B. M., Kay B. H., Shipton W. Survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) eggs in surface and subterranean breeding sites during the Northern Queensland dry season. *J. Med. Entomol.* 38: 2001. 441–445.

Samson R. A. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Stud. Mycol.* 6: 1974. 1–119.

Scholte E. J., Knols B.G.J., Samson R. A., Takken W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *J. Insect Sci.* 4/19: 2004. 1–24 (insectscience.org/4.19).

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. *Rev. Patol. Trop.* 27: 1998. 53–63.

Silva R. O., Silva H.H.G., Luz C. Effect of *Metarhizium anisopliae* isolated from soil samples of the central Brazilian cerrado against *Aedes aegypti* larvae under laboratory conditions. *Rev. Patol. Trop.* 33: 2004. 207–216.

Silva R. O., Silva H.H.G., Ulhoa C. J., Luz C. Is there a relationship between N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (Hyphomycetes) isolates from peridomestic areas in central Brazil and larvicidal effect on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae)? *J. Appl. Entomol.* 129: 2005. 158–164.

Soares G. G. Jr, Riba G., Caudal A., Vincent J. J. Comparative studies of eleven isolates of the fungal entomopathogen *Tolypocladium cylindrosporum* and two isolates of *Tolypocladium extinguens*. *J. Invertebr. Pathol.* 46: 1985. 115–120.

Winston P. W., Bates D. H. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology* 41: 1960. 232–237.

Fig.1. Eclosão acumulada percentual (\pm erro padrão da média) de *Ae. Aegypti* de ovos tratados com água (controle), conídios (*B. bassiana*, *I. farinosa*, *M. anisopliae* e *Penicillium* sp) ou corpos hifais (*E. kintrischica*), expostos à umidade relativa > 98% por 5, 10, 15 e 25 d antes de submersão em água.