

## BIOLOGICAL CONTROL

## Efeito da Temperatura e Cama do Aviário na Virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) para o Controle do Cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)

TALITA M. ALEXANDRE<sup>1,2</sup>, LUIS F.A. ALVES<sup>3,5</sup>, PEDRO M.O.J. NEVES<sup>1,5</sup> E SÉRGIO B. ALVES<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Depto. Agronomia, Univ. Estadual de Londrina, C. postal 6001, 86051-970, Londrina, PR

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação, Depto. Agronomia /UEL, Mestrado, C. postal 6001, 86051-970, Londrina, PR

<sup>3</sup>Lab. Zoologia, Univ. Estadual do Oeste do Paraná/CCBS, C. postal 000711, 85819-110, Cascavel, PR

<sup>4</sup>Depto. Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP  
C. postal 9, 13400-970, Piracicaba, SP; <sup>5</sup>Bolsista de Produtividade em Pesquisa/CNPq

*Neotropical Entomology* 35(1):075-082 (2006)

Effect of Temperature and Poultry Litter in *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Virulence against the Lesser Mealworm *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)

**ABSTRACT** - This study was carried out to evaluate the influence of temperature and poultry litter on germination vegetative growth virulence and conidial production of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) isolates on larvae and adults of the lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer). The vegetative growth and conidial production were evaluated on culture media. Virulence was studied submerging larvae and adults in a conidial suspension ( $1 \times 10^8$  conidia/ml). All the experiments were carried out in growth chamber (26°C and 32°C and 14h photophase). Fungus-killed insects were daily collected and used for microscopic conidial counts. The poultry litter effect was evaluated by submerging the insects in a fungal suspension ( $10^8$  conidia/ml) and then transferring them to cups containing poultry litter (new and used). *B. bassiana* isolates were more sensitive than *M. anisopliae* to high temperature because conidia viability, vegetative growth and virulence were negatively affected ( $P < 0,05$ ). The conidial production was higher to *B. bassiana* in 26°C (7 to  $11 \times 10^8$  conidia/larval cadaver and  $8 \times 10^8$  conidia/adult cadaver) ( $P < 0,05$ ). Larval stage was about 10 times more sensitive to *M. anisopliae* at 26°C than adults stage. Regarding *B. bassiana*, differences on sensitivity between larval stages and adults were not observed at this temperature. However, at 32°C, larval stage was more sensitive for CB116 and UEL50 isolates. Mortality was higher when larvae and adults (15.7 and 66.7% respectively) were treated by *B. bassiana* and maintained on new poultry litter at 26°C) ( $P < 0,05$ ).

**KEY WORDS:** Entomopathogenic fungus, microbial control, animal production

**RESUMO** - O estudo avaliou a influência da temperatura e de cama nova e usada na germinação, crescimento vegetativo, virulência e produção de conídios de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) sobre larvas e adultos do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer). O crescimento vegetativo e a produção de conídios foram avaliados em meio de cultura. Para a avaliação da virulência os insetos foram tratados com suspensões contendo  $1 \times 10^8$  conídios/ml. Os experimentos foram realizados em câmara B.O.D. (26°C e 32°C e 14h de fotofase). Diariamente os insetos mortos foram coletados para quantificação da produção de conídios. Para avaliação das camas, após a inoculação, insetos foram transferidos para recipientes contendo cama de aviário (nova e usada). Os isolados de *B. bassiana* foram mais sensíveis à temperatura elevada em relação aos isolados de *M. anisopliae* no que se refere à viabilidade, crescimento vegetativo e virulência ( $P < 0,05$ ). A conidiogênese também foi maior para *B. bassiana* a 26°C (7 a  $11 \times 10^8$  conídios/cadáver larval e  $8 \times 10^8$  conídios/cadáver adulto) ( $P < 0,05$ ). O estágio larval foi, em média, cerca de 10 vezes mais suscetível aos isolados de *M. anisopliae*, a 26°C, que os adultos. Em relação a *B. bassiana*, não foi observada diferença na suscetibilidade entre larvas e adultos nessa temperatura. Entretanto, a suscetibilidade a 32°C foi maior para as larvas, com os isolados CB116 e UEL50. A maior mortalidade ocorreu quando larvas e adultos foram tratados com *B. bassiana* e mantidos sobre a cama nova e a 26°C (15,7% e 66,7%, respectivamente) ( $P < 0,05$ ).

**PALAVRAS-CHAVE:** Fungo entomopatogênico, controle microbiano, produção animal

O besouro *Alphitobius diaperinus* (Panzer), conhecido como cascudinho, é um dos grandes problemas da avicultura mundial e, embora seja conhecido como praga secundária de farinhas, rações e derivados de grãos armazenados, adaptou-se às condições dos aviários, onde se alimenta de ração, fezes e de animais mortos (McCallister et al. 1995). Estes insetos podem causar perdas econômicas à avicultura por afetarem o desenvolvimento inicial das aves, pois são ingeridos em grande quantidade no lugar da ração balanceada, podendo afetar o ganho inicial de peso, além de causar ferimentos no trato digestivo. São também fonte de inóculo e potenciais transmissores de bactérias, vírus, fungos, protozoários e platelmintos parasitos (Vaughan & Turner 1984, Avancini & Ueta 1991, Despins & Axtell 1995, McCallister et al. 1995, Chernaki-Leffer et al. 2002).

A limpeza freqüente do aviário, com remoção da cama após a retirada dos animais, é uma das formas de reduzir o número de insetos, embora seja cara e trabalhosa (Steelman 1996). Assim, o uso de inseticidas químicos e o manejo do ambiente são os mais adequados e utilizados pelos produtores, pois os inseticidas podem ser aplicados diretamente no piso, paredes e colunas do aviário, após a limpeza (Axtell & Arends 1990). Contudo, pelo fato de serem tóxicos também às aves, os tratamentos devem ser feitos somente ao final do ciclo de criação, o que limita essa tática de controle.

O controle biológico pode ser uma alternativa viável, principalmente pela segurança às aves, pois fungos, vírus, bactérias e nematóides entomopatogênicos são considerados seguros tanto para o homem como para o ambiente (Pereira & Alves 1998). Além disso, a permanência desses organismos no ambiente é potencialmente maior do que a dos produtos químicos (Crawford et al. 1998).

Especificamente em relação ao cascudinho, a ocorrência natural de fungos entomopatogênicos em populações do inseto em aviários, já foi registrada nos EUA por Steinkraus et al. (1991), que relataram epizootias de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. No Brasil, Alves et al. (2004, 2005) isolaram *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. de adultos do cascudinho. A suscetibilidade de larvas e adultos do inseto a tais fungos entomopatogênicos foi demonstrada em trabalhos realizados em condições de laboratório, tanto no Brasil, como em outros países (Crawford et al. 1998, Geden et al. 1998, Alves et al. 2004, Chernaki-Leffer 2004).

A presença de propágulos de um patógeno virulento sobre um hospedeiro suscetível não garante sua colonização. São as condições do ambiente que permitem ou não a germinação e posterior colonização do hospedeiro pelo patógeno (Alves & Leucona 1998). Entre elas, destacam-se nos aviários, a temperatura, o pH da cama, a presença natural de amônia e de outras substâncias químicas e microrganismos saprofitos, além da eventual ocorrência de inseticidas, desinfetantes e antibióticos utilizados no manejo dos aviários. Ainda segundo Alves & Leucona (1998), a temperatura afeta a estabilidade dos patógenos durante o armazenamento e também seu ciclo de desenvolvimento sobre o hospedeiro. De modo geral, a faixa favorável de temperatura para a aplicação de entomopatógenos no campo

está entre 20°C e 30°C, porém existe uma temperatura ideal para cada fase do ciclo das relações patógeno-hospedeiro. Como os microrganismos não possuem mecanismos biológicos de defesa contra grandes variações de temperatura, esse fator pode ser limitante, direta ou indiretamente, para a maioria dos entomopatógenos, incluindo-se os fungos.

Estudos realizados em Cascavel, PR, visando conhecer a dinâmica populacional do cascudinho em aviários comerciais, indicam que a maior concentração de larvas e adultos do inseto se deu no terço anterior do aviário, região permanentemente ocupada pelas aves durante todo o seu crescimento onde a oferta de alimento é grande e constante. Nesta região a temperatura média na cama é de cerca de 30°C. Nos dois terços posteriores do aviário a temperatura média registrada é de 26°C e, à medida que as aves crescem e se dispersam pelo aviário, os insetos acompanham esse deslocamento (Uemura 2004, não publicado).

Assim, como forma de auxiliar futuros trabalhos de campo visando o controle do cascudinho com aplicação de fungos entomopatogênicos, desenvolveu-se a pesquisa com o objetivo de determinar o efeito da temperatura sobre a viabilidade, crescimento vegetativo, virulência e produção de conídios de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, previamente selecionados para o controle do inseto e o efeito da cama nova e usada na eficiência de *B. bassiana* contra larvas e adultos do cascudinho.

A escolha das temperaturas para os experimentos não foi feita priorizando o melhor desenvolvimento dos fungos, mas sim as condições reais de sua futura aplicação nos aviários, como condição fundamental para o controle da praga em questão.

## Material e Métodos

Foram utilizados os isolados UEL50 e CB116 do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) e UNIOESTE02 e UEL25 do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., todos provenientes de coleções de entomopatógenos do Laboratório de Zoologia da Unioeste, Campus de Cascavel, PR, do Instituto Biológico de São Paulo e do Departamento de Agronomia/UEL/PR.

**Viabilidade dos conídios.** Placas de Petri contendo ágar-água + 0,05% de tetraciclina foram inoculadas com 0,1 ml de uma suspensão contendo  $1 \times 10^6$  conídios/ml, sendo preparadas quatro placas por tratamento (quatro isolados e duas temperaturas de incubação), de forma que cada uma das placas constituiu uma repetição. Em seguida, as placas foram incubadas por 16 horas a 26°C e 32°C, avaliando-se após esse período a porcentagem de conídios germinados e não germinados, utilizando-se microscópio óptico com aumento de 400 vezes, contando-se 200 a 500 conídios por placa.

**Crescimento vegetativo.** O crescimento foi avaliado em placas de Petri com meio de cultura para produção de esporos (Alves et al. 1998), sendo inoculada a superfície do meio em três pontos equidistantes, com conídios dos isolados a

serem avaliados e o número de placas foi o mesmo utilizado anteriormente. As placas foram incubadas nas mesmas condições citadas anteriormente. Após 10 dias, foram feitas duas medições perpendiculares nas colônias, obtendo-se o diâmetro médio.

**Produção de conídios em meio de cultura.** As colônias obtidas anteriormente foram colocadas individualmente em tubos de vidro contendo água destilada + espalhante adesivo Tween 80 (0,01%). Em seguida, com auxílio de um pincel, os conídios da superfície das mesmas foram removidos e obtidas suspensões que foram agitadas em vórtex por um minuto e, a seguir, o número de conídios foi quantificado em câmara de Neubauer.

**Virulência de isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* para larvas e adultos do cascudinho.** Larvas e adultos de cascudinho foram transferidos para copos plásticos descartáveis onde foram imersos em 1,0 ml de uma suspensão contendo  $1 \times 10^8$  conídios/ml por 10 segundos, sob agitação leve e constante. Para cada um dos isolados e temperatura (26°C e 32°C) foram utilizadas quatro repetições de 15 larvas e 15 adultos do inseto.

Em seguida, as larvas foram individualizadas em caixas circulares de acrílico (2,5 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) e os adultos em placas de Petri, ambas contendo papel filtro e ração esterilizada para frangos.

As caixas e as placas foram fechadas, armazenadas em potes plásticos tampados contendo espuma de poliuretano umedecida, e incubados em câmaras B.O.D (26°C e 32°C, ambas com 14h de fotofase).

Os insetos foram observados diariamente durante 10 dias e os indivíduos mortos foram retirados, imersos em álcool 70% e em água destilada durante 30 segundos cada e transferidos para câmara úmida, constituída de uma placa de Petri com papel filtro esterilizado e umedecido com água destilada, e incubados a 26°C e 32°C a fim de permitir a conidiogênese, para confirmar a mortalidade pelo fungo.

**Produção de conídios em cadáveres.** Foram selecionados cinco larvas e cinco adultos de cada uma das repetições, tendo como critério de seleção a plena conidiogênese e destes foram extraídos os conídios, imergindo-os em tubos de vidro contendo água destilada + espalhante adesivo Tween 80 (0,01%) sendo agitados por um minuto. Para determinar a produção de conídios nos cadáveres, foi realizado o mesmo procedimento utilizado nas colônias.

**Efeito da cama nova e usada sobre a mortalidade de larvas e adultos do cascudinho por *B. bassiana*.** Larvas e adultos do cascudinho foram imersos em 1 ml de suspensão de conídios contendo  $1 \times 10^8$  de conídios/ml, sendo que na testemunha os insetos foram imersos somente em solução de água destilada + Tween 80 (0,01%), ambos foram mantidos sob agitação leve e constante durante 10 segundos.

Após a inoculação, os insetos foram divididos em grupos de três repetições de 15 indivíduos, sendo transferidos para caixas de acrílico (larvas) ou placas de Petri (adultos) com o fundo recoberto por papel filtro e também para copos

plásticos contendo cama nova e cama usada, sendo alimentados com ração esterilizada para aves.

Assim, foram constituídos seis tratamentos: 1, 2 e 3 formados por insetos imersos em água destilada + espalhante adesivo e mantidos em caixas de acrílico (larvas) ou placas de Petri (adultos) e copos plásticos com cama nova e usada, respectivamente; e 4, 5 e 6 formados por insetos imersos na suspensão de conídios e mantidos caixas de acrílico (larvas) ou placas de Petri (adultos) e copos plásticos com cama nova e copos com cama usada, respectivamente. Em seguida, os insetos foram mantidos a 26°C e 32°C e fotofase de 14h.

Dez dias após a inoculação do fungo, determinou-se o número de insetos mortos. Em seguida os insetos foram transferidos para câmara úmida e mantidos nas mesmas condições de temperatura e fotofase do experimento, por até 10 dias, para a confirmação da mortalidade pelo fungo.

Todos os experimentos foram inteiramente casualizados num fatorial  $4 \times 2$ . As médias e a interação da temperatura × diferentes fungos (espécies e/ou isolados) e estágio de desenvolvimento e temperatura sobre cama nova e usada e estágios de desenvolvimento foram analisados pelo teste F e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey, ambos com 5% de significância, utilizando-se programas estatísticos SISVAR 4.3 e MINITAB 12.2. Quando necessário, os dados foram transformados em  $\arcsen \sqrt{x} + 1$ .

## Resultados e Discussão

**Viabilidade dos conídios.** As temperaturas de incubação influenciaram a germinação dos conídios dos isolados de *B. bassiana*, sendo que à temperatura de 26°C a germinação atingiu 70%, e a 32°C foi totalmente inibida. Entretanto, ocorreu atraso na germinação dos isolados, observando-se crescimento vegetativo do fungo a 32°C. Os isolados de *M. anisopliae*, por outro lado, apresentaram 100% de viabilidade, em ambas temperaturas (Tabela 1).

Resultados semelhantes foram obtidos por Inglis *et al.* (1996), que mostraram que a 35°C a germinação dos conídios dos isolados de *B. bassiana* foi baixa em relação aos isolados de *M. anisopliae*. Por outro lado, Ekesi *et al.* (1999), testando a germinação desses fungos em temperaturas entre 15°C e 35°C, verificaram que não houve diferença significativa na germinação na faixa de 20 e 30°C, porém, em 35°C todos os isolados apresentaram baixa germinação.

**Crescimento vegetativo.** Os fungos testados apresentaram crescimento vegetativo em ambas temperaturas avaliadas. Contudo, a 26°C o crescimento vegetativo foi significativamente maior para todos os isolados a 26°C do que a 32°C (Tabela 1). Entretanto, houve diferenças entre os isolados a 26°C, pois UEL50 e CB116 de *M. anisopliae* apresentaram maior crescimento vegetativo se comparados aos dois isolados de *B. bassiana*, podendo ser este crescimento uma característica da espécie. Além disso, a 26°C houve diferença significativa entre os dois isolados de *M. anisopliae*, visto que as colônias do isolado CB116 foram cerca de 1,3 vezes maiores do que as do isolado UEL50 (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de germinação e diâmetro médio de colônia e número médio de conídios/colônia de *M. anisopliae* e *B. bassiana* incubados nas temperaturas de 26°C e 32°C e fotofase de 14h.

Isolados	% de germinação <sup>1</sup>		Diâmetro médio de colônia (mm <sup>2</sup> )		n <sup>o</sup> médio de conídios/colônia <sup>2,3</sup>	
	26°C	32°C	26°C	32°C	26°C	32°C
<i>M. anisopliae</i>						
UEL 50	100 ± 0,00 A a	100 ± 0,00 A a	25,8 ± 1,76 B a	19,2 ± 1,20 A b	7,2 ± 0,57 A a	3,4 ± 0,66 A b
CB116	100 ± 0,00 A a	100 ± 0,00 A a	34,5 ± 0,57 A a	15,2 ± 1,85 A b	6,9 ± 0,33 A a	0 ± 0,00 A b
<i>B. bassiana</i>						
UNIOESTE 02	64,6 ± 1,15 C a	0 ± 0,00 B b	12,1 ± 0,33 C a	1,3 ± 1,00 C b	0,2 ± 0,33 C a	0 ± 0,00 A b
UEL 25	73,6 ± 4,66 B a	0 ± 0,00 B b	14,6 ± 1,00 C a	7,5 ± 0,33 B b	0,7 ± 0,00 B a	0 ± 0,00 A b
C.V.	3,33%		12,41%		14,09%	

Médias (±EP), seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e letra minúscula na mesma linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

<sup>1</sup>Dados originais apresentados; para análise estatística os dados foram transformados em  $\arcsen \sqrt{x}$

<sup>2</sup>Dados originais apresentados; para análise estatística os dados foram transformados em  $x + 1$

<sup>3</sup>Concentração de conídios por inseto × 10<sup>8</sup> conídios/cadáver

Da mesma forma que a 26°C, os isolados UEL50 e CB116 a 32°C apresentaram o diâmetro médio de colônia maior que os isolados de *B. bassiana*. Isto pode estar relacionado à maior sensibilidade deste fungo a altas temperaturas, visto que, de acordo com Alves & Leucona (1998), a faixa ideal de desenvolvimento dos isolados de *M. anisopliae* está entre 24°C e 32°C, enquanto que para os isolados de *B. bassiana*, a temperatura favorável está entre 22°C e 26°C.

Resultados semelhantes foram obtidos por Inglis et al. (1996), Ekezi et al. (1999) e por Fargues et al. (1997) com o fungo *B. bassiana*, que verificaram maior crescimento vegetativo deste fungo na faixa de 25°C e 28°C.

**Produção de conídios em meio de cultura.** A produção de conídios/colônia variou de acordo com a temperatura de incubação, sendo maior quando os fungos foram mantidos a 26°C (Tabela 1). Observou-se também que os dois isolados de *M. anisopliae* foram mais produtivos e não diferiram entre si, com valores próximos a  $7 \times 10^8$  conídios/colônia. Os isolados de *B. bassiana* produziram cerca de 15 vezes menos conídios.

Ressalta-se que à temperatura de 32°C, apenas o isolado UEL50 de *M. anisopliae* apresentou conidiogênese, não sendo esta redução proporcional à redução no diâmetro da colônia, confirmando a influência da temperatura apenas na conidiogênese (Tabela 1).

A comparação de tais resultados com os de outros trabalhos na literatura demonstra a grande variação existente entre os isolados, haja vista que Pachamuthu et al. (1999), Oliveira et al. (2003) e Andaló et al. (2004), obtiveram entre  $4,9 \times 10^7$  a  $1,6 \times 10^9$  conídios/colônia, provavelmente em decorrência da variabilidade genética entre os isolados.

#### Virulência de isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* para

**larvas e adultos do cascudinho.** Os dados de mortalidade obtidos apresentaram grande variabilidade, explicitando as diferenças na atividade entomopatogênica dos fungos *B. bassiana* (UNIOESTE02 e UEL25) e *M. anisopliae* (UEL50 e CB116) nas duas temperaturas testadas. Os isolados testados foram patogênicos em ambas as temperaturas avaliadas. Contudo, a 26°C, a mortalidade foi maior para todos os isolados quando comparada com a mortalidade obtida a 32°C, tanto para larvas como para adultos. Além disso, não houve diferença significativa na mortalidade larval nessa temperatura, para *M. anisopliae*. Em relação ao estágio adulto, na temperatura de 26°C, o isolado CB116 não causou mortalidade e o isolado UEL25 foi significativamente superior em relação aos demais. Já na temperatura de 32°C, apenas o isolado UEL25 apresentou mortalidade (26,6%) (Tabela 2).

Com relação à diferença de suscetibilidade entre o estágio larval e adulto a 26°C, observou-se que os isolados de *M. anisopliae* foram, em média, cerca de 10 vezes mais efetivos para os insetos no estágio larval que para os adultos. Em relação a *B. bassiana*, não foi observada diferença na suscetibilidade entre larvas e adultos. Entretanto, a suscetibilidade entre estágio larval e adulto a 32°C apresentou maior diferença, pois excetuando-se os isolados UNIOESTE02 e UEL25, os demais isolados foram significativamente mais eficientes contra larvas, não causando mortalidade de adultos (Tabela 2).

Maior suscetibilidade larval do cascudinho para *B. bassiana* também foi observada por Steinkraus et al. (1991), Crawford et al. (1998) e por Geden et al. (1998). Mais recentemente, Chernaki-Leffer (2004) também avaliou a suscetibilidade de *A. diaperinus* a fungos entomopatogênicos, verificando também maior suscetibilidade larval. Contudo, de maneira contrária ao aqui

Tabela 2. Porcentagem de mortalidade confirmada (média  $\pm$  EP) de larvas e adultos do cascudinho (*A. diaperinus*) por diferentes isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* incubados por 10 dias nas temperaturas de 26°C e 32°C e fotofase de 14h.

Isolados	Larva		Adulto	
	26°C	32°C	26°C	32°C
<i>M. anisopliae</i>				
UEL 50	93,3 $\pm$ 4,04 A a*	55,5 $\pm$ 2,33 A b**	8,9 $\pm$ 7,00 B a	0 $\pm$ 0,00 A a
CB116	80,0 $\pm$ 4,04 A a*	68,9 $\pm$ 5,92 A a**	0 $\pm$ 0,00 B a	0 $\pm$ 0,00 A a
<i>B. bassiana</i>				
UNIOESTE 02	77,7 $\pm$ 8,08 A a	2,2 $\pm$ 7,00 C b	57,7 $\pm$ 15,66 B a	0 $\pm$ 0,00 A b
UEL 25	95,5 $\pm$ 4,66 A a	28,9 $\pm$ 5,92 B b**	82,2 $\pm$ 8,08 A a	26,6 $\pm$ 6,66 A b
C.V.	20,5%		18,6%	

Médias ( $\pm$ EP) seguidas pela mesma letra maiúscula dentro na coluna e letra minúscula dentro na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) para cada estágio. Dados originais; para análise estatística foram transformados em  $\arcsen \sqrt{x}$ .

\*médias com diferença significativa na comparação da mortalidade entre larvas e entre adultos na temperatura de 26°C.

\*\*médias com diferença significativa na comparação da mortalidade entre larvas e entre adultos na temperatura de 32°C.

observado, os maiores percentuais de mortalidade foram obtidos com isolados de *M. anisopliae*.

Um outro estudo realizado por Rohde (2004, não publicado) com 58 isolados de *B. bassiana* e 41 de *M. anisopliae* para o controle de larvas e adultos de *A. diaperinus*, indicou que todos isolados de *B. bassiana* foram patogênicos para larvas e adultos, não sendo o mesmo observado para *M. anisopliae*. Além disso, verificou-se que as larvas também foram mais suscetíveis que os adultos.

O grau de virulência pode variar com o patógeno, capacidade de replicação e germinação, inóculo, hospedeiro, formulação, nutrição do patógeno, entre outros (Alves & Lecuona 1998). Também, Neves & Hirose (2005) atribuíram essas variações na virulência entre os isolados, possivelmente à forma de inoculação, à concentração da suspensão de conídios, e à variabilidade natural entre os isolados.

Os dados do presente estudo indicam que os isolados de *M. anisopliae* apresentaram maior resistência à temperatura de 32°C. Sendo assim, provavelmente nas áreas mais quentes do aviário, esse fungo pode ser mais eficiente no controle dos insetos. Já os isolados de *B. bassiana*, sendo mais sensíveis à temperatura mais elevada, seriam mais eficazes quando aplicados na região do aviário onde se dá o crescimento das aves.

**Produção de conídios de cadáveres de cascudinho.** A temperatura apresentou influência direta na conidiogênese em cadáveres. A 26°C, os isolados de *B. bassiana* foram mais produtivos tanto em larvas como nos adultos. Os isolados de *M. anisopliae*, por sua vez, à mesma temperatura, apresentaram valores significativamente menores, próximos a zero, não sendo possível determinar este valor pela baixa concentração na suspensão obtida. Na temperatura de 32°C, apenas os isolados de *M. anisopliae* apresentaram conidiogênese e somente em cadáveres de larvas (Tabela 3).

Os efeitos dos fatores físicos e bióticos na conidiogênese

de *B. bassiana* sobre cadáveres de *Cerotoma arcuata* (Olivier) foram avaliados por Fernandes *et al.* (1989), mostrando que a mesma não ocorreu a 30°C pela presença de outros microrganismos no cadáver, especialmente bactérias e fungos contaminantes, como *Aspergillus* sp., que favorecidos pelas temperaturas mais altas, colonizaram o hospedeiro mais rapidamente que *B. bassiana*. Dessa forma, o fungo entomopatogênico pôde infectar e matar o inseto, mas seu desenvolvimento micelial e a conidiogênese foram inibidos por antagonismo com contaminantes, principalmente quando as condições de temperatura foram desfavoráveis ao entomopatógeno. No presente trabalho, também se observou em muitos cadáveres, a presença de *Aspergillus* sp., o que provavelmente afetou a produção de conídios nos insetos incubados a 32°C.

Os resultados aqui obtidos são confirmados por estudos feitos por Luz *et al.* (1998), que verificaram variabilidade entre isolados de *B. bassiana* com relação a conidiogênese sobre cadáveres de triatomíneos, e determinaram que a temperatura ideal de incubação é entre 20 e 25°C. De modo semelhante, Arthus & Thomas (2001) determinaram que a temperatura ideal para a esporulação do *M. anisopliae*, em cadáveres de *Schistocerca gregaria* (Forsk.) está na faixa de 20 a 30°C, confirmando a adaptação deste fungo a temperaturas mais altas.

Comparando-se a virulência dos isolados com a respectiva produção de conídios em cadáveres, verificou-se que os isolados de *B. bassiana*, na temperatura de 26°C, além de serem mais virulentos, propiciaram maior concentração de conídios nos cadáveres de larvas e adultos do cascudinho. Contudo, o mesmo não ocorreu no trabalho de Luz *et al.* (1998). Segundo os autores, apesar de terem sido verificados quatro isolados virulentos contra *Triatoma infestans* (Klug), apenas um deles se destacou na produção de conídios em cadáveres, sendo este isolado considerado o mais promissor para o controle de triatomíneos.

Tabela 3. Produção de conídios de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em cadáveres de cascudinho *A. diaperinus*. Temperaturas de 26°C e 32°C e fotofase de 14h.

Isolados	Larva <sup>1</sup>		Adulto <sup>1</sup>	
	26°C	32°C	26°C	32°C
<i>M. anisopliae</i>				
UEL 50	1,5 ± 0,33 C a	0,4 ± 0,18 A a**	0 ± 0,00 B a	0 ± 0,00 B a
CB116	1,6 ± 0,33 C a	0,5 ± 0,04A a**	0 ± 0,00 B a	0 ± 0,00 B a
<i>B. bassiana</i>				
UNIOESTE 02	11,5 ± 4,09 A a*	0 ± 0,00 A b	8,2 ± 0,88 A a	0 ± 0,00 B a
UEL 25	7,3 ± 1,20 AB a	0 ± 0,00 A b	8,7 ± 4,66 A a*	0 ± 0,00 B a
C.V.	22,89%		34,35%	

Médias (±EP) seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e letra minúscula na mesma linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P < 0,05) para cada estágio. Dados originais; para análise estatística foram transformados em  $x + 1$ .

<sup>1</sup>concentração de conídios por inseto × 10<sup>8</sup> conídios/cadáver.

\*médias com diferença significativa na comparação da mortalidade entre larvas e entre adultos na temperatura de 26°C.

\*\* médias com diferença significativa na comparação da mortalidade entre larvas e entre adultos na temperatura de 32°C.

Visando comparar a produção de conídios de *B. bassiana* em cadáveres de insetos imaturos e adultos e o efeito de diferentes temperaturas de incubação, Sosa-Gómez & Alves (2000) verificaram que a produção de conídios em cadáveres de *Nezara viridula* (L.) e *Piezodorus guildinii* (Westwood) foi maior em ninfas de 5º estágio (100% de esporulação, entre 22°C e 30°C), em relação aos adultos, demonstrando que a fase imatura do inseto foi mais suscetível ao isolado de *B. bassiana* que os adultos. Segundo os autores, à temperatura mais alta (34°C) não ocorreu conidiogênese, o que também foi observado neste trabalho.

**Efeito cama nova e usada e da temperatura na mortalidade de larvas e adultos do cascudinho por *B. bassiana*.** A temperatura de incubação e os diferentes substratos apresentaram interferência na mortalidade de larvas e adultos, sendo esta maior quando os insetos foram mantidos na cama nova e incubados a 26°C (Tabela 4). Além disso, na fase larval houve diferença significativa entre as camas, sendo maior a eficiência do fungo na cama nova, quando comparada à cama usada (respectivamente 15,7% e 2,3% de mortalidade confirmada). A mesma tendência foi observada para os insetos adultos, com 66,7% de mortalidade confirmada na cama nova e apenas 8,9% da mortalidade de insetos na cama usada. Como não houve confirmação da mortalidade por fungo à temperatura de 32°C, não foi possível avaliar o efeito das camas nessa temperatura. De acordo com Alves & Leucona (1998), os microrganismos não possuem mecanismos biológicos para se defender das grandes variações de temperatura. Esse fator, atuando direta ou indiretamente, pode ser limitante para a maioria dos entomopatógenos porque afeta seu metabolismo, alterando os processos de produção de enzimas, toxinas e germinação dos conídios.

Resultados semelhantes foram obtidos por Crawford et al. (1998), com mortalidade larval próxima de 90% em cama

nova (usando isolados de *B. bassiana* sobre o cascudinho em aplicações na ordem 10<sup>11</sup> conídios/m<sup>2</sup>) e apenas de 60% de mortalidade em cama usada. Em adultos, os valores de mortalidade observados por esses autores variaram de 33% a 38% em cama nova e menores porcentagens para cama velha.

Grande variação na eficiência de alguns isolados de *B. bassiana* foram verificados por Geden et al. (1998) quando aplicados sobre a cama e solo, sendo a maior mortalidade de larvas e adultos do cascudinho igualmente em cama nova.

Essa variação entre cama usada e nova deve-se a vários fatores levantados por Crawford et al. (1998), como alterações físicas na cama em decorrência da presença das aves no aviário, incluindo a diminuição no tamanho das partículas e, conseqüente compactação da cama, ou ainda a formação de agregados de maravalha e fezes que formam placas na superfície da cama. Nessas condições, a dispersão dos conídios pela cama pode ser severamente reduzida, pois

Tabela 4. Porcentagem da eficiência do isolado UNIOESTE 02 de *B. bassiana* a 26°C na mortalidade confirmada de larvas e adultos do cascudinho em cama nova e usada.

Tipos de camas	Larva	Adulto
Cama usada	2,3 ± 2,00 C c	8,9 ± 8,66 B c
Cama nova	15,7 ± 5,85 B b	66,7 ± 10,03 A a
Papel-filtro	93,3 ± 0,00 A a	31,1 ± 9,54 A B b
C.V. (%)	36,0	36,0

Médias (±EP) seguidas pela mesma letra maiúscula dentro na coluna e letra minúscula dentro na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P < 0,05). Dados originais; para análise estatística foram transformados em  $\arcsen \sqrt{x}$ .

a cama torna-se um meio denso e heterogêneo.

Deve-se levar em consideração ainda que alterações químicas e biológicas também ocorrem, pois a presença de matéria orgânica (excremento, ração e restos de animais) favorece o crescimento de microorganismos que ao decomporem o ácido úrico presente nos excrementos liberam amônia, produto sabidamente com ação fungistática (Bacon 1985).

A mudança do pH na cama à medida que ela é utilizada pode afetar a viabilidade do fungo, como ressaltado por Jones & Hagler (1982). Neste sentido, Groden & Lockwood (1991) observaram, especificamente para o fungo *B. bassiana*, que o efeito fungistático aumenta exponencialmente com a elevação do pH. Além disso, os autores também observaram que a competição no meio de cultura inibe a germinação de conídios do fungo.

Concluindo, os resultados aqui obtidos indicam o potencial dos isolados UNIOESTE02 e UEL25 de *B. bassiana* em um futuro programa de controle do cascudinho. Os resultados indicam, ainda, que ao elaborar um projeto de pesquisa visando ao controle biológico de uma praga, é necessário incluir a seleção de isolados baseado na virulência e na influência de fatores ambientais físicos e químicos tais como, temperatura, luz, umidade relativa, pH, entre outros, de forma a garantir o sucesso na aplicação desses fungos no campo. Além disso, evidenciou-se que a seleção de isolados, além de avaliar a virulência dos mesmos, deve levar em consideração a produção de conídios em cadáveres e não apenas produção em meio de cultura *in vitro* para que se possa apontar os melhores fungos para o controle da praga em questão.

### Agradecimentos

Aos estagiários do Laboratório de Zoologia/Unioeste/CCBS, pelo auxílio nas avaliações e ao CNPq pela concessão de Bolsa de Iniciação Científica e de Produtividade em Pesquisa.

### Referências

- Alves, L.F.A., V.S. Alves, D.F. Bressan, P.M.O.J. Neves & S.B. Alves. 2004. Ocorrência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Moniliales: Moniliaceae) em adultos de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), em aviários comerciais em Cascavel, PR, Brasil. *Neotrop. Entomol.* 33: 793-795.
- Alves, L.F.A., M.H. Gassen, F.G.S. Pinto, P. M.O.J. Neves & S.B. Alves. 2005. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilleman (Moniliales: Moniliaceae) sobre o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), em aviário comercial de Cascavel, PR. *Neotrop. Entomol.* 34: 507-510.
- Alves, S.B., J.E.M. Almeida, A. Moino Jr. & L.F.A. Alves. 1998. Técnicas de laboratório, p.637-729. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, Fealq, 1163p.
- Alves, S.B. & R.E. Leucona. 1998. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos, p.97-169. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, Fealq, 1163p.
- Andaló, V., A. Moino Jr., L.V.C. Santa Cecília & G.C. Souza. 2004. Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com agrotóxicos visando o controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus tenxensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). *Neotrop. Entomol.* 33: 468-467.
- Arthus, S. & M.B. Thomas. 2001. Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 78: 59-65.
- Avancini, R.M.P. & M.T. Ueta. 1991. Manure breeding insects (Diptera and Coleoptera) responsible for cestoidosis in caged layer hens. *J. Appl. Entomol.* 110: 307- 312.
- Axtell, R.C. & J.J. Arends. 1990. Ecology and management of arthropod pests of poultry. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 101-126.
- Bacon, C.W. 1985. Effects of broiler litter volatiles and ammonia on fungal spore germination. *Poult. Sci.* 65: 710-716.
- Chernaki-Leffer, A.M. 2004. Dinâmica populacional, estimativa da resistência a inseticidas e suscetibilidade do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) a inseticidas reguladores de crescimento e a fungos entomopatogênicos. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 62p.
- Chernaki-Leffer, A.M., S.M. Biesdorf, L.M. Almeida, E.V.B. Leffer & F. Vigne. 2002. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, Brasil. *Rev. Bras. Avícola* 4: 243-247.
- Crawford, P.J., W.M. Brooks & J.J. Arends. 1998. Efficacy of field-isolated strains of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) as microbial control agents of the lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.* 91: 1295-1301.
- Despins, J.L. & R.C. Axtell. 1994. Feeding behavior and growth of turkey pouts fed larvae of the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. *Poult. Sci.* 73: 1526-1533.
- Despins, J.L. & R.C. Axtell. 1995. Feeding behavior and growth of broiler chicks fed larvae of the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. *Poult. Sci.* 74: 331-336.
- Ekese, S., K.N. Maniania & K. Ampom-Nyarko. 1999. Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocont. Sci. Technol.* 9: 177-185.
- Fargues, J., M.S. Goettel, N. Smits, A. Ouedraogo & M. Rougier. 1997. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different

- origins. *Mycologia* 89: 383-392.
- Fernandes, P.M., B.P. Magalhães, S.B. Alves & J.C. Lord. 1989. Efeitos da combinação de temperatura, umidade relativa e concentração de inóculo de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. na mortalidade de *Cerotoma arcuata* (Oliver, 1791) (Coleoptera: Chrysomelidae). *An. Soc. Entomol. Brasil* 18: 313-319.
- Geden, C.J., J.J. Arends, D.A. Ruttz & D.C. Steinkraus. 1998. Laboratory evaluation of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) against the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), in poultry litter, soil and a pupal trap. *Biol. Control* 13: 71-77.
- Groden, E. & J.L. Lockwood. 1991. Effects of fungistasis on *Beauveria bassiana* and its relationship to disease incidence in the Colorado popatto beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, in Michigan and Rhode Island soils. *J. Invertebr. Pathol.* 57: 7-16.
- Inglis, D.G., D.L. Johnson, K.J. Cheng & M.S. Goettel. 1996. Use of pathogen combinations to overcome the constraints of temperature on entomopathogenic Hyphomycetes against grasshoppers. *Biol. Control* 8: 143-152.
- James, R.R. & S.T. Jaronski. 2000. Effect of low viability on infectivity of *Beauveria bassiana* conidia toward the silverleaf whitefly. *J. Invertebr. Pathol.* 76: 227-228.
- Jones, H.T. & W.H. Hagler. 1982. Observations on new and reused litter for growing broilers. *Poult. Sci.* 62: 175-179.
- Luz, C., M.S. Tigano, I.G. Silva, C.M. Cordeiro & S.M. Alijanabi. 1998. Selection of *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 93: 839-846.
- McAllister, J.C., C.D. Steelman, L.A. Newberry & J.K. Skeeles. 1995. Isolation of infectious bursal disease virus from the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). *Poult. Sci.* 74: 45-49.
- Neves, P.M.O.J. & E. Hirose. 2005. Seleção de Isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café *Hypothenemus Hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). *Neotrop. Entomol.* 34: 77-82.
- Oliveira, C.N., P.M.O.J. Neves & L.S. Kawazoe. 2003. Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. *Sci. Agric.* 60: 663-667.
- Pachamuthu, P., S.T. Kamble & G.Y. Yuen. 1999. Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain ESC-1 to the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) and its compatibility with insecticides. *Biol. Microb. Control* 92: 340-346.
- Pereira, R.M., S.B. Alves & P.R. Reis. 1998. Segurança no emprego de entomopatógenos, p.171-191. In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba, Fealq, 1163p.
- Perez, A., B. Szczypel, R. Larramendy, N. Acosta & A. González. 1999. Biopreparado entomopatógeno contra el coleoptera *Alphitobius diaperinus*. *Rev. Cub. Ciênc. Avic.* 23: 45-52.
- Sosa-Gómez, D.R. & S.B. Alves. 2000. Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliaceae). *An. Soc. Entomol. Bras.* 29: 515-521.
- Steinkraus, D.C., C.J. Geden & D.A. Rutz 1991. Susceptibility of lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) to *Beauveria bassiana*: Effects of host stage, formulation, substrate and host passage. *J. Med. Entomol.* 28: 314-321.
- Steelman, D. 1996. Darkling beetles are costly pests. *Poult. Dig.* 55: 22-23.
- Vaughan, J.A. & E.C. Turner Jr. 1984. Residual and topical toxicity of various insecticides to the lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.* 77: 216-220.

Received 17/XII/04. Accepted 29/VII/05.