

UTILIZAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* CONTRA *Alphitobius diaperinus* (CASCUDINHO), COMO GARANTIA DE SE GARANTIR SANIDADE, BIOSSEGURIDADE E BEM ESTAR ANIMAL NAS INSTALAÇÕES AVÍCOLAS .

CASSIANO J.A.¹, DE LA NUEZ F.C.², BARACHO M.S.³, DESTÉFANO R.H.R.⁴, NÄÄS I.A.⁵
GIGLI A.C.S.⁶

1. Aluno de Graduação Engenharia Agrícola, Bolsista, Departamento de Construções Rurais e Ambiente, FEAGRI-UNICAMP, Caixa Postal 6011, Campinas-SP, 19-37881039, e-mail: juliano.cassiano@agr.unicamp.br

2. Aluno de Graduação, Bolsista PIBIC/CNPq, Departamento de Construções Rurais e Ambiente, FEAGRI-UNICAMP, Campinas-SP

3. Bióloga, Profa. Dra. Visitante, Departamento de Construções Rurais e Ambiente, FEAGRI-UNICAMP, Campinas-SP

4. Engenheiro Agrônomo, Dr., Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas-SP

5. Engenheira Civil, Profa. Dra., Departamento de Construções Rurais e Ambiente, FEAGRI-UNICAMP, Campinas-SP

6. Bióloga, Mestranda em Engenharia Agrícola. Depto. de Construções Rurais e Ambiente, Faculdade de Engenharia Agrícola, UNICAMP, Campinas – SP.

Escrito para apresentação no
XXXV Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola
31 de julho a 4 de agosto de 2006 – João Pessoa – PB

RESUMO: Este trabalho permitiu a análise do isolado 2575 do fungo *Metarhizium anisopliae* contra o besouro cascudinho (*Alphitobius diaperinus*), praga da avicultura, causador de danos às aves pelos ferimentos no trato digestório e pela transmissão de vários agentes patogênicos causadores de doenças. O estudo da utilização de entomopatógenos para o controle de pragas agrícolas é de fundamental importância, uma vez que a busca por produtos que apresentem garantia de sanidade avícola, sustentabilidade e bem estar animal é fator determinante para o mercado consumidor e no cenário internacional. Foram realizadas três repetições com vinte insetos por tratamento, onde adultos e larvas do cascudinho foram expostos a três concentrações do fungo, 2×10^3 , 2×10^6 e 2×10^9 conídios/mL, por 10 minutos. A mortalidade foi avaliada durante 15 dias consecutivos, onde verificou-se uma variação de 5-90% em larvas e de 0-5% nos insetos adultos, não sendo esta considerada significativa. Devido as características intrínsecas de cada organismo, vários podem ter sido os fatores responsáveis por tais resultados.

PALAVRAS-CHAVE: avicultura, controle microbiano, biossegurança.

USE OF *Metarhizium anisopliae* AGAINST *Alphitobius diaperinus* (CASCUDINHO), AS HALF OF GUARANTEE HEALTH, BIOSECURITY AND WELFARE ANIMAL IN POULTRY HOUSES.

ABSTRACT: This work has allowed the analysis of 2575 isolated species of fungus *Metarhizium anisopliae* against the dark beetle cascudinho (*Alphitobius diaperinus*), which parasites poultry and is known to cause damages to the bird's digestive tract and is responsible for the transmission of some pathogenic agents of illnesses. The study of entomopathogenous agents used for the control of agricultural pests is of basic importance, since the hunt for products that guarantees poultry health; sustainability and animal welfare are major factors for the consuming market within national and international sceneries. Three repetitions with twenty insects per treatment had been carried through, where adult and larvae of cascudinho had been exposed to three different concentrations of fungus, 2×10^3 , 2×10^6 and 2×10^9 conidia/mL, for 10 minutes. Mortality was evaluated during 15 consecutive days, where a variation of 5-90% in larvae and 0-5% in the adult insects was verified, but considered not significant ($P > .05$). Due to the intrinsic characteristics of each organism, several factors can have been responsible for such results.

KEYWORDS: poultry, control microbiological, biosecurity.

INTRODUÇÃO: O Brasil se consolidou em 2005 como o maior exportador mundial de carnes de frango, exportando 2,845 bilhões de toneladas de carne e obtendo US\$ 3,5 bilhões em divisas, o que mostra a importância e o potencial da avicultura comercial brasileira que produz carnes, ovos e aves de reprodução. Numa época em que a pandemia da gripe aviária produz um efeito devastador na produção avícola, um dos grandes desafios da moderna avicultura mundial diz respeito a biossegurança e ao “status sanitário” do plantel avícola, assim produtores e técnicos da avicultura brasileira estão rapidamente se dando conta da necessidade imperiosa de utilizarem programas de biossegurança em seus sistemas de produção para alcançarem o máximo de produtividade e lucratividade. Atualmente tem sido demasiada a constatação de grandes populações de cascudinho, *Alphitobius diaperinus*, em aviários comerciais que aumentam a debilidade das aves por se alimentarem da pele de animais fracos e doentes, e que quando ingeridos pelas aves jovens provocam ferimentos no sistema digestivo, além de transmitirem agentes patogênicos tais como: aspergillose, coccidiose, bacterioses (*E. coli*, *Salmonella* sp. *Bacillus*, *Streptococcus* sp), viroses (Gumboro, leucose, Marek, New Castle, Reovirus, Rotavirus, Enterovírus), parasitoses (*Hymenolepis carioca*, *H. cantiana*, *Choanotaenia infundibulum*, *Raillietina cestacillus*, *Heterakis gallinae*, etc) (DE LAS CASAS *et al.* 1976, MCALLISTER *et al.* 1994, 1995). O controle químico não é muito eficiente pois possibilita reinfestações além de deixar resíduos tóxicos que podem contaminar o ambiente, as aves e o consumidor final. Esse trabalho teve como objetivo verificar a patogenicidade da linhagem 2575 de *Metarhizium anisopliae* contra o cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) para seu possível uso no Manejo Integrado de Pragas, buscando-se assim o desenvolvimento sustentável da avicultura brasileira.

MATERIAL E MÉTODO: O experimento foi realizado utilizando insetos provenientes da Granja Cláudia, localizada no município de Louveira, Estado de São Paulo. Foram coletados insetos, adultos e larvas, os quais foram levados para o Laboratório de Construções Rurais e Ambiente (FEAGRI/UNICAMP) e armazenados em baldes contendo cama e ração avícola. Utilizou-se a linhagem 2575 do fungo *Metarhizium anisopliae*. Inicialmente foram produzidos conídios em meio BDA (ISTA, 1966) incubados em estufa a 28°C por 10 dias. Utilizando-se uma espátula os conídios foram coletados e com o auxílio de um hematómetro (Câmara Neubauer) foi preparada uma solução padrão à uma concentração de 1×10^9 conídios/mL em solução de Tween 80 a 0,01% (v/v). Fazendo-se diluições foram obtidas uma solução à concentração de 1×10^6 e outra de 1×10^3 conídios/mL. De cada uma das três concentrações foram coletados 2 mL e com uma pipeta foram transferidas para placas de Petri contendo papel de filtro previamente esterilizado. Em seguida larvas e adultos do cascudinho foram expostos por um período de 10 minutos a cada concentração sendo realizadas três repetições com vinte insetos por tratamento mais um grupo controle que recebeu o mesmo tratamento exceto o patógeno. Após os tratamentos os insetos, larvas e adultos, foram individualizados em frascos de vidro limpos e secos. Insetos tratados e não tratados foram mantidos em estufa a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e com umidade relativa acima de 80%, controlados durante 15 dias, onde foi feita a contagem diária dos mortos sendo os mesmos congelados a -20°C . Para analisar a causa da morte eles foram lavados durante 20 minutos em solução de NaHClO a 2,5% (v/v), depois lavados duas vezes por 15 minutos em solução de Tween 80 a 0,01% (v/v), em seguida lavados por três vezes em água destilada esterilizada, sendo colocados para secarem em papel de filtro previamente esterilizado. Estes procedimentos contribuíram para remover possíveis agentes patológicos que poderiam estar aderidos ao tegumento externo dos insetos e larvas. Os insetos foram então colocados em placas de Petri contendo meio BDA, as quais foram levadas para a estufa à uma temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, e analisou-se após 48 a 72 horas se houve crescimento do fungo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Os resultados obtidos nos testes de patogenicidade da linhagem 2575 de *M. anisopliae* apresentados na Tabela I, mostram o potencial entomopatogênico deste fungo sobre o cascudinho, resultando numa mortalidade de até 90% nas larvas expostas à maior concentração. Observou-se que a linhagem estudada não apresentou mortalidade significativa para o

inseto adulto. Vários são os fatores que podem ter induzido tal resultado. Segundo CHARNLEY (1989), os fungos são conhecidos pela sua capacidade de produção de compostos quimicamente diversos, alguns dos quais biologicamente potentes, os quais causam reações severas em outros organismos como a conversão dos tecidos dos insetos em nutrientes para o crescimento fúngico e um acentuado efeito tóxico tanto em nível celular quanto em nível do organismo como um todo. Vários desses compostos já foram descritos (ROBERTS, 1981), mas suas funções na patogenicidade não são ainda bem claras. Sabe-se que eles atuam na dissolução da cutícula do inseto para a indução de doença, supressão do sistema imunológico dentre outras. O composto mais estudado são as destruxinas e *M. Anisopliae* produz pelo menos 23 diferentes tipos (KRASNOFF *et al.* 1996). Vários efeitos tóxicos dessas destruxinas já foram comprovados e verificou-se que as mesmas possuem atividade imunodepressora em insetos, o que sugere que há uma relação entre a produção de destruxinas e a patogenicidade do fungo, uma vez que esta pode facilitar o estabelecimento do patógeno no hospedeiro (FARGUES *et al.* 1985), assim, possivelmente a linhagem 2575 de *M. anisopliae* pode não produzir ou produzir toxinas que não são tão eficientes contra o inseto adulto. Devemos levar em conta também o processo de infecção entre o patógeno e o hospedeiro, pois um dos fatores-chave na patogenicidade de fungos entomopatogênicos são as enzimas envolvidas na penetração da cutícula do inseto, as quais possuem uma enorme diversidade metabólica e são controladas por um complexo sistema de indução/repressão (St. LEGER *et al.* 1995).

TABELA I. Porcentagem de mortalidade produzida pela linhagem 2575 de *Metarhizium anisopliae* depois de aplicada em *Alphitobius diaperinus*.

Tratamento	<i>Metarhizium anisopliae</i>	
	Larvas	Adultos
2 x 10 ³	5	0
2 x 10 ⁶	15	5
2 x 10 ⁹	90	0
Controle	5	1,6

A resistência dos insetos é também um fator determinante, pois um dos mecanismos de defesa dos insetos contra as táticas de controle tem sido a evolução da resistência às mesmas, e esse potencial de resistência para vários entomopatógenos tem sido demonstrada para algumas espécies-pragas de importância nacional e mundial (FUXA 1993). A coexistência entre um entomopatógeno e seu hospedeiro é um fato inegável e os mesmos se coevoluíram por longos períodos de tempo, assim, há uma grande variabilidade de resposta desses artrópodos aos seus diferentes patógenos, sem contar que o inseto pode expressar alguns mecanismos de defesa, sejam eles mecânicos, celulares, imunológicos, bioquímico-fisiológicos e comportamentais, frente à exposição de um certo agente (TANADA & KAYA 1993). Organismos vivos, como os entomopatógenos, são capazes de desenvolver mecanismos que agem de modo a anular os mecanismos de resistência desenvolvidos pelas populações de insetos. No entanto, quando inseticidas microbianos são produzidos uniformemente em laboratório isso não ocorre pois a padronização age como mecanismo redutor de variabilidade da população dos patógenos (ALVES 1998).

CONCLUSÃO: A linhagem 2575 do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* mostrou-se altamente patogênica ao estágio larval do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) alcançando níveis de até 90% de mortalidade, no inseto adulto a mesma não apresentou mortalidade significativa .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALVES S.B. 1998. Controle Microbiano de Insetos, 2a. Ed., FEALQ/USP, Piracicaba, SP., 1163p.
 CHARNLEY, A. K. 1989. Mechanisms of fungal pathogenesis in insects, p. 85-125. In J. M. Whipps & R. D. Lumsden (eds.), Biotechnology of fungi for Improving Plant growth. Cambridge Uni. Press.

- DE LAS CASAS, E.; HAREIN, P. K.; DESHMUCK, D. R. & POMEROY, B. S. 1976. Journal Economic Entomology, 69: 775-779,
- FARGUES, J.; ROBERT, P. H.; & VEY, A. 1985. Effect of destruxins A, B and E on the pathogenesis of *Metarhizium anisopliae* in larvae of the coleoptera Scarabaeidae. Entomophaga 30: 359-364.
- FUXA, J. R. 1993. Insect resistance to viruses, p. 197-209. In N. E. Beckage, S. N. Thompson & B. A. Federici (ed.). Parasites and Pathogens of insects. Vol 2: Pathogens. Academic Press. 294 p.
- ISTA (Institute of Seed Testing Association). 1996. Int. Rules for Seed Testing. Proceedings Seed Testing Association, 31: 1-152.
- KRASNOFF, S. B.; GIBSON, D. M.; BELOFSKY, G. N.; GLOER, K. B. & GLOER, J. B. 1996. New destruxins from the entomopathogenic fungus *Aschersonia* sp. J. Natural Products 59: 485-489.
- MCALLISTER, J. C., STEELMAN, C. D. & SKEELES, J.K., 1994, Reservoir competence of Lesser Mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) for *Salmonella typhimurium* (Eubacteriales: Enterobacteriaceae). *J. Med. Ent.*, 31:369-372.
- MCALLISTER, J. C., STEELMAN, C. D., NEWBERRY, L. A. & SKEELES, J. K., 1995, Isolation of infectious bursal disease virus from the Lesser Mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). *Poult. Sci.*, 74: 45-49.
- ROBERTS, D. W. 1981. Toxins of entomopathogenic fungi. p.441-464. In H. D. Burges, (ed.), Microbial Control of Pests and Plant diseases. 1970-1980. London, Academic Press.
- ST. LEGER, R. J.; JOSHI, M. J.; BIDOCHKA & ROBERTS, D.W. 1995. Multiple aminopeptidases produced by *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. 65: 313-314.
- TANADA, Y. & KAYA, H. K. 1993. Insect pathology. San Diego, Academic Press, 666p.