

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ATIVIDADE PATOGÊNICA DOS FUNGOS *Metarhizium*
anisopliae, *Beauveria bassiana* **E** *Paecilomyces fumosoroseus*
PARA *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera:
Calliphoridae)

Luciana Yoshida

Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIA VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ATIVIDADE PATOGÊNICA DOS FUNGOS *Metarhizium*
anisopliae, *Beauveria bassiana* **E** *Paecilomyces fumosoroseus*
PARA *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera:
Calliphoridae)

Luciana Yoshida

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2007

Yoshida, Luciana
Y64a Atividade patogênica dos fungos *Metarhizium anisopliae*,
Beauveria bassiana e *Paecilomyces fumosoroseus* para *Chrysomya*
putoria (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae)/ Luciana Yoshida.
– – Jaboticabal, 2007
xii, 84 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2001
Orientador: Antônio Carlos Monteiro
Banca examinadora: Giane Serafim da Silva, Érika Barbosa
Neves Graminha
Bibliografia

1. Controle biológico. 2. Controle microbiano. 3. Fungos
entomopatogênicos. 4. *Chrysomya putoria*. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8595.733.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LUCIANA YOSHIDA - Filha de Julio Yoshida e Helena Yoshida, nasceu em 02 de janeiro de 1975, em São Paulo. Em 1999 concluiu o curso de Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, recebendo o título de Zootecnista. Durante a graduação, estagiou em diversas áreas junto aos departamentos de tecnologia, nutrição de não-ruminantes, engenharia rural e CPPAR, todos pertencentes a Unesp – Jaboticabal. No período de 1999 a 2004, atuou como coordenadora de projetos de pesquisas mercadológicas, junto ao mercado de sementes e defensivos agrícolas. Em 2005 ingressou no curso de Pós-graduação em Microbiologia, área de concentração em Microbiologia Agrícola, no Departamento de Produção Vegetal da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. Durante o curso de Mestrado participou de congressos e fóruns publicando trabalhos na área de entomopatógenos.

A meu amor, companheiro e amigo..... Marco

Por acreditar e lutar pelos meus sonhos, como se fossem seus.

Por acreditar em mim, nos momentos em que nem mesmo eu acreditava.

Eu te amo!

DEDICO

Aos meus pais

Julio e Helena - pelo carinho, incentivo e dedicação.

OFEREÇO

A DEUS - pelo dom da vida e oportunidade de estar aqui.

*A Espiritualidade maior - pela presença constante nos momentos de alegria e
nas horas mais difíceis.*

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro** - pela oportunidade, confiança, amizade, orientação e principalmente pelo exemplo de caráter de justiça.

A **CAPES** - pela bolsa de mestrado, que permitiu minha total dedicação a este trabalho.

Aos **Prof. Dr. José Carlos Barbosa, Dr. Gener Tadeu Pereira** e ao **Dr. Vando Edésio Soares** - pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

Ao **Prof. Dr. Wesley Augusto Conde Godoy** - pela identificação da espécie da mosca.

Ao **Prof. Dr. Ely Nahas** e ao **Prof. Dr. Fernando A. Ávila**, pelas importantes sugestões científicas no exame de qualificação.

A **Dr^a. Erika Barbosa Neves Graminha** e a **Dr^a. Giane Serafim da Silva**, pela participação da banca examinadora da defesa e correções tão importantes.

Ao bibliotecário **Fabio Assis Pinho** - pelo auxílio nas correções da bibliografia citada.

As minhas grandes amigas, **Dinalva, Ana Carolina e Claudia Demétrio** – pelo apoio técnico, moral, psicológico em todas etapas, tornando todos os momentos únicos e agradáveis.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia, **Thaís, Carina, Manuela e Lucas e Carime** pelo apoio nos experimentos realizados.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia, **Marquinhos, Nancy e Mara** – pela amizade, incentivo e companheirismo.

A **Edna**, secretária do Laboratório de microbiologia, por estar sempre pronta a ajudar, sendo prestativa em todos os momentos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vii
APÊNDICE	82
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Moscas sinantrópicas	2
2.2 Fungos entomopatogênicos	4
2.3 Controle biológico	6
3. REFERÊNCIAS.....	7
CAPÍTULO 2 – EFICIÊNCIA DE <i>Metarhizium anisopliae</i> NO CONTROLE DA MOSCA VAREJEIRA <i>Chrysomya putoria</i>.....	14
RESUMO.....	14
SUMARY	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1 Fungo.....	17
2.2 Obtenção e manutenção das colônias de <i>C. putoria</i>	18
2.3 Patogenicidade dos fungos para ovos de <i>C. putoria</i>	18
2.4 Patogenicidade dos fungos para larvas L2 de <i>C. putoria</i>	19
2.5 Patogenicidade dos fungos para pupas de <i>C. putoria</i>	20
2.6 Patogenicidade dos fungos para adultos de <i>C. putoria</i>	20
2.7 Análise estatística	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.1 Patogenicidade para ovos de <i>C. putoria</i>	21
3.2 Patogenicidade para larvas L2 de <i>C. putoria</i>	23

	Página
3. 3 Patogenicidade para pupas de <i>C. putoria</i>	26
3. 4 Patogenicidade para adultos de <i>C. putoria</i>	29
4. CONCLUSÕES	32
5. REFERÊNCIAS.....	32
CAPÍTULO 3 - SUSCEPTIBILIDADE DE <i>Chrysomya putoria</i> (Diptera: Calliphoridae) A AÇÃO PATOGÊNICA DO FUNGO <i>Beauveria bassiana</i>	37
RESUMO	37
SUMARY.....	38
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1 Fungo	40
2.2 Obtenção e manutenção das colônias de <i>C. putoria</i>	41
2.3 Patogenicidade dos fungos para ovos de <i>C. putoria</i>	41
2.4 Patogenicidade dos fungos para larvas L2 de <i>C. putoria</i>	42
2.5 Patogenicidade dos fungos para pupas de <i>C. putoria</i>	43
2.6 Patogenicidade dos fungos para adultos de <i>C. putoria</i>	43
2.7 Análise estatística	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1 Patogenicidade para ovos de <i>C. putoria</i>	44
3.2 Patogenicidade para larvas L2 de <i>C. putoria</i>	46
3.3 Patogenicidade para pupas de <i>C. putoria</i>	49
3.4 Patogenicidade para adultos de <i>C. putoria</i>	52
4.CONCLUSÕES	55
5. REFERÊNCIAS	55
CAPÍTULO 4- PATOGENICIDADE DE <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> PARA A MOSCA SINANTRÓPICA DE AVIÁRIO <i>Chrysomya putoria</i> (Diptera: Calliphoridae)	60
RESUMO	60
SUMARY	61

	Página
1. INTRODUÇÃO	62
2. MATERIAL E MÉTODOS	63
2.1 Fungo	63
2.2 Obtenção e manutenção das colônias de <i>C. putoria</i>	64
2.3 Patogenicidade dos fungos para ovos de <i>C. putoria</i>	64
2.4 Patogenicidade dos fungos para larvas L2 de <i>C. putoria</i>	65
2.5 Patogenicidade dos fungos para pupas de <i>C. putoria</i>	66
2.6 Patogenicidade dos fungos para adultos de <i>C. putoria</i>	66
2.7 Análise estatística	66
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1 Patogenicidade para ovos de <i>C. putoria</i>	67
3.2 Patogenicidade para larvas L2 de <i>C. putoria</i>	69
3.3 Patogenicidade para pupas de <i>C. putoria</i>	72
3.4 Patogenicidade para adultos de <i>C. putoria</i>	75
4. CONCLUSÕES	77
5. REFERÊNCIAS.....	77
CAPÍTULO 5 – IMPLICAÇÕES.....	81

LISTA DE FIGURAS

Página

Capítulo 2

Figura 1.	Larvas mortas de <i>Chrysomya putoria</i> apresentando extrusão de <i>Metarhizium anisopliae</i>	23
Figura 2.	Sobrevivência das larvas de <i>Chrysomya putoria</i> tratadas com suspensões de conídios dos isolados IBCB 425 e E 9 de <i>Metarhizium anisopliae</i> , nas concentrações de 10^6 e 10^8 conídios/mL e controle, nos primeiros 15 dias após o tratamento.....	25
Figura 3.	Sobrevivência de adultos de <i>Chrysomya putoria</i> emergidos de pupas tratadas com suspensões de conídios dos isolados IBCB 425 e E 9 de <i>M. anisopliae</i> , nas concentrações de 10^6 e 10^8 conídios/mL e controle, até o 23° dia após tratamento.....	27
Figura 4.	Pupa de <i>Crysomya putoria</i> morta apresentando extrusão de <i>Metarhizium anisopliae</i>	28
Figura 5.	Sobrevivência de adultos de <i>Chrysomya putoria</i> pulverizados com suspensões de conídios dos isolados IBCB 425 e E 9 de <i>Metarhizium anisopliae</i> , nas concentrações de 10^6 e 10^8 conídios/mL e controle, até o 23° dia após tratamento.....	30
Figura 6.	Adultos de <i>Chrysomya putoria</i> mortos pelo fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> exibindo a extrusão do patógeno.....	31

Capítulo 3

Figura 1.	Larvas de <i>Chrysomya putoria</i> morta pelo fungo <i>Beauveria bassiana</i> exibindo a extrusão do patógeno.....	46
Figura 2.	Sobrevivência das larvas de <i>Chrysomya putoria</i> tratadas com suspensões de conídios dos isolados AM 09 e JAB 07 de <i>Beauveria bassiana</i> , nas concentrações de 10^6 e 10^8 conídios/mL e controle, nos primeiros 15 dias após o tratamento.....	48
Figura 3.	Pupas de <i>Chrysomya putoria</i> morta pelo fungo <i>Beauveria bassiana</i> . A: Crescimento hifálico do patógeno sobre o cadáver da pupa; B: pupa exibindo a extrusão do patógeno na fase de conidiogênese.....	49
Figura 4.	Sobrevivência de adultos de <i>Chrysomya putoria</i> emergidos de pupas tratadas com suspensões de conídios dos isolados AM 09 e JAB 07 de <i>Beauveria bassiana</i> , nas concentrações de 10^6 e 10^8 conídios/mL e controle, até o 23º dia após tratamento.....	51
Figura 5.	Sobrevivência de adultos de <i>Chrysomya putoria</i> pulverizados com suspensões de conídios dos isolados AM 09 e JAB 07 de <i>Beauveria bassiana</i> , nas concentrações de 10^6 e 10^8 conídios/mL e controle, até o 23º dia após tratamento.....	54
Figura 6.	Moscas adultas de <i>Crysomya putoria</i> mortas pelo fungo <i>B. bassiana</i> exibindo a extrusão do patógeno.....	55

Capítulo 4

- Figura 1.** Larvas de *C. putoria* mortas pelo fungo *P. fumosoroseus*. A: visualização de uma das câmaras úmidas para verificação da extrusão do patógeno; B: Larva apresentando extrusão do fungo..... 69
- Figura 2.** Sobrevivência das larvas de *Chrysomya putoria* tratadas com suspensões de conídios dos isolados IBCB 133 e IBCB 75 de *P. fumosoroseus*, nas concentrações de 10^6 e 10^8 conídios/mL e controle, nos primeiros 15 dias após o tratamento..... 71
- Figura 3.** Pupas mortas pelo fungo *Paecilomyces fumosoroseus*. A: pupa colonizada pelo fungo na fase hifálica. B: Mosca emergindo da pupa colonizada pela fungo na fase de esporulação..... 73
- Figura 4.** Sobrevivência de adultos de *Chrysomya putoria* emergidos de pupas tratadas com suspensões de conídios dos isolados IBCB 133 e IBCB 75 de *P. fumosoroseus*, nas concentrações de 10^6 e 10^8 conídios/mL e controle, até o 23° dia após tratamento..... 74
- Figura 5.** Sobrevivência de adultos de *Chrysomya putoria* pulverizados com suspensões de conídios dos isolados IBCB 133 e IBCB 75 de *P. fumosoroseus*, nas concentrações de 10^6 e 10^8 conídios/mL e controle, até o 23° dia após tratamento..... 76

LISTA DE TABELAS

Página

Capítulo 2

Tabela 1.	Valores médios e análise de variância para a eclosão, mortalidade larval, tempo médio de empupação, tempo médio de vida das pupas e emergência de adultos de <i>Chrysomya putoria</i> após tratamento de ovos com suspensões de conídios dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	22
Tabela 2.	Valores médios e análise de variância do tempo médio de vida em dias de larvas L2 de <i>Chrysomya putoria</i> , após tratamento com suspensões de conídios dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> , avaliadas diariamente até 15 dias após tratamento.....	24
Tabela 3.	Valores médios e análise de variância da emergência de adultos, tempo médio de vida de adultos e mortalidade total obtidas de pupas de <i>Chrysomya putoria</i> tratadas com suspensões de conídios de isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> . Avaliação conduzida até 20 dias após o início da emergência de adultos.....	26
Tabela 4.	Valores médios e análise de variância do tempo médio de vida de adultos e mortalidade total obtidas de adultos de <i>Chrysomya putoria</i> tratados com suspensões de conídios de isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> . Avaliação conduzida até 20 dias após o início da emergência de adultos.....	29

Capítulo 3

Tabela 1.	Valores médios e análise de variância para a eclosão, mortalidade larval, tempo médio de empupação, tempo médio de vida das pupas e emergência de adultos de <i>Chrysomya putoria</i> após tratamento de ovos com suspensões de conídios dos isolados de <i>Beauveria bassiana</i>	45
Tabela 2.	Valores médios e análise de variância do tempo médio de vida em dias de larvas, pupas e adultos oriundos de larvas L2 de <i>Chrysomya putoria</i> , após tratamento com suspensões de conídios dos isolados de <i>Beauveria bassiana</i> , avaliadas diariamente pelo período 30 dias.....	47
Tabela 3.	Valores médios e análise de variância da emergência de adultos, tempo médio de vida de adultos e mortalidade total obtidas de pupas de <i>Chrysomya putoria</i> tratadas com suspensões de conídios de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> . Avaliação conduzida até 20 dias após o início da emergência de adultos.....	50
Tabela 4.	Valores médios e análise de variância da emergência de adultos, tempo médio de vida de adultos e mortalidade total obtidas de adultos de <i>Chrysomya putoria</i> tratados com suspensões de conídios de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> . Avaliação conduzida até 20 dias após o início da emergência de adultos.....	53

Capítulo 4

Tabela 1.	Valores médios e análise de variância para a eclosão, mortalidade larval, tempo médio de empupação, tempo médio de vida das pupas e emergência de adultos de <i>Chrysomya putoria</i> após tratamento de ovos com suspensões de conídios dos isolados de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	68
Tabela 2.	Valores médios e análise de variância do tempo médio de vida em dias de larvas, pupas e adultos oriundos de larvas L2 de <i>Chrysomya putoria</i> , após tratamento com suspensões de conídios dos isolados de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> , avaliadas diariamente pelo período 30 dias	70
Tabela 3.	Valores médios e análise de variância da emergência de adultos, tempo médio de vida de adultos e mortalidade total obtidas de pupas de <i>Chrysomya putoria</i> tratadas com suspensões de conídios de isolados de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> . Avaliação conduzida até 20 dias após o início da emergência de adultos.....	72
Tabela 4.	Valores médios e análise de variância do tempo médio de vida de adultos e mortalidade total obtidas de adultos de <i>Chrysomya putoria</i> tratados com suspensões de conídios de isolados de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> . Avaliação conduzida até 20 dias após o início da emergência de adultos.....	75

APÊNDICE

Página

Figura 1.	Caixas de criação das moscas. A: Vista lateral; B: Vista superior.....	83
Figura 2.	Ovos acondicionados sobre papel de filtro e este sob dieta de carne bovina; A: ovos tratados antes da eclosão; B: ovos eclodidos após 12 horas de inoculação.....	83
Figura 3.	Visualização de uma câmara úmida e os recipientes plásticos interligados e vedados com tecido <i>voile</i> , onde os grupos de ovos e larvas foram mantidos durante a fase larval.....	84
Figura 4.	Caixa de isopor adaptada para manutenção das moscas durante a fase adulta de todos ensaios.....	84
Figura 5.	Sachês contendo a ração que compunha a dieta para ensaio das larvas de <i>Chrysomya putoria</i>	85
Figura 6.	Câmara úmida composta de duas placas de Petri e algodão umedecido para verificação da extrusão do patógeno.....	85
Figura 7.	Visualização das caixas de isopor em que os adultos de <i>Chrysomya putoria</i> foram acondicionados.....	85

ATIVIDADE PATOGÊNICA DOS FUNGOS *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* E *Paecilomyces fumosoroseus* PARA *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae)

RESUMO - O presente estudo investigou, em condições de laboratório, a atividade patogênica de diferentes isolados dos fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus*, aplicados nas concentrações de 1×10^6 e 1×10^8 conídios/mL nos estágios de ovo, larva L2, pupa e adulto de *Chrysomya putoria*. Grupos de 30 ovos, 20 larvas L2 e 20 pupas foram banhados com as suspensões de conídios e no ensaio com adultos, grupos de 30 moscas, foram pulverizados com as mesmas suspensões. Em todos os ensaios, utilizaram-se quatro repetições por tratamento. Os três fungos e seus respectivos isolados apresentaram baixa atividade patogênica para a fase de ovo. Os isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, aplicados na concentração de 10^8 conídios/mL, promoveram 100% de mortalidade de larvas de *C. putoria*. O tratamento de pupas com o isolado JAB 07 de *B. bassiana*, na concentração de 10^8 conídios/mL, reduziu significativamente a emergência de adultos. O efeito dose-resposta foi melhor evidenciado no ensaio com adultos, pois os isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* diminuíram a sobrevivência somente quando aplicados na concentração de 10^8 conídios/mL. Todos os fungos se mostraram patogênicos para *C. putoria*, havendo diferença entre os isolados quanto a ação patogênica. Os isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram mais eficientes, atuando principalmente nas fases de larva e adulto. *P. fumosoroseus* evidenciou menor atividade patogênica, apenas reduzindo a sobrevivência de adultos emergidos a partir de pupas inoculadas. A eficiência do controle foi influenciada pela concentração de conídios, obtendo-se os melhores resultados com as suspensões mais concentradas.

Palavras-chave: Controle biológico, controle microbiano, fungo entomopatogênico, avicultura de postura, mosca sinantrópica.

PATHOGENIC ACTIVITY OF *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* AND *Paecilomyces fumosoroseus* AGAINST *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830)
(Diptera: Calliphoridae)

ABSTRACT - The present study investigated, in laboratory conditions, the pathogenic activity of different isolates of the fungi *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*, applied in the concentrations of 1×10^6 and 1×10^8 conidia/ml in the stages of egg, L2 larvae, pupa and adult of *Chrysomya putoria*. Groups of 30 eggs, 20 L2 larvae e 20 pupae were bathed with the conidia suspensions and in the assay with adult, groups of 30 flies were pulverized with the same suspensions. In all the assays there were used four replicates per treatment. The three fungus and their respective isolates presented low pathogenic activity for the egg stage. The isolates *B. bassiana* and *M. anisopliae*, applied in the concentration of 10^8 conidia/ml, promoted a 100% of *C. putoria* larvae mortality. The pupae treatment with the isolate JAB 07 of *B. bassiana*, in the concentration of 10^8 conidia/ml, decreased significantly adult emergence. The dose-response effect was better evidenced in the assay with adults, because the isolates of *M. anisopliae* and *B. bassiana* only reduced the survival when applied in the concentration of 10^8 conidia/ml. All fungus demonstrated to be pathogenic to *C. putoria*, although there is a difference between the isolates in their pathogenic activity. The isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae* were more efficient, mainly acting in the larva and adult stages. *P. fumosoroseus* evidenced lower pathogenic activity, decreasing the survival of emerged adult only through inoculated pupae. The control efficiency was influenced by the conidia concentration, obtaining the best results with the most concentrated suspension.

Key words: biologic control; microbial control; entomopathogenic fungus and poultry, synonhropic fly.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

O controle de moscas representa um dos principais problemas para a indústria avícola de postura, apresentando custos diretos estimados em 13 centavos de dólar por ave ao ano nos EUA (AXTELL, 1986). Atualmente, existem várias alternativas de controle destes dípteros em aviários. Entretanto, o uso indiscriminado de inseticidas nas granjas promove a ocorrência de resistência aos produtos químicos, eleva os riscos de poluição ambiental e aparecimento de resíduos nos ovos e carnes das aves, além de possibilitar o desequilíbrio da fauna de inimigos naturais das moscas (BRUNO et al., 1993). Outro aspecto relevante é a contaminação dos dejetos, pois em algumas granjas, a produção de esterco é da ordem de 2000 toneladas mensais, sendo comercializado como adubo orgânico, uma atividade econômica de grande importância para o setor (GUIMARÃES, 1988).

As práticas adequadas de manejo para os estercos, associados à atividade de predadores naturais, os chamados manejos integrados, são bastante eficientes no controle das moscas, porém requerem maior frequência de coleta, processamento e armazenamento do mesmo, tornando a atividade onerosa (AXTELL, 1986).

A identificação de competitividade entre organismos em um ecossistema específico representa, neste contexto, uma perspectiva promissora para o tratamento de inúmeras enfermidades. No caso das moscas sinantrópicas, o controle biológico utilizando agentes microbianos, especialmente fungos entomopatogênicos como o *M. anisopliae* e *B. bassiana*, apresenta significativo potencial profilático, tendo em vista que estes microrganismos exercem atividade patogênica para uma grande variedade de artrópodes, pois invadem o hospedeiro através da cutícula, auxiliado pela ação simultânea hidrolítica de enzimas como proteases, quitinases e lípases (BITTENCOURT et al., 1999). No entanto, pouco se sabe da patogenicidade destes fungos sobre estágios larvares de dípteros sinantrópicos presentes nos excrementos das aves.

A *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae) é uma espécie de mosca de grande importância médico sanitária, pois atua como vetor mecânico e/ou biológico de diversos agentes patogênicos, incluindo parasitos do homem e de animais domésticos. O stress causado por infestações de *C.putoria* causam sérios problemas em criações de animais, interferindo no ganho de peso como agente causador de estresse, podendo afetar a postura em aves, resultando assim em perdas econômicas significativas. Em sistemas de produção avícola de postura comercial, as galinhas poedeiras são alojadas em gaiolas suspensas, em condições de alta densidade, com conseqüente acúmulo de esterco, excelente substrato para o desenvolvimento de moscas sinantrópicas (SILVA et al., 2000).

Tendo em vista a escassa literatura envolvendo a competição entre os fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *P. fumosoroseus* e os dípteros sinantrópicos, associado ao desafio que representa estabelecer programas profiláticos eficazes contra estes vetores, há necessidade de conduzir trabalhos que investiguem a potencialidade do uso destes agentes no controle de moscas sinantrópicas.

O presente estudo propõe investigar, em condições de laboratório, a atividade entomopatogênica dos fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus* aplicados nas concentrações de 1×10^6 e 1×10^8 conídios/mL, para os estágios de ovo, larva L2, pupa e adulto de *Chrysomya putoria*, em experimentos realizados em condições laboratoriais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Moscas Sinantrópicas

Os dípteros muscóides das famílias Calliphoridae, Fanniidae, Muscidae e Sarcophagidae apresentam elevado potencial como vetores mecânicos de agentes etiológicos como vírus, bactérias, cistos de protozoários e ovos de helmintos. Estes artrópodes são de grande interesse médico-sanitário pelo índice de ocorrência,

distribuição e predominância em áreas metropolitanas (MARICONI et al., 1999). Segundo D'ALMEIDA & ALMEIDA (1996), a adaptação destes dípteros às condições ambientais modificadas pelo homem intensificou o convívio entre ambos, aumentando a probabilidade de ocorrência na transmissão de patógenos, permitindo a classificação destes vetores como moscas sinantrópicas.

Estudos de prevalência em fazendas avícolas identificaram as principais espécies de moscas sinantrópicas presentes em aviários no Brasil. A *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) é a espécie de maior interesse sanitário devido a seu caráter sinantrópico, sua endofilia, abundância na região urbana, capacidade de se desenvolver em vários tipos de substrato, alto poder reprodutivo e por ser apontada como veiculadora de patógenos ao homem e a animais (MENDES & LINHARES, 1993; NEVES, 2000). GREENBERG (1971) relatou a importância da mosca doméstica como vetor dos causadores da febre tifóide, desinteria, cólera, boubá, carbúnculo e algumas formas de conjuntivite. Outros estudos descrevem esta espécie como a mais prevalente em aviários comerciais (ANDERSON & POORBAUGH, 1964; BRUNO et al., 1993), representando mais de 90% do total das espécies que se desenvolvem em tais ambientes (GUIMARÃES, 1988).

Outra espécie de mosca sinantrópica é a mosca varejeira do gênero *Chrysomya* que se constitui em problema no ambiente rural e nas grandes cidades do mundo, onde locais com infra-estrutura inadequada de água, esgoto e acúmulo de material orgânico em decomposição, como no caso dos aviários de postura comercial do Brasil, tornam-se criadouros naturais destes insetos, com conseqüente transmissão de patógenos e propagação de doenças (CARVALHO et al., 2005). Sua tolerância às variações climáticas como temperatura, umidade relativa e luminosidade, pode ser considerada como um dos fatores determinantes da alta capacidade adaptativa verificada nas regiões invadidas, facilitando assim sua expansão geográfica (PARALUPPI & CASTELLÓN, 1993). A *Chrysoma putoria* (Wiedemann) – “Mosca Africana”, pertencente à família Calliphoridae, apresenta origem africana, foi introduzida no Brasil em meados de 1970.

Os adultos apresentam coloração verde metálica com reflexos azulados e espiráculos brancos. O ciclo biológico total evolui num processo de transformação de 4 etapas :ovo (12 a 24 horas), larva (5 a 7 dias), pupa (7 a 9 dias) e adulto (até 2 meses), dependendo da temperatura e umidade. Essa espécie se cria com frequência nos aviários, em fezes liquefeitas, ovos quebrados ou carcaças de aves. (GUIMARÃES, 1984).

2.2 Fungos entomopatogênicos

O controle de insetos usando agentes biológicos, tais como, fungos entomopatogênicos, com o objetivo de evitar aplicação de produtos químicos sintéticos e para aumentar a segurança ambiental, apresenta expectativas promissoras na profilaxia de vetores (AHMED & LEATHER, 1994).

A grande variabilidade genética dos fungos entomopatogênicos pode ser considerada uma das principais vantagens no controle microbiano de artrópodes. ALVES (1998) relatou que é possível, por meio de técnicas apropriadas, selecionar isolados de fungos altamente virulentos, específicos ou não, com características adequadas para serem utilizados como inseticidas microbianos.

Entre os fungos entomopatogênicos mais empregados no controle de pragas estão *B. bassiana* (Vuillemin, 1912), *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) (Holm ex SF Gray). Tal fato se deve provavelmente à sua ampla distribuição geográfica, à variedade de hospedeiros e às condições naturais, enzoóticas ou epizoóticas em que são encontrados (ALVES, 1998).

M. anisopliae é um deuteromiceto amplamente distribuído na natureza e pode ser encontrado facilmente nos solos, onde sobrevive por longos períodos (ALVES et al., 1998). Considerado patogênico para um grande número de espécies de artrópodes, foi o primeiro microrganismo a ser reconhecido pela sua importância para controle de pestes na agricultura (FRAZZON et al., 2000).

Infecta mais de 300 espécies de insetos das diferentes ordens (ALVES, 1998). Alguns de seus hospedeiros são pragas na agricultura, como a cigarrinha da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*), a cigarrinha das pastagens (*Deois* sp e *Zulia* sp), a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*), *Ceratitis capitata* (MOCHI et al., 2006) a formiga saúva (*Atta sexdens*) e os térmitas subterrâneos (Isoptera: Rhinotermitidae). Sua patogenicidade tem sido ainda demonstrada para carrapatos de diferentes gêneros e espécies (MONTEIRO et al, 1998; GARCIA et al, 2004; BASSO et al, 2005; PRETTE et al, 2005).

REINECKE et al. (1990) e KURAMOTO & SHIMAZU, (1992) descreveram a atividade patogênica do *M. anisopliae* para moscas domésticas adultas. Outro estudo relatou elevado índice de mortalidade de moscas domésticas adultas submetidas ao tratamento com dieta contendo o metabólito, destruxina E, deste deuteromiceto (BARSON et al., 1994).

BARSON et al. (1994) demonstraram em seu estudo a elevada virulência do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* para o terceiro instar larval de *Musca domestica*, pois o tratamento com o deuteromiceto na concentração de 1×10^5 conídios/mL preveniu 100% da emergência de moscas. Estes inóculos apresentaram também excelente atividade para indivíduos adultos que morreram seis dias após o desafio com o fungo.

B. bassiana é um fungo entomopatogênico de distribuição cosmopolita, amplamente aplicado no controle de pragas (BELL & HAMALLE, 1970) e recentemente nos carrapatos (PAIÃO et al, 2001). Causador de epizootia, se caracteriza pela alta taxa de crescimento, produção elevada de unidades infectivas, capacidade de sobrevivência no ambiente, facilidade de penetração pelo tegumento e alcançar a hemolinfa do hospedeiro, reafirmando sua alta patogenicidade (FUXA, 1987).

STEINKRAUS et al. (1990) e GEDEN et al. (1995) relataram casos de moscas domésticas com infecções naturais pelo fungo *B. bassiana*, sendo cerca de 85% das ocorrências constatadas no final do verão. Estudos no laboratório utilizando estes isolados demonstram excelente atividade patogênica sobre larvas de terceiro instar e pupas de *M. domestica* em desafios *in vitro*.

B. bassiana apresenta excelente potencial como agente biocontrolador de *Stomoxys calcitrans* (WATSON & PETERSEN, 1993) e *Musca domestica* (BARSON et al., 1994; RENN et al., 1999). GEDEN et al. (1995) verificaram alta mortalidade de *Muscidifurax raptor* após desafio com o este hifomiceto. No entanto, pouco se sabe da atividade deste fungo sobre os estágios larvares de outras moscas sinantrópicas.

P. fumosoroseus é comumente encontrado no solo, sendo também isolado a partir de uma diversidade de insetos em todo o mundo (CANTONE & VANDENBERG, 1998). Por causa da sua capacidade de promover epizootias em diferentes regiões do mundo, começa a ser explorado e desenvolvido como um possível agente biocontrolador (JACKSON et al., 1997), sendo uma espécie de fungo muito estudado e produzido para controlar a mosca branca (JACKSON et al., 2004). CASTILLO et al. (2000) demonstraram os efeitos patogênicos de *M. anisopliae* e *P. fumosoroseus* em *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), os graus diminuíram a fecundidade e fertilidade das fêmeas desafiadas com os fungos.

2.3 Controle Biológico

Observações epizoóticas da ação patogênica natural de microrganismos em populações de artrópodes encorajaram intenso número de estudos para aplicação de fungos entomopatogênicos no controle biológico (FENG et al., 1994; SMITH et al., 2000). A maioria dos fungos patogênica ataca artrópodes após contato externo com o hospedeiro promovendo penetração pela cutícula debilitando e matando o hospedeiro (SMITH et al., 2000).

Segundo BARSON et al. (1994), o desenvolvimento de resistência à maioria dos inseticidas químicos evidencia a necessidade da adoção de novos métodos para controle das moscas sinantrópicas. Neste contexto, LIU & YUE (2000) verificaram a ocorrência de resistência cruzada de moscas (diptera-muscidae) aos inseticidas do grupo dos piretróides. A análise do fipronil mostrou resultados semelhantes na ativação destes mesmos mecanismos. No entanto, a atividade pesticida dos organofosforados

não apresentou o desenvolvimento de resistência por ativação destes ciclos metabólicos. Tais prerrogativas ressaltam a importância na determinação de procedimentos alternativos para controle de vetores em aviários de postura.

Outro aspecto relevante para o sucesso em programas de controle biológico envolve a identificação de características semelhantes nas condições ambientais que favoreçam o desenvolvimento do ciclo biológico tanto do parasito quanto do hospedeiro. SMITH & RUTZ (1991) avaliaram o efeito das condições ambientais na incidência de ovos, larvas, pupas e adultos de várias moscas da família muscidae em fazendas no Estado de Nova York. Entre os parâmetros avaliados neste estudo, a umidade presente nos alimentos e excrementos dos animais apresentou maior influência no ciclo biológico destes artrópodes, ocorrendo reduções significativas nas populações de moscas quando submetidas a ambientes secos ou com baixa umidade relativa. BRUNO et al. (1993) estudaram a relação entre a umidade do esterco de aves e o desenvolvimento larval de moscas sinantrópicas em amostra coletadas no Estado de São Paulo. Os achados desta investigação demonstraram que as larvas dos dípteros requerem elevados níveis de umidade, variando entre 45 e 80%, condições ambientais consideradas satisfatórias para o cultivo e crescimento dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* (BARSON et al., 1994 e FERRON, 1977, respectivamente).

Outro aspecto relevante no emprego do controle biológico são os programas de biossegurança adotados na avicultura, cada vez mais exigentes pelos consumidores internos e externos, quanto à presença de resíduos em produtos, além da comercialização do esterco dos aviários, destinados à adubações em produções agrícolas e da preservação do meio ambiente.

3. REFERÊNCIAS

AHMED, S. I.; LEATHER, S. R. Suitability and potential of entomopathogenic microorganisms for forest pest management – some points for consideration. **International Journal of Pest Management**, Cardif, v.40, p.287-292, 1994.

ALVES, R. T. et al. Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. **Crop protection**, Budapest, v.17, p.675-79, 1998.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1998, 386p.

ANDERSON, J. R.; POORBAUGH, J. H. Observations on the ethology and ecology of various Díptera associated with northern California poultry ranches. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v.1, p.131-147, 1964.

AXTELL, R. C. Fly management in poultry production: cultural, biological, and chemical. **Poultry Science**, Champaign, v.65, p.657-667, 1986.

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. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, v.64, p.107-113, 1994.

BASSO, L. M. S. ; MONTEIRO, A. C. ; BELO, M. A. A.; SOARES, V. E.; GARCIA, M. V.; MOCHI, D. A. Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.6, p.595-600, 2005.

BELL, J. V.; HAMELLE, R. J. Three fungi tested for control of the cowpea curculio, *Chalcodermus aeneus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.15, p.447-50, 1970.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASCARENHAS, A. G.; FACCINI, J. L. H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.2, p.351-354, 1999.

BRUNO, T. V.; GUIMARÃES, J. H.; SANTOS, A. M. M.; TUCCI, E. C. Moscas sinantrópicas (Díptera) e seus predadores que se criam em esterco de aves poedeiras confinadas, no estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v.37, n.3, p.577-590, 1993.

CANTONE, F. A.; VANDENBERG, J. D. Intraspecific diversity in *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycological Research**, Cambridge, v.102, n.2, p.209-215, 1998.

CARVALHO, A. R.; MELLO, R.P.; D'ALMEIDA, J.M. Dinâmica populacional e parasitismo de himenópteros parasitóides de *Chrysomya magacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae), no Rio de Janeiro, RJ. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v.49, n.1, p.118-122, 2005.

CASTILLO, M. A.; MOYA, P.; HERNANDEZ, E.; YUFERA, E. P. Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extracts. **Biological Control**, London, v.19, p.274-282, 2000.

D'ALMEIDA, J.M.; ALMEIDA, J.R. Longevidade e curva de sobrevivência de oito espécies de dípteros caliptrados (Calliphoridae, Muscidae e Sarcophagidae), em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v.56, p.497-505, 1996.

FENG, M. C.; POPRAWSKI, T. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. **Biocontrol of Scientific Technology**, Oxford, v.4, p.3-34, 1994.

FERRON, P. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (Fungi Imperfecti, Moniliales) in imagines of *Acanthoscelides obtectus*. **Entomophaga**, v.22, p. 393-396, 1977.

FRAZZON, A.P.G.; VAZ, I.S.; MASUDA, A.; VAINSTEIN, M.H. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.94, p.117-125, 2000.

FUXA, J. R. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.32, p.225-251, 1987.

GARCIA, M. V.; MONTEIRO, A. C.; SZABÓ, M. P. J. Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1513-1518, 2004.

GEDEN, C. J.; RUTZ, D. A.; STEINKRAUS, D. C. Virulence of different isolates and formulations of *Beauveria bassiana* for house flies and the parasitoid *Muscidifurax raptor*. **Biological Control**, London, v.5, p.615-621, 1995.

GREENBERG, B. **Flies and diseases**: ecology, classification and biotic associations. New Jersey: Princeton University, 1971. 856p.

GUIMARÃES, J. H. Considerações gerais sobre moscas do gênero *Chrysomya* no Brasil. **Agroquímica Ciba-Geigy**, São Paulo, v.24, p.8-12, 1984.

GUIMARÃES, J. H. Moscas sinantrópicas: perspectivas de manejo integrado em aviários no Estado de São Paulo. **Agroquímica Ciba-Geigy**, São Paulo, v.28, p.10-15, 1988.

JACKSON, M. A.; PAYNE, A. R.; ODELSON, D. A. Liquid-culture production of blastoporores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus* using portable fermentation equipment. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.31, p.149-154, 2004.

JACKSON, M. A.; MCGUIRE, M. R.; LACEY, L. A. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycological Research**, Cambridge, v.101, n.1, p.35-41, 1997.

KURAMOTO, H.; SHIMAZU, M. Pathogenicity of some entomogenous fungi of the adult house fly. **Journal of Japanese Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v.36, p.202-203, 1992.

LIU, N.; YUE, X. Insecticide resistance and cross-resistance in the house fly (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.93, n.4, p.1269-75, 2000.

MARICONI, F. A. M.; GUIMARÃES, J.H; BERTI FILHO, E. **A mosca doméstica**. Piracicaba: FEALQ, 1999.

MENDES, J.; LINHARES, A. X. Atratividade por iscas, sazonalidade e desenvolvimento ovariano em várias espécies de Muscidae (Diptera). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v.37, p.289-97, 1993.

MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C.; DE BORTOLI, S. A.; DORIA, H. O. S.; BARBOSA, J. C. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in soil with different pesticides. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.35, n.3, p.382-389, 2006.

MONTEIRO, A. C.; FIORIN, A. C.; CORREIA, A. DO C. B. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Matsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.29, p.109-112, 1998.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. São Paulo: Editora Atheneu, 2000.

PAIÃO, J. C. V. ; MONTEIRO, A. C. ; KRONKA, S. N. Susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (ACARI:IXODIDAE) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v.17, p.245-251, 2001.

PARALUPPI, N. D.; CASTELLÓN, E. G. Calliphoridae (Diptera) em Manaus, Amazonas. II. Padrão de atividade de vôo em cinco espécies. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v.10, p.665-672, 1993.

PRETTE, N.; MONTEIRO, A. C.; GARCIA, M. V.; SOARES, V. E. Patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.855-861, 2005.

REINECKE, P.; ANDERSCH, W.; STENZEL, K.; HARTWING, J. BIO 1020, a new microbial insecticide for use in horticultural crops. **Brighton Crop Protection Conference—Pests and Diseases**, England, p.49-54, 1990.

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. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v.123, p.309-314, 1999.

SILVA, G. S.; COSTA, A. J.; ROCHA, U. F.; SOARES, V. E.; MENDES, J.; YOSHIDA, L. The efficacy of 25% diflubenzuron fed to poultry to control synanthropic flies in the dung. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.9, p.119-123, 2000.

SMITH, K. E.; WALL, R.; FRENCH, N.P. The use of entomopathogenic fungi for the control of parasitic mites, *Psoroptes* spp. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.92, p.97-105, 2000.

SMITH, L.; RUTZ, D. A. Relationship of microhabitat to incidence of house fly (Diptera: Muscidae) imatures and their parasitoids at dairy farms in central New York. **Environmental entomology**, Lanham, v.20, n.2, p.669-674, 1991.

STEINKRAUS, D. C.; GEDEN, C. J.; RUTZ, D. A.; KRAMER, J. P. First report of the natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v.27, p. 309-312, 1990.

WATSON, D. W.; PETERSEN, J. J. Seasonal activity of *Entomophthoras muscae* (Zygomycetes: entomophthorales) in *Musca domestica* L. (diptera: muscidae) with reference to temperature of relative humidity. **Biological Control**, London, v.3, p.182-190, 1993.

CAPÍTULO 2 – EFICIÊNCIA DE *Metarhizium anisopliae* NO CONTROLE DA MOSCA VAREJEIRA *Chrysomya putoria*

RESUMO - Este estudo avaliou a eficiência dos isolados E 9 e IBCB 425 de *Metarhizium anisopliae*, para o controle das diferentes fases do desenvolvimento da mosca sinantrópica varejeira *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). As suspensões dos isolados foram testadas nas concentrações de 1×10^6 e 1×10^8 conídios/mL, nos estágios de ovo, larva (L2), pupa e adulto de *C. putoria*. Grupos de 30 ovos, 20 larvas e 20 pupas foram banhados em suspensões de conídios, sendo a mortalidade avaliada diariamente, considerando-se as respectivas fases subseqüentes do ciclo da mosca, até o 20º dia da fase adulta. No ensaio com adultos, grupos de 30 moscas foram pulverizados com 1 mL das suspensões de conídios, mantidos em gaiolas para avaliação diária da mortalidade, durante 20 dias. Larvas, pupas e adultos mortos foram acondicionados em câmaras úmidas para observação de extrusão do patógeno. Os isolados E 9 e IBCB 425 promoveram um aumento significativo ($P < 0,05$) no tempo médio de empupação e tempo médio de vida da pupa, respectivamente quando aplicados na concentração de 1×10^8 conídios/mL na fase de ovo. Ambos os isolados causaram 100% de mortalidade no tratamento de larvas (L2), submetidas às concentrações de 1×10^6 e 1×10^8 conídios/mL. Nos ensaios com pupas e adultos, verificou-se significativa mortalidade ($P < 0,05$) após a administração de inóculos com 1×10^8 conídios/mL dos isolados IBCB 425 e E 9. Os resultados indicam que o isolado E9 de *M. anisopliae*, na concentração de 10^8 conídios/mL, é patogênico para as fases de larva, pupa e adulto de *C. putoria*, apresentando perspectivas promissoras para o uso em programas de controle biológico da mosca.

Palavras-chave: Controle biológico, controle microbiano, fungo entomopatogênico, avicultura de postura, mosca sinantrópica.

CHAPTER 2- EFFICIENCY OF *Metarhizium anisopliae* IN THE CONTROL OF BLOWFLY *Chrysomya putoria*

ABSTRACT - This study evaluated the efficiency of the isolates E 9 and IBCB 425 of *Metarhizium anisopliae* applied to the different development stages of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae), a kind of synantropic blowfly. The fungi suspensions were tested in the concentrations of 1×10^6 and 1×10^8 conidia/ml, on egg's stage, larval L2, pupae and adult of *C. putoria*. Groups of 30 eggs, 20 larvae and 20 pupae were bathed in conidia suspension, being mortality daily evaluated, and considered the respective subsequent stages of the fly cycle, until the 20th day of the adult stage. For the adults, groups of 30 flies were pulverized with 1ml of the conidia suspensions and maintained for 20 days in cages for daily mortality examination. Deceased larvae, pupa and adults were transferred to humid cameras to verify the pathogen extrusion. The isolates E 9 and IBCB 425 promoted a significant increase ($P < 0,05$) in the average time of the pupa's process and pupa's average life time, respectively, when submitted to 1×10^8 conidia/ml on egg stage. Both isolates caused 100% of the mortality on larvae L2 treatment with 1×10^6 and 1×10^8 conidia/ml. In the assays with pupa and adults, it was observed significant mortality ($P < 0,05$), after to be challenged with 1×10^8 conidia/ml of IBCB 425 and E 9 isolates. The results indicated that the isolate E 9 of *M. anisopliae*, in the concentration of 10^8 conidia/ml, is pathogenic to larva, pupa and adults stages of *C. putoria*, showing satisfactory potential for biological control of this blowfly.

Key words: Biological control, microbial control, entomopathogenic fungus, poultry, synantropic fly.

1. INTRODUÇÃO

A alta densidade de aves adotada em granjas causa grande acúmulo de esterco, excelente substrato para a proliferação de moscas. Dentre os principais calíforídeos que ocorrem nesse meio, está a mosca varejeira *Chrysomya putoria*, podendo causar diversos danos aos aviários, deixando manchas nos equipamentos da granja, as quais podem causar redução na intensidade de iluminação (BICHO et al., 2004). Estes insetos podem ainda veicular patógenos, principalmente quando pousam em ovos recém-colocados, pois por meio do seu corpo, trato digestivo ou até mesmo das suas fezes, podem ser transmissoras de diversos microrganismos tanto para o homem como para as aves (AXTELL & ARENDS, 1990).

O uso indiscriminado de inseticidas químicos para controle destes dípteros nas granjas propicia a seleção de biótipos resistentes aos produtos (SCOTT et al., 2000), aumenta os riscos de poluição ambiental e aparecimento de resíduos químicos nos ovos e carnes das aves, além de possibilitar o desequilíbrio na população de outros artrópodes inimigos naturais das moscas (BRUNO et al., 1993).

Os fungos entomopatogênicos são responsáveis por 80% das doenças causadas em insetos e possui a vantagem de ter uma grande variabilidade genética, o que evita possíveis problemas de resistência de pragas a este patógeno (ALVES, 1998).

Entre os entomopatógenos, *Metarhizium anisopliae* Metsh. (Sorokin) tem se destacado como um importante agente de controle microbiano (ALVES, 1998), sua aplicação apresenta significativo potencial profilático, tendo em vista que este microrganismo exerce atividade patogênica para uma grande variedade de artrópodes (DIMBI et al., 2003; BASSO et al., 2005; MOCHI et al., 2006; BRIGGS et al., 2006; CABRAL et al., 2007).

A infecção de insetos adultos pelo *M. anisopliae*, ocorre por penetração pela cutícula, por uma combinação entre a barreira físico-química e a degradação enzimática (HAJEK e ST. LEGER, 1994). Com um mecanismo de infecção especializado, alguns fungos podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros (MCCOY e MILANI-TIGANO, 1992).

Na literatura existem vários trabalhos envolvendo a atividade do fungo *M. anisopliae* no controle de moscas sinantrópicas como a *Musca domestica* (WATSON et al., 1996; CRESPO et al., 1998), a *Stomoxys calcitrans* (WATSON et al., 1995) e a *Haemathobia irritans* (ANGEL-SAHAGÚN et al., 2005). Entretanto há carência de estudos envolvendo moscas do gênero *Chrysomya*.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a patogenicidade de *M. anisopliae*, em condições laboratoriais, nas concentrações de 1×10^6 e 1×10^8 conídios/mL, para os estágios de ovo, larva L2, pupa e adulto de *Chrysomya putoria*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fungos

Foram utilizados os isolados IBCB 425 e E 9 de *M. anisopliae*, pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da FCAV/Unesp. Os isolados foram mantidos em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio BDA (batata, dextrose e ágar) inclinado, estocados a 4°C. Para utilização nos ensaios foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA, acondicionadas em estufa a $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$, durante 15 dias, com ausência de iluminação. A viabilidade dos isolados, determinada pelo método descrito por MARQUES et al.(2004), nos ensaios de ovo, larva, pupa e adulto os resultados observados de viabilidade foram respectivamente, de: IBCB 425 (99, 98, 98, e 97%) e E 9 (100, 100, 100, 100%).

Para a produção dos inóculos, os esporos da parte superficial de colônias jovens do fungo foram transferidos para tubos contendo 20 mL de solução Tween 80® (0,1% v/v) esterilizada. Após vigorosa agitação em agitador elétrico de tubos, as suspensões foram padronizadas em 1×10^6 e 1×10^8 conídios/mL, com auxílio da câmara de Neubauer.

2.2 Obtenção e manutenção das colônias de *C. putoria*.

Amostras de excrementos contendo larvas de *C. putoria*, coletadas em aviários de galinhas de postura, pertencentes à FCAV/Unesp, foram acondicionadas em caixas isopor de 15 litros adaptados de BELO (1991) (Figura 1 do Apêndice) adaptadas para implantação e manutenção da colônia utilizada durante os bioensaios com os diferentes estágios de desenvolvimento da mosca.

Os adultos provenientes dessas larvas foram confinados nas caixas de isopor e para sua manutenção utilizou-se uma mistura de leite em pó e açúcar (1:1) e água destilada oferecida *ad libitum* em algodão saturado. A ovipostura foi estimulada oferecendo carne bovina *in natura*. Em seguida, os ovos foram transportados para copos plásticos (60 mm de diâmetro x 70 mm de altura) vedados com tecido *voile* e contendo uma dieta artificial composta de farelo de trigo (18%), farelo de milho (17%), farelo de soja (51%), farelo de arroz (14%) e água em quantidade suficiente para proporcionar consistência pastosa. Após a eclosão, as larvas permaneceram nos mesmos recipientes até atingirem o terceiro ínstar, quando foram colocadas nas caixas de manutenção de moscas para a empupação e emergência de adultos, todos mantidos à temperatura ambiente. A cada 30 dias novas larvas da mosca eram colhidas no ambiente natural e introduzidas na colônia para minimizar o efeito endogâmico.

2.3 Patogenicidade dos fungos para ovos de *C. putoria*

Grupos de 30 ovos com até quatro horas de idade, foram banhados por 30 segundos com as suspensões de conídios obtidas como já descrito e os grupos controle foram banhados apenas no veículo da suspensão. Em seguida, foram colocados sobre papel de filtro esterilizado o qual foi depositado sobre 5 g de carne bovina moída e em processo inicial de decomposição que serviu de dieta para as larvas eclodidas (Figura 2 do Apêndice). Esta preparação foi acondicionada em recipiente de plástico (30 mm de diâmetro x 50 mm de altura) interligado a outro idêntico por um

orifício no intuito de oferecer um ambiente mais seco para a empupação. Os recipientes foram vedados com malha fina de nylon e acondicionados em câmaras úmidas (Figura 3 do Apêndice) à $27 \pm 0,5$ °C, umidade relativa do ar entre 60 e 70% e fotoperíodo de 14 horas.

A avaliação de eclosão foi realizada a partir de 12 horas após a inoculação do fungo. No estágio larval, os imagos foram inspecionados diariamente para verificação da empupação e as pupas formadas foram separadas e acondicionadas em placas de Petri com algodão umedecido. As moscas adultas emergidas foram transferidas para caixas de isopor (2 litros), adaptadas de acordo com BELO (1991) (Figura 4 do apêndice), mantidas à temperatura ambiente, oferecendo, *ad libitum*, dieta composta por uma mistura de leite em pó e açúcar refinado (1:1), e água em algodão saturado, durante o período de 20 dias, para avaliação diária da longevidade. A extrusão do patógeno em pupas e adultos foi observada como um dado complementar para verificação da atividade patogênica.

2.4 Patogenicidade dos fungos para larvas L2 de *C. putoria*

Grupos de 20 larvas (L2), com 72 horas de idade, foram imersos durante 30 segundos nas suspensões de conídios ou veículo das suspensões (controle), como descrito anteriormente, e em seguida, mantidos em dois recipientes de plástico. Para evitar a remoção de conídios do tegumento, as larvas foram deixadas por 24 horas nos recipientes de plástico e em seguida foram alimentadas com a dieta artificial usada para manutenção de larvas, autoclavada, oferecida na forma de sachês (Figura 5 do apêndice). A montagem, finalidade e manutenção dos recipientes plásticos foram realizadas conforme descrito no ensaio anterior.

A inspeção das larvas foi efetuada diariamente por 30 dias para verificação da mortalidade e empupação. As pupas foram transferidas para caixas de isopor (2 litros) adaptadas conforme descrito por BELO (1991) (Figura 4 do apêndice), para observação da emergência e do tempo de vida dos adultos. Larvas, pupas e adultos mortos foram

transferidos para câmaras úmidas mantidas a 27°C para verificação da extrusão do patógeno (Figura 6 do apêndice).

2.5 Patogenicidade dos fungos para pupas de *C. putoria*

Grupos de 20 pupas com um a dois dias de idade, com quatro repetições, foram imersos durante 30 segundos nos veículos ou nas suspensões de conídios já referidas e mantidos à temperatura ambiente, em caixas de isopor, como descrito no item 2.3, ensaio com ovos. As caixas foram inspecionadas diariamente para observação de emergência e mortalidade de adultos, durante 20 dias após o 3º dia de incubação, ocasião em que ocorreu a primeira emergência. As pupas que não geraram adultos até o quinto dia após o tratamento, foram consideradas mortas. Pupas e adultos mortos foram transferidos para câmaras úmidas mantidas a 27°C para verificação da extrusão do patógeno.

2.6 Patogenicidade dos fungos para adultos de *C. putoria*

Grupos de 30 moscas adultas, com um a cinco dias de idade, foram separados em recipientes de plástico, cobertos com tecido *voile* e mantidos a temperatura de 0°C até a completa imobilização das moscas. Com auxílio de um pequeno aspersor manual, foram pulverizados com 1 mL das suspensões de conídios e mantidos em temperatura ambiente, sendo oferecido água em algodão saturado. Os grupos controles foram pulverizados apenas com o veículo das suspensões. Após 12 horas, as moscas foram transferidas e mantidas durante 20 dias em caixas de isopor, como anteriormente descrito, para avaliação diária da longevidade dos adultos (Figura 7 do apêndice). Os adultos mortos foram transferidos para câmaras úmidas mantidas a 27°C para verificação da extrusão do patógeno (Figura 6 do apêndice).

2.7 Análise estatística

Todos os ensaios foram conduzidos com quatro repetições. Para análise dos dados utilizou-se o programa SAS, versão 8.2 (SAS, 1999). Inicialmente, todas as variáveis foram estudadas de maneira descritiva, pelo cálculo da média, desvio padrão e mediana. Em seguida os valores percentuais de mortalidade foram transformados em Arco seno = $\left[\left(\sqrt{\%mortalidade/100} \right) \times 180 \right] / \pi$, e o tempo médio de vida (TMV) foi calculado pela média ponderada da mortalidade e o tempo em dias $TMV = \sum(\text{dias} \times \text{sobreviventes}) / \sum \text{sobreviventes}$. Todas as médias dos dados foram analisadas em um delineamento inteiramente casualizado (ANOVA) e as comparações múltiplas foram aferidas pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Patogenicidade para ovos de *C. putoria*

A aplicação dos isolados de IBCB 425 e E 9 de *M. anisopliae* em ovos de *C. putoria* não apresentou efeito significativo ($P > 0,05$) sobre o percentual de eclosão (Tabela 1). O tempo médio de eclosão de larvas de *C. putoria* ocorreu a partir de 12 horas da ovipostura. Em ensaios de viabilidade, a germinação dos isolados IBCB 425 e E 9, após 12 horas de incubação, foi de 78 e 75%, respectivamente. Como os conídios foram inoculados nos ovos quatro horas após a postura, provavelmente a eclosão das larvas ocorreu antes da germinação e penetração do fungo no ovo, o que justifica a baixa atividade patogênica para este estágio de desenvolvimento da *C. putoria*. A eficiência do controle biológico depende do sincronismo na relação parasito-hospedeiro, fato não observado na fase de ovo do ciclo da mosca. Desta forma, os resultados observados sugerem que os isolados IBCB 425 e E 9 de *M. anisopliae* não apresentam potencial patogênico para ovos de *C. putoria*, contrariamente às observações de

ANGEL-SAHAGÚN et al. (2005) que verificaram, após tratar os ovos de *Haematobia irritans* com inóculos contendo 10^6 conídios/mL, redução significativa na porcentagem de emergência de adultos em quatro de 11 isolados de *M. anisopliae* estudados.

TABELA 1 - Valores médios e análise de variância para a eclosão, mortalidade larval, tempo médio de empupação, tempo médio de vida das pupas e emergência de adultos de *Chrysomya putoria* após tratamento de ovos com suspensões de conídios dos isolados de *Metarhizium anisopliae*.

Tratamento ^a	Eclosão (%)	Mortalidade larval	TME ^b (dias)	TMVP ^c (dias)	Emergência (%)
IBCB 425 10^6	90,84 ± 5,0 ^A	1,50 ± 1,3 ^A	7,26 ± 0,3 ^{AB}	3,83 ± 0,1 ^{AB}	94,98 ± 4,0 ^A
IBCB 425 10^8	95,83 ± 3,2 ^A	1,00 ± 1,4 ^A	7,60 ± 0,5 ^A	3,87 ± 0,3 ^{AB}	93,54 ± 7,5 ^A
E9 10^6	87,50 ± 3,2 ^A	1,00 ± 2,0 ^A	7,38 ± 0,4 ^{AB}	3,83 ± 0,1 ^{AB}	98,15 ± 3,7 ^A
E9 10^8	95,00 ± 3,3 ^A	2,25 ± 1,0 ^A	7,12 ± 0,1 ^{AB}	3,90 ± 0,1 ^A	99,07 ± 1,9 ^A
Controle^d	87,50 ± 5,0 ^A	2,00 ± 1,8 ^A	6,82 ± 0,1 ^B	3,58 ± 0,1 ^B	96,83 ± 4,0 ^A
Valor de F	2,44 ^{NS}	0,71 ^{NS}	4,39*	1,59 ^{NS}	0,75 ^{NS}
Pr>F ^e	0,0918	0,5996	0,0151	0,2272	0,5750
C.V. (%) ^f	8,09	97,76	3,84	7,46	14,04
DMS (Tukey) ^g	15,67	5,76	0,61	0,63	28,56

Médias seguidas por pelo menos por uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). NS não significativo; *significativo a 5% de probabilidade.

^a isolado, seguido da concentração de conídios/mL usada.

^b TME: Tempo médio de empupação;

^c TMVP: Tempo médio de vida das pupas.

^d Tratamento controle: Solução de Tween 80 a 0,1%.

^e Pr>F: Probabilidade de significância associada ao valor de F

^f C.V.: Coeficiente de variação

^g DMS: Diferença mínima significativa.

CASTILLO et al. (2000) descreveram a atividade patogênica de cepas deste fungo sobre a fertilidade de ovos de *Ceratitis capitata*, observando redução significativa de 40 a 50% no percentual de eclosão após tratamento de fêmeas adultas com inóculos de 10^6 conídios do isolado CECT 2952 de *M. anisopliae*. No presente estudo não houve aumento significativo ($P>0,05$) na mortalidade de larvas de *C. putoria* provenientes dos ovos tratados com inóculos de 10^6 e 10^8 conídios/mL de ambos os isolados (Tabela 1). Porém, se observa aumento no tempo médio de empupação das larvas quando

comparadas ao grupo controle, sendo estatisticamente significativo ($P < 0,05$) apenas para os ovos tratados com 10^8 conídios do isolado IBCB 425 de *M. anisopliae*.

Na análise do tempo médio de vida da pupa, o isolado E 9 na concentração de 10^8 conídios/mL apresentou aumento significativo (Tabela 1), corroborando a ausência da atividade do fungo para esta fase do ciclo biológico da mosca, pois o fungo não afetou a emergência de adultos após o tratamento dos ovos com as suspensões, sendo confirmada pela completa ausência da extrusão do patógeno observado em pupas e adultos mortos, reafirmando a pequena atividade patogênica do fungo para ovos de *C. putoria*.

3.2 Patogenicidade para larvas L2 de *C. putoria*

No bioensaio realizado com larvas (L2), avaliou-se o efeito patogênico dos tratamentos fúngicos por meio do estudo do tempo médio de vida das larvas de *C. putoria*. Verificou-se redução significativa ($P < 0,01$) do tempo médio de vida das larvas e total nos tratamentos com os isolados E 9 e IBCB 425 de *M. anisopliae* nas duas concentrações de conídios testadas quando comparadas ao controle (Tabela 2), apresentando 100% de mortalidade nesta fase do ciclo, confirmada pela presença de extrusão do fungo em larvas mortas (Figura 1). Tal fato evidencia que estes isolados apresentam acentuada atividade patogênica para larvas de *C. putoria*. Como consequência, não se observou atividade patogênica residual para pupas e adultos.

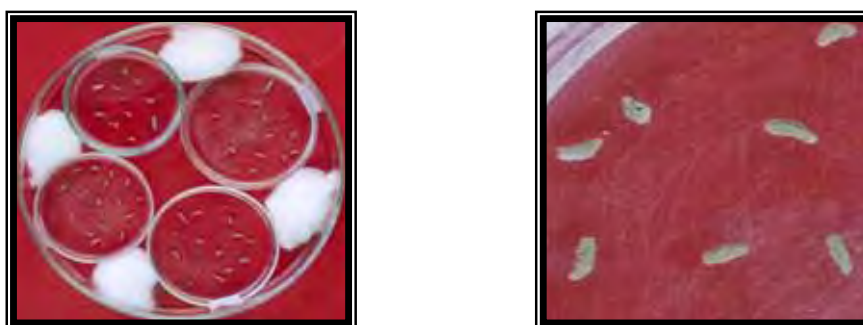


Figura 1. Larvas mortas de *Chrysomya putoria* apresentando extrusão de *Metarhizium anisopliae*.

Analisando graficamente a sobrevivência larval observou-se que as larvas de *C. putoria* tratadas com os isolados E 9 e IBCB 425 de *M. anisopliae*, apresentaram 100% de mortalidade no 8° e 9° dias, respectivamente, após tratamento com a concentração de 10^8 conídios/mL. No entanto, o efeito da concentração de conídios ficou menos evidente visto que o isolado E 9 aplicado na concentração de 10^6 conídios/mL, também promoveu 100% de mortalidade de larvas no 8° dia após tratamento (Figura 2).

TABELA 2 - Valores médios e análise de variância do tempo médio de vida em dias de larvas L2 de *Chrysomya putoria*, após tratamento com suspensões de conídios dos isolados de *Metarhizium anisopliae*, avaliadas diariamente até 15 dias após tratamento.

Tratamento ^a	Tempo médio de vida (dias)	
	Larva	Total
IBCB 425 10^6	3,07 ± 0,1 ^B	3,07 ± 0,1 ^B
IBCB 425 10^8	3,00 ± 0,1 ^B	3,00 ± 0,1 ^B
E9 10^6	3,44 ± 0,2 ^B	3,44 ± 0,2 ^B
E9 10^8	2,96 ± 0,1 ^B	2,96 ± 0,1 ^B
Controle^d	5,62 ± 0,7 ^A	8,42 ± 0,7 ^A
Valor de F	47,49 ^{**}	199,29 ^{**}
Pr>F ^c	<0,0001	<0,0001
C.V. (%) ^d	9,10	8,07
DMS (Tukey) ^e	0,72	0,74

Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). **Significativo a 1% de probabilidade.

^a Isolado e concentração de conídios/mL.

^b Tratamento controle: Solução de Tween 80 a 0,1%.

^c Pr>F: Probabilidade de significância associada ao valor de F

^d CV: Coeficiente de variação

^e DMS: Diferença mínima significativa.

Tais achados estão em concordância com o descrito por BARSON et al. (1994) que constataram significativa redução na porcentagem de emergência de adultos de mosca doméstica após tratar larvas de terceiro ínstar com o isolado 27585 de *M. anisopliae* na concentração de 10^6 conídios/mL, quando comparado ao tratamento com 10^4 conídios/mL. No entanto, o resultado do tratamento com 10^6 conídios/mL não diferiu

do obtido na concentração de 10^8 conídios/mL, achado congruente com o verificado neste trabalho para as concentrações de 10^6 e 10^8 conídio/mL do isolado E 9.

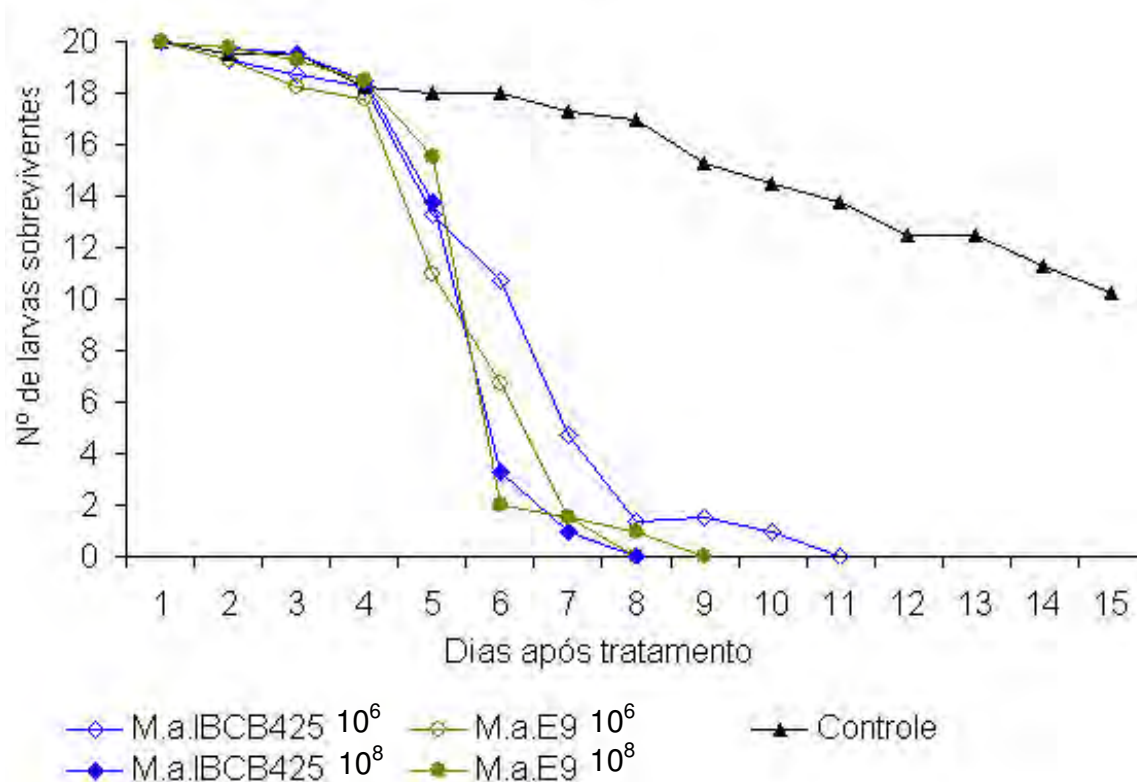


Figura 2: Sobrevivência das larvas de *Chrysomya putoria* tratadas com suspensões de conídios dos isolados IBCB 425 e E 9 de *Metarhizium anisopliae*, nas concentrações de 10^6 e 10^8 conídios/mL e controle, nos primeiros 15 dias após o tratamento.

Recentemente, BERNARDI et al. (2006) e MOCHI et al. (2006) relataram aumento significativo na mortalidade de pupas de *M. domestica* e na emergência de adultos de *Ceratitis capitata*, respectivamente, após tratarem larvas destes dípteros com inóculos maiores que 10^6 conídios/mL dos isolados CG 34 e E 9 de *M. anisopliae*, respectivamente.

Os dados observados neste estudo confirmam a patogenicidade do fungo *M. anisopliae* pelos isolados IBCB 425 e E 9 para larvas de segundo instar de *C. putoria* quando aplicado na concentração de 10^6 e 10^8 conídios/mL.

3.3 Patogenicidade para pupas de *C. putoria*

Para o estudo da atividade patogênica dos isolados durante a fase pupal de *C. putoria* foram analisados a emergência de adultos, o tempo médio de vida dos adultos e mortalidade total. Pela análise da emergência de adultos, não foi observado efeito significativo ($p>0,05$) (Tabela 3), Tal resultado é, provavelmente, conseqüências de características físico-químicas específicas da pupa dos artrópodes, que favorecem sua defesa contra a ação lesiva de patógenos. BIDOCHKA e KHACHATOURIANS (1992) verificaram que proteínas cuticulares influenciaram diretamente na germinação e crescimento de *B. bassiana* em *Melanoplus sanguinipes*, enquanto MARMARA et al. (1993) mostraram que proteínas presentes na cutícula de *C. capitata* foram responsáveis pelo reconhecimento e eliminação de bactérias infectantes.

TABELA 3 - Valores médios e análise de variância da emergência de adultos, tempo médio de vida de adultos e mortalidade total obtidas de pupas de *C. putoria* tratadas com suspensões de conídios de isolados de *Metarhizium anisopliae*. Avaliação conduzida até 20 dias após o início da emergência de adultos.

Tratamento ^a	Emergência (%) ^b	TMV ^c	Mortalidade total
IBCB 425 10⁶	11,50 ± 2,38 ^A	10,30 ± 0,17 ^A	10,00 ± 1,83 ^{CB}
IBCB 425 10⁸	9,25 ± 2,50 ^A	10,22 ± 0,26 ^A	12,00 ± 2,00 ^{AB}
E 9 10⁶	12,00 ± 2,45 ^A	10,40 ± 0,09 ^A	8,75 ± 2,06 ^{CB}
E 9 10⁸	10,00 ± 1,83 ^A	9,39 ± 0,73 ^B	14,25 ± 1,71 ^A
Controle^d	13,50 ± 0,58 ^A	10,36 ± 0,16 ^A	7,50 ± 1,00 ^C
Valor de F	2,61 ^{NS}	5,23 ^{**}	9,23 ^{**}
Pr>F ^e	0,0779	0,0077	0,0006
C.V. (%) ^f	18,47	3,62	16,77
DMS (Tukey) ^g	4,54	0,80	3,84

Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). NS não significativo; **significativo a 1% de probabilidade.

^a Isolado e concentração de conídios/mL.

^b Média das porcentagens dos valores observados transformados em arco seno;

^c TMV: Tempo médio de vida dos adultos (em dias).

^d Tratamento controle: Solução de Tween 80 a 0,1%.

^e Pr>F: Probabilidade de significância associada ao valor de F

^f CV: Coeficiente de variação

^g DMS: Diferença mínima significativa.

A análise do tempo médio de vida dos adultos que emergiram a partir das pupas tratadas, mostrou que somente o tratamento com o isolado E 9 de *M. anisopliae*, na concentração de 10^8 conídios/mL, reduziu significativamente ($P<0,01$) a sobrevivência das moscas, quando comparado ao controle. Na avaliação da mortalidade total de pupas de *C. putoria*, se observou aumento significativo ($P<0,01$) na mortalidade dos grupos banhados com suspensões dos isolados IBCB 425 e E 9 de *M. anisopliae*, na concentração de 10^8 conídios/mL (Tabela 3). Resultados similares aos descritos por ANGEL-SAHAGUN (2005), aplicando *M. anisopliae* em pupas de *H. irritans* com mortalidade de 50%.

Analizando graficamente a sobrevivência de moscas emergidas de pupas tratadas com as suspensões de conídios de IBCB 425 e E 9 de *M. anisopliae* se observou acentuada mortalidade de adultos emergidos (Figura 3).

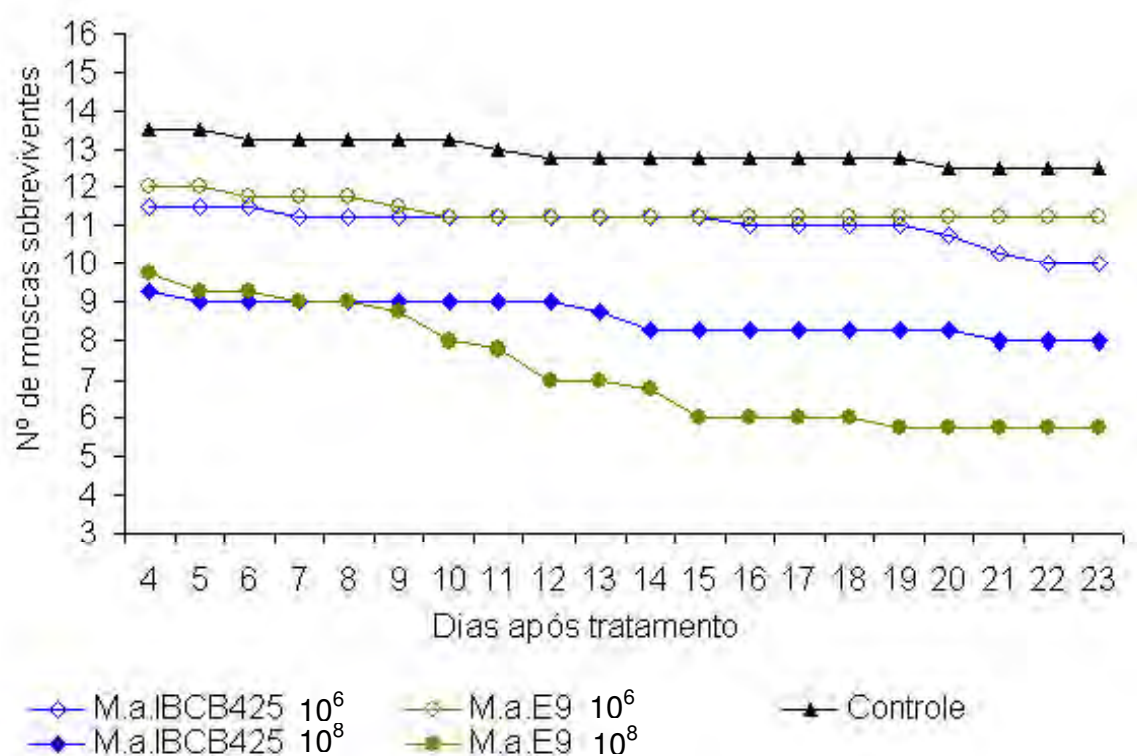


Figura 3: Sobrevivência de adultos de *Chrysomya putoria* emergidos de pupas tratadas com suspensões de conídios dos isolados IBCB 425 e E 9 de *M. anisopliae*, nas concentrações de 10^6 e 10^8 conídios/mL e controle, até o 23º dia após tratamento.

Outro aspecto importante a ser considerado é a redução na sobrevivência de adultos provocada pelo aumento da concentração dos inóculos, sendo mais evidente a atividade dose-resposta para o isolado E 9 de *M. anisopliae* (Figura 3). A redução na longevidade dos adultos emergidos de pupas tratadas com isolado IBCB 425 e E 9 de *M. anisopliae* é importante para o controle de *C. putoria*, diminuindo a duração da fase reprodutiva da mosca, como em estudos com adultos de *C. capitata*, que apresentaram menor longevidade após o tratamento das pupas com diferentes isolados de *M. anisopliae* (BISOLLI, 2004).

Os resultados obtidos no bioensaio com pupas de *C. putoria* demonstraram a atividade patogênica do *M. anisopliae*, confirmada pela presença de extrusão do patógeno em pupas (Figura 4) e adultos, causando aumento da mortalidade de adultos na aplicação dos isolados IBCB 425 e E 9 na concentração de 10^8 conídios/mL, sendo mais evidente pelo isolado E 9, promovendo diminuição no tempo médio de vida das moscas provenientes de pupas tratadas com suspensões de 10^8 conídios/mL.



Figura 4: Pupa de *Crysomya putoria* morta apresentando extrusão do isolado E9 de *Metarhizium anisopliae*.

3.4 Patogenicidade para adultos de *C. putoria*

Na análise comparativa da atividade patogênica dos isolados aplicados diretamente sobre adultos de *C. putoria*, se observou resultados significativos ($P < 0,01$) na redução do tempo médio de vida e no aumento da mortalidade das moscas tratadas com suspensões de 10^8 conídios/mL de *M. anisopliae* (Tabela 4).

TABELA 4 - Valores médios e análise de variância do tempo médio de vida de adultos e mortalidade total obtidas de adultos de *Chrysomya putoria* tratados com suspensões de conídios de isolados de *Metarhizium anisopliae*. Avaliação conduzida até 20 dias após o início da emergência de adultos.

Tratamentos ^a	TMV ^b	Mortalidade (%) ^c
IBCB 425 10^6	9,75 ± 0,17 ^A	39,71 ± 1,87 ^{BC}
IBCB 425 10^8	7,58 ± 0,47 ^B	64,16 ± 3,50 ^A
E9 10^6	9,56 ± 0,13 ^A	42,60 ± 3,28 ^B
E9 10^8	7,70 ± 0,10 ^B	61,70 ± 1,16 ^A
Controle ^d	9,86 ± 0,41 ^A	32,89 ± 8,29 ^C
Valor de F	58,94**	40,17**
Pr>F ^e	<0,0001	<0,0001
C.V. (%) ^f	3,36	9,11
DMS (Tukey) ^g	0,65	9,59

Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). **Significativo a 1% de probabilidade;

^a Isolado e concentração de conídios/mL.

^b TMV: Tempo médio de vida dos adultos (em dias).

^c Media das porcentagens dos valores observados transformados em arco seno;

^d Tratamento controle: Solução de Tween 80 a 0,1%.

^e Pr>F: Probabilidade de significância associada ao valor de F

^f CV: Coeficiente de variação

^g DMS: Diferença mínima significativa.

Adultos de *C. putoria* tratados com suspensões 10^8 conídios/mL dos isolados IBCB 425 e E9 de *M. anisopliae* apresentaram percentuais de mortalidade de 64,16 e 61,70 respectivamente, durante o período de 20 dias, sendo cerca de 50% maiores do

que os valores observados no controle (Tabela 4). Tais achados estão em concordância com os descritos por WRIGHT et al. (2004) que verificaram mortalidade de 64% de adultos da varejeira *Lucilia sericata* após o tratamento com suspensões de 10^7 conídios/mL de *M. anisopliae*, e por LOHMEEYER & MILLER (2006), pelas mortalidades de 43,5 e 73% após tratamento de adultos de *H. irritans* com elevada concentração de conídios (10^9 conídios/g). ANGEL-SAHAGÚN et al. (2005), avaliando a patogenicidade do *M. anisopliae* em adultos de *H. irritans*, com suspensões de 10^8 conídios/mL, obtiveram de 50 a 100% de mortalidade em 8 dos 11 isolados testados.

O efeito dose-resposta para estes isolados ficou evidente nesta análise, pois os adultos tratados com suspensões de 10^6 conídios/mL apresentaram mortalidades estatisticamente similares ao grupo controle (Tabela 4). Esse efeito foi descrito em outros estudos com dípteros por BARSON et al. (1994) e BERNARDI et al. (2006) que mostraram o efeito dose-resposta para a ação patogênica de isolados de *M. anisopliae* no controle de adultos de mosca doméstica, e em *C. capitata* por CASTILLO et al. (2000).

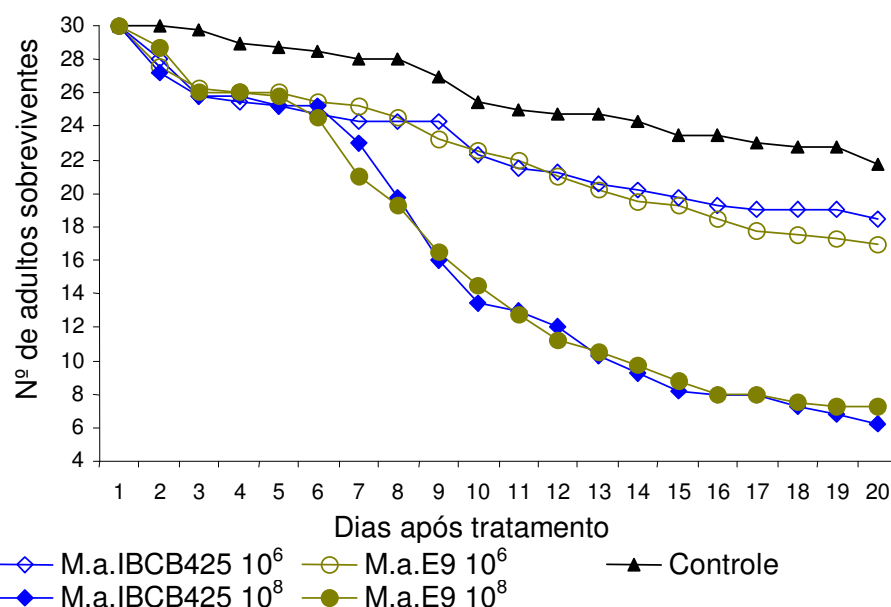


Figura 5: Sobrevivência de adultos de *Chrysomya putoria* pulverizados com suspensões de conídios dos isolados IBCB 425 e E 9 de *Metarhizium anisopliae*, nas concentrações de 10^6 e 10^8 conídios/mL e controle, até o 20º dia após tratamento.

mortalidade das moscas a partir do sexto e 14º dias, respectivamente após o tratamento com os isolados de *M. anisopliae* (Figura 5) na concentração de 10^8 conídios/mL.

Neste contexto, podemos afirmar que adultos de *C. putoria* são susceptíveis aos isolados E 9 e IBCB 425 de *M. anisopliae*, sendo mais eficiente na concentração de 10^8 conídios/mL, dados confirmados pelas observações de extrusão do fungo nos exemplares mortos deste ensaio (Figura 6).



Figura 6. Adultos de *Chrysomya putoria* mortos pelo fungo *Metarhizium anisopliae* exibindo a extrusão do patógeno.

Como *C. putoria* habitualmente se alimenta e reproduz em excretas de aves, uma das estratégias seria a pulverização de suspensão de conídios sobre os mesmos, o que possibilitaria a atuação direta sobre larvas e indireta sobre adultos. De acordo com WRIGHT et al. (2004), o contato do tarso de adultos de varejeira *L. sericata*, com inóculos de 10^7 conídios/mL de *M. anisopliae* resultou em 64% de infecções das moscas. É necessário estabelecer estratégias que permitam a utilização de *M. anisopliae* como alternativa aos tratamentos convencionais com pesticidas químicos, atualmente empregados no manejo sanitário de aviários de postura, mais estudos neste sentido devem ser conduzidos.

4. CONCLUSÕES

1. O fungo *M. anisopliae* é eficiente no controle de *C. putoria*.
2. A mosca *C. putoria* é mais susceptível ao fungo nas fases de larva e adulto.
3. Os isolados IBCB 425 e E9 são patogênicos para *C. putoria*, sendo mais efetivos quando aplicados na concentração de 10^8 conídios/mL.
4. O isolado E 9 de *M. anisopliae* na concentração de 10^8 conídios/mL. é indicado para o controle de *C. putoria*, foi capaz de agredir as fases de larvas, pupas e adultos.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos, In:_____. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FELQ, 1998. cap.11, p.289-381.

ANGEL-SAHAGÚN, C. A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; GALINDO-VELASCO, E.; LÓPEZ-EDWARDS, M.; REBOLLEDO-DOMINGUEZ, O.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; REYES-VELÁZQUEZ, W. P.; SKODA, S. R.; FOSTER, J. E. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). **Journal of Insect Science**, Wallingfort, v.5, n. 50, 2005.

AXTELL, R. C.; ARENDS, J. J. Ecology and management of arthropod pests of poultry. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.35, p.101-126, 1990.

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. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, v.64, p.107-113, 1994.

BASSO, L. M. S.; MONTEIRO, A. C.; BELO, M. A. A.; SOARES, V. E.; GARCIA, M. V.; MOCHI, D. A. Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, p.595-600, 2005.

BELO, M. Frequência estacional de moscas emergidas em fezes de galinhas poedeiras. **Boletim de Ciência Agronômica**, Jaboticabal, v.6, n.1, p.21-24, 1991.

BERNARDI, E.; PINTO, D. M.; NASCIMENTO, J. S.; RIBEIRO, P. B.; SILVA, C. I. Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre o desenvolvimento de *Musca domestica* L. (Díptera: Muscidae) em laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.127-129, 2006.

BICHO, C. L.; ALMEIDA, L. M.; RIBEIRO, P. B.; SILVEIRA JÚNIOR, P. Flutuação de díptera em granja avícola, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Serie Zoologia**, Porto Alegre, v.4, n.2, p.205-210, 2004.

BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. C. Growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on cuticular components from the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, v.59, p.165-173, 1992.

BISSOLLI, G. **Patogenicidade e virulência de fungos entomopatogênicos para larvas e pupas da mosca-das-frutas *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)**. 2004. 50f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

BRIGGS, L. L.; COLWELL, D. D.; WALL, R. Control of the cattle louse *Bovicola bovis* with the fungal pathogen *Metarhizium anisopliae*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.142, p.344-349, 2006.

BRUNO, T. V.; GUIMARÃES, J. H.; SANTOS, A. M. M.; TUCCI, E. C. Moscas sinantrópicas (Díptera) e seus predadores que se criam em esterco de aves poedeiras confinadas, no estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v.37, n.3, p.577-590, 1993.

CABRAL, M. M. O.; MENDONÇA, P. M.; GOMES, C. M. S.; BARBOSA FILHO, J.M.; QUEIROZ, M. M. C.; MELLO, R. P. Biological activity of neolignans on the post-embryonic development of *Chrysomya megacephala*. **Fitoterapia**, Milan, v.78, p.20-24, 2007.

CASTILLO, M. A.; MOYA, P.; HERNANDEZ, E.; YUFERA, E. P. Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to Entomopathogenic Fungi and Their Extracts. **Biological Control**, London, v.19, p.274-282, 2000.

CRESPO, D. C.; LECUONA, R. E.; HOGSETTE, J. A. Biological Control: An Important Component in Integrated anagement of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in Caged-Layer Poultry Houses in Buenos Aires, Argentina. **Biological Control**, London, v.13, p.16-24, 1998.

DIMBI, S.; MANIANIA, N.K.; LUX, S.A.; EKESI, S.; MUEKE, J.K. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera: Tephritidae). **Mycopathologia**, Netherlands, v.156, p. 375-382, 2003.

HAJEK, A.E.; ST. LEGER, R.J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v. 39, p. 293-322, 1994.

LOHMEYER, K.H.; MILLER, J.A. Pathogenicity of three formulations of entomopathogenic fungi for control of adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae).

Biological and Microbial Control, Raleigh, v.99, n.6, p. 1943-1947, 2006.

MARMARAS, V. J.; BOURNAZOS, S. N.; KATSORIS, P. G.; LAMBROPOULOU, M. Defense mechanisms in insect: certain integumental proteins and tyrosinase are responsible for nonself-recognition na immobilization of *Escherichia coli* in the cuticle of developing *Ceratitis capitata*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v.23, p.169-180, 1993.

MCCOY, C.W.; TIGANO-MILANI, M.S. Use of entomopathogenic fungi in biological control: a world view. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, p. 87-93, 1992.

MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34,n.6, p.1675-1680, 2004.

MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C.; De BORTOLI, S. A.; DORIA, H. O. S.; BARBOSA, J. C. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in soil with different pesticides. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.35, n.3, p.382-389, 2006.

SAS Institute Inc. **SAS/STAT user's Guide Version 8**, Cary, 1999.

SCOTT, J. G.; ALEFANTIS, T. G.; KAUFMAN, P. E.; RUTZ, D. A. Insecticide resistance in house flies from caged-layer poultry facilities. **Pest Management Science**, Sussex, v.56, p.1-7, 2000.

WATSON, D. W.; GEDEN, C. J.; LONG, S. J.; RUTZ, D. A. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). **Biological Control**, London, v.5, p.405-411, 1995.

WATSON, D. W.; RUTZ, D. A.; LONG, S. J. *Beauveria bassiana* Bedding for management of the House Fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in Calf Hutches. **Biological Control**, London, v.7, p.221-227, 1996.

WRIGHT, C.; BROOKS, A.; WALL, R. Toxicity of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to adult females of the blowfly *Lucilla sericata* (Diptera: Calliphoridae). **Pest Management Science**, Sussex, v.60, p.639-644, 2004.

CAPÍTULO 3 - SUSCEPTIBILIDADE DE *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) A AÇÃO PATOGÊNICA DE *Beauveria bassiana*.

RESUMO - O presente estudo investigou, em condições de laboratório, a atividade patogênica dos isolados JAB 07 e AM 9 de *Beauveria bassiana*, aplicados nas concentrações de 1×10^6 e 1×10^8 conídios/mL, nos estágios de ovo, larva L2, pupa e adulto de *Chrysomya putoria*. Nos bioensaios, grupos com 30 ovos, 20 pupas e 20 larvas, foram banhados em suspensões de conídios e no ensaio com adultos, foram pulverizados grupos de 30 moscas com 1 mL das mesmas suspensões. Em todos os ensaios, utilizaram-se quatro repetições por tratamento e o grupo controle tratado com o veículo das suspensões. O tratamento dos ovos com os isolados de *B. bassiana* apenas apresentaram efeito sobre o aumento do tempo médio de vida das pupas quando aplicados nas concentrações de 10^6 e 10^8 conídios/mL. Os isolados de *B. bassiana*, aplicados nas duas concentrações promoveram significativa mortalidade ($P < 0,05$) quando aplicados em larvas de *C. putoria*. O tratamento de pupas com o isolado JAB 07 de *B. bassiana*, na concentração de 10^6 e 10^8 conídios/mL, reduziu significativamente ($P < 0,05$) a emergência de adultos. O efeito dose-resposta foi melhor evidenciado no ensaio com adultos, pois os isolados de *B. bassiana* diminuíram a sobrevivência somente quando aplicados na concentração de 10^8 conídios/mL. Ambos os isolados foram eficientes no controle de *C. putoria*, porém o isolado JAB 07 se destacou por atuar na maioria das fases de vida do ciclo da mosca.

Palavras-chave: Controle biológico, controle microbiano, fungo entomopatogênico, mosca varejeira, avicultura de postura.

CHAPTER 3 - SUSCEPTIBILITY OF *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) TO THE PATHOGENIC ACTION OF THE FUNGUS *Beauveria bassiana*.

ABSTRACT - The present study investigated, in laboratory conditions, the pathogenic action of the isolates JAB 07 and AM 9 of *Beauveria bassiana*, applied in the concentrations of 1×10^6 and 1×10^8 conidia/mL, in the stages of egg, L2 larvae, pupae and adult of *Chrysomya putoria*. In the bioassays, groups with 30 eggs, 20 pupae and 20 L2 larvae were bathed with conidia suspensions. For adults, groups of 30 flies were pulverized with 1mL of the same suspensions. All bioassays were performed using four replicates per treatment and the control groups were treated with solution tween. Eggs treatment with *B. bassiana* showed an effect in the average pupa's life time when submitted to 10^6 and 10^8 conidia/mL. The *B. bassiana* isolates applied in both concentrations promoted significant ($P < 0,05$) mortality in *C. putoria* larvae treatment. The pupae bioassay with the isolate JAB 07 of *B. bassiana*, in the concentration of 10^6 and 10^8 conidia/mL, reduced significantly ($P < 0,05$) the adult emergence. The dose-response effect was more evident in the adult study, because the isolates of *B. bassiana* decreased the survival only when applied in the concentration of 10^8 conidia/mL. Both of the isolates were efficient on the control of *C. putoria*, although JAB 07 isolate demonstrated better results by acting in most stages of the fly's cycle.

Key words: Biological control, microbial control, entomopathogenic fungus, blowfly, poultry.

1. INTRODUÇÃO

No confinamento de animais domésticos, especialmente em aviários de postura, existe uma produção significativa de esterco, que atua como substrato para o desenvolvimento de inúmeras espécies de artrópodes, principalmente moscas sinantrópicas. Dentre os dípteros sinantrópicos, destacam-se as moscas do gênero *Chrysomya*, causando prejuízos econômicos diretos e indiretos para o avicultor, pois os ovos são freqüentemente contaminados por estes dípteros (AXTELL, 1999), além de constituírem uma ameaça à saúde pública, pois veiculam agentes etiológicos de enfermidades como enteroviroses, enterobacterioses, oocistos de protozoários e ovos de helmintos (CABRAL et al., 2007). As espécies de *Chrysomya* apresentam grande capacidade de adaptação a diferentes tipos de ambientes e notável habilidade competitiva, capaz de deslocar espécies nativas (MARCHIORI et.al., 2000).

Atualmente a alternativa de controle mais utilizada em aviários são os inseticidas químicos, resultando em vários efeitos negativos ao ambiente. A mídia, a facilidade de aquisição, e também os efeitos obtidos, quase que imediatos, colaboraram para a utilização indiscriminada e descontrolada de tais produtos, gerando desequilíbrio, pois o complexo biótico da natureza pode ser alterado, afetando plantas, animais e o próprio homem.

O uso de fungos entomopatogênicos como bioinseticidas já vem sendo praticado a alguns anos a partir de populações naturais e melhoradas (ALVES, 1998). Estes microorganismos ocorrem naturalmente em mais de 300 espécies de insetos, em seus vários estágios de desenvolvimento, ocupando um lugar relevante na manutenção do equilíbrio ecológico. De acordo com ALVES (1998), os fungos entomopatogênicos englobam cerca de 90 gêneros e 700 espécies, estando *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* entre os mais comumente utilizados no controle de pragas.

Na literatura encontram-se vários trabalhos sobre a atividade do fungo *B. bassiana* em diversas espécies de dípteros como mosca-branca, *Bemisia argentifolii* (WRIGHT et al., 1998), *Ceratitis capitata* (KONSTANTOPOULOU e MAZOMENOS, 2005; DIMBI et al., 2003), *Haematobia irritans* (LOHMEYER e MILLER, 2006; ANGEL-

SAHAGÚN et al., 2005), *Cochliomya macellaria* (MACIEL et al., 2005), *Stomoxys calcitrans* (WATSON et al., 1995), sendo *Musca domestica* a mais estudada (LECUONA et al., 2005; WATSON et al., 1996; SIRI et al., 2005; BERNARDI et al., 2006). Em um estudo de campo, KAUFMAN et al. (2005) verificaram que a aplicação de *B. bassiana* resultou em controle mais eficaz de moscas de aviário quando comparado ao tratamento com inseticida à base de piretróides.

Neste contexto, evidenciando a necessidade de estudos alternativos de controle e o grande potencial do fungo entomopatogênico *B. bassiana* como um possível agente controlador de diversas espécies de moscas, o presente estudo investigou, em condições de laboratório, a patogenicidade dos isolados JAB 07 e AM 9 do fungo *B. bassiana*, aplicado nas concentrações de 1×10^6 e 1×10^8 conídios/mL, nos estágios de ovo, larva (L2), pupa e adulto de *C. putoria*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fungo

Foram utilizados os isolados AM 9 e JAB 07 de *B. bassiana*, pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da FCAV/Unesp. Os isolados foram mantidos em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio BDA (batata, dextrose e ágar) inclinado, estocados a 4°C. Para utilização nos ensaios foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA, acondicionadas em estufa a $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$, durante 15 dias, com ausência de iluminação. A viabilidade dos isolados foram conduzidos seguindo metodologia descrita por MARQUES et al.(2004). Nos ensaios de ovo, larva, pupa e adulto os resultados observados de viabilidade foram respectivamente, de: AM 09 (98, 95, 90 e 95%), JAB 07 (98, 94, 98 e 98%).

Para a produção dos inóculos, os esporos da parte superficial de colônias jovens do fungo foram transferidos, para tubos contendo 20 mL de solução Tween 80[®] (0,1% v/v) esterilizada. Após vigorosa agitação em agitador elétrico de tubos, as suspensões

foram padronizadas em 1×10^6 e 1×10^8 conídios/mL, com auxílio da câmara de Neubauer.

2.2 Obtenção e manutenção das colônias de *C. putoria*.

Amostras de excrementos contendo larvas de *C. putoria*, coletadas em aviários de galinhas de postura, pertencentes a FCAV/Unesp, foram acondicionadas em caixas de isopor de 15 litros (BELO, 1991) (Figura 1 do apêndice) adaptadas para implantação e manutenção da colônia utilizada durante os bioensaios com os diferentes estágios de desenvolvimento da mosca.

Os adultos provenientes dessas larvas foram confinados nas caixas de isopor e para sua manutenção utilizou-se uma mistura de leite em pó e açúcar (1:1) e água destilada oferecida *ad libitum* em algodão saturado. A ovipostura foi estimulada oferecendo carne bovina *in natura*. Em seguida, os ovos foram transportados para copos de plástico (60 mm de diâmetro x 70 mm de altura) vedados com tecido *voile* e contendo uma dieta artificial composta de farelo de trigo (18%), farelo de milho (17%), farelo de soja (51%), farelo de arroz (14%) e água em quantidade suficiente para proporcionar consistência pastosa. Após a eclosão, as larvas permaneceram nos mesmos recipientes até atingirem o terceiro ínstar, quando foram colocadas nas caixas de manutenção de moscas para a empupação e emergência de adultos, todos mantidos à temperatura ambiente. A cada 30 dias novas larvas da mosca foram coletadas no ambiente natural e introduzidas na colônia para minimizar o efeito endogâmico.

2.3 Patogenicidade dos fungos para ovos de *C. putoria*

Grupos de 30 ovos com até quatro horas de idade, foram banhados com as suspensões de conídios obtidas como já descrito e os grupos controle foram banhados apenas no veículo da suspensão. Em seguida foram colocados sobre papel de filtro

esterilizado o qual foi depositado sobre 5 g de carne bovina moída e em processo inicial de decomposição que serviu de dieta para as larvas eclodidas (Figura 2 do apêndice). Esta preparação foi acondicionada em recipiente de plástico (30 mm de diâmetro x 50 mm de altura) interligado a outro idêntico por um orifício no intuito de oferecer um ambiente mais seco para a empupação. Os recipientes foram vedados com malha fina de nylon e acondicionados em câmaras úmidas (Figura 3 do apêndice) à $27 \pm 0,5$ °C, umidade relativa do ar entre 60 e 70% e fotoperíodo de 14 horas.

A avaliação de eclosão foi realizada a partir de 12 horas após a inoculação do fungo. No estágio larval, os imagos foram inspecionados diariamente para verificação da empupação e as pupas formadas foram separadas e acondicionadas em placas de Petri com algodão umedecido. As moscas adultas emergidas foram transferidas para caixas de isopor (2 litros) (Figura 4 do apêndice), adaptadas de acordo com BELO (1991), mantidas à temperatura ambiente, oferecendo, *ad libitum*, dieta composta por uma mistura de leite em pó e açúcar refinado (1:1), e água em algodão saturado, durante o período de 20 dias, para avaliação diária da longevidade. A extrusão do patógeno em pupas e adultos foi observada como um dado complementar para verificação da atividade patogênica.

2.4 Patogenicidade dos fungos para larvas L2 de *C. putoria*

Grupos de 20 larvas (L2), com 72 horas de idade, foram imersos durante 30 segundos nas suspensões de conídios ou veículo das suspensões (controle), como descrito anteriormente, e em seguida, mantidos em dois recipientes de plástico. Para evitar a remoção de conídios do tegumento, as larvas foram deixadas por 24 horas nos recipientes de plástico e em seguida foram alimentadas com a dieta artificial usada para manutenção de larvas, autoclavada, oferecida na forma de sachês (Figura 5 do apêndice). A montagem, finalidade e manutenção dos recipientes plásticos foram realizadas conforme descrito no ensaio anterior.

A inspeção das câmaras foi realizada diariamente por 30 dias para verificação da mortalidade de larvas e empupação. As pupas foram transferidas para caixas de isopor (2 litros) (Figura 4 do apêndice) adaptadas conforme descrito por BELO (1991), para observação da emergência e do tempo de vida dos adultos.

2.5 Patogenicidade dos fungos para pupas de *C. putoria*

Grupos de 20 pupas com um a dois dias de idade, com quatro repetições, foram imersos durante 30 segundos nos veículos ou nas suspensões de conídios já referidas e mantidos à temperatura ambiente, em caixas de isopor, como descrito no ensaio com ovos (Figura 4 do apêndice). As caixas foram inspecionadas diariamente para observação de emergência e mortalidade de adultos, durante 20 dias após o 3º dia de incubação, ocasião em que ocorreu a primeira emergência. As pupas que não geraram adultos até o quinto dia após o tratamento, foram consideradas mortas. Pupas e adultos mortos foram transferidos para câmaras úmidas mantidas a 27°C para verificação da extrusão do patógeno (Figura 6 do apêndice).

2.6 Patogenicidade dos fungos para adultos de *C. putoria*

Grupos de 30 moscas adultas, com um a cinco dias de idade, foram separados em recipientes de plástico, cobertos com tecido *voile* e mantidos a temperatura de 0°C até a completa imobilização das moscas. Com auxílio de um pequeno aspersor manual, foram pulverizados com 1 mL das suspensões de conídios e mantidos em temperatura ambiente, sendo oferecido água em algodão saturado. Os grupos controles foram pulverizados apenas com o veículo das suspensões. Após 12 horas, as moscas foram transferidas e mantidas durante 20 dias em caixas de isopor, como anteriormente descrito, para avaliação diária da longevidade dos adultos (Figura 7 do apêndice). Os

adultos mortos foram transferidos para câmaras úmidas mantidas a 27°C para verificação da extrusão do patógeno (Figura 6 do apêndice).

2.7 Análise estatística

Para análise dos dados utilizou-se o programa SAS, versão 8.2 (SAS, 1999). Inicialmente, todas as variáveis foram estudadas de maneira descritiva, pelo cálculo da média, desvio padrão e mediana. Em seguida os valores percentuais de mortalidade foram transformados em Arco seno = $\left[\left(\sqrt{\%mortalidade/100} \right) \times 180 \right] / \pi$, e o tempo médio de vida (TMV) foi calculado pela média ponderada da mortalidade e o tempo em dias $TMV = \sum(\text{dias} \times \text{sobreviventes}) / \sum \text{sobreviventes}$. Todas as médias dos dados foram analisadas em um delineamento inteiramente casualizado (ANOVA) e as comparações múltiplas foram aferidas pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Patogenicidade para ovos de *C. putoria*

A aplicação dos isolados AM 09 e JAB 07 de *B. bassiana* em ovos de *C. putoria* não apresentaram efeito significativo ($P > 0,05$) sobre o percentual de eclosão (Tabela 1). O tempo médio de eclosão de larvas de *C. putoria* foi de 12 horas, e a germinação dos isolados AM 09 e JAB 07, após 12 horas de incubação, foi de 45 e 61%, respectivamente (dados não mostrados). Devido ao tempo necessário para manipulação, os conídios foram inoculados em ovos obtidos até quatro horas após a postura. Provavelmente este fato possibilitou a eclosão das larvas ocorreu antes da germinação e penetração do fungo no ovo, o que justifica a baixa atividade patogênica para este estágio de *C. putoria*. Na relação parasito-hospedeiro, o sucesso de controle

biológico resulta da efetiva interação entre os ciclos biológicos de ambas as espécies, o que não ocorreu nesta fase do ciclo da mosca.

TABELA 1 - Valores médios e análise de variância para a eclosão, mortalidade larval, tempo médio de empupação, tempo médio de vida das pupas e emergência de adultos de *Chrysomya putoria* após tratamento de ovos com suspensões de conídios dos isolados de *Beauveria bassiana*.

Tratamento ^a	Eclosão (%)	Mortalidade larval	TME ^b (dias)	TMVP ^c (dias)	Emergência (%)
AM 09, 10⁶	94,17 ± 5,7 ^A	5,75 ± 7,5 ^A	7,11 ± 0,1 ^A	3,92 ± 0,1 ^{BC}	99,00 ± 1,9 ^A
AM 09, 10⁸	93,33 ± 8,2 ^A	0,50 ± 1,0 ^A	7,14 ± 0,3 ^A	3,78 ± 0,1 ^C	99,00 ± 2,0 ^A
JAB 07, 10⁶	80,84 ± 21,0 ^A	4,00 ± 3,7 ^A	7,25 ± 0,2 ^A	3,79 ± 0,1 ^B	94,50 ± 6,3 ^A
JAB 07, 10⁸	85,00 ± 8,8 ^A	1,75 ± 1,7 ^A	7,28 ± 0,3 ^A	3,81 ± 0,2 ^{BC}	94,25 ± 8,4 ^A
Controle^d	87,50 ± 5,0 ^A	2,00 ± 1,8 ^A	6,82 ± 0,1 ^A	3,58 ± 0,1 ^A	97,00 ± 4,0 ^A
Valor de F	0,99 ^{NS}	1,11 ^{NS}	2,70 ^{NS}	3,20 [*]	0,79 ^{NS}
Pr>F ^e	0,4434	0,3889	0,0709	0,0435	0,5490
C.V. (%) ^f	12,85	140,61	3,14	3,69	5,39
DMS (Tukey) ^g	24,74	8,60	0,49	0,30	11,38

Médias seguidas por pelo menos por uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). NS não significativo; *significativo a 5% de probabilidade.

^a isolado, seguido da concentração de conídios/mL usada.

^b TME: Tempo médio de empupação;

^c TMVP: Tempo médio de vida das pupas.

^d Tratamento controle: Solução de Tween 80 a 0,1%.

^e Pr>F: Probabilidade de significância associada ao valor de F

^f C.V.: Coeficiente de variação

^g DMS: Diferença mínima significativa.

Os isolados AM 09 e JAB 07 de *B. bassiana* não foram patogênicos para ovos de *C. putoria* por apresentarem somente um aumento no tempo médio de vida das pupas, dentre todos os outros parâmetros avaliados de eclosão, mortalidade larval, tempo médio de empupação e emergência. Estes resultados são contrários aos obtidos por ANGEL-SAHAGÚN et al. (2005) que, após tratarem ovos de *Haematobia irritans* com inóculos contendo 10⁶ conídios/mL de 2 isolados de *B. bassiana*, verificaram redução significativa na porcentagem de emergência de adultos para apenas um dos isolados. Outro aspecto interessante constatado na análise do tratamento dos ovos referem-se a

completa ausência da extrusão do patógeno em pupas e adultos de *C. putoria*, confirmando a hipótese da baixa atividade patogênica do fungo nas condições experimentais deste bioensaio.

3.2 Patogenicidade para larvas L2 de *C. putoria*

No bioensaio realizado com larvas L2, avaliou-se o efeito patogênico dos tratamentos fúngicos por meio do estudo do tempo médio de vida de *C. putoria*, considerando-se as larvas de segundo instar e seus subseqüentes estágios de pupa e adultos. Verificou-se redução significativa ($P < 0,01$) do tempo médio de vida das larvas e total nos tratamentos com os isolados JAB 07 e AM 09 de *B. bassiana*, nas duas concentrações de conídios testadas, quando comparadas ao controle (Tabela 2). Tal fato evidencia que estes fungos apresentam acentuada atividade patogênica para larvas de *C. putoria*. Como consequência, não se observou atividade patogênica residual para pupas e adultos, com exceção do isolado AM 09 de *B. bassiana*, que, na concentração de 10^6 conídios/mL, reduziu ($P < 0,01$) o tempo médio de vida das pupas.



Figura 1 – Larvas de *Chrysomya putoria* morta pelo fungo *Beauveria bassiana* exibindo a extrusão do patógeno.

TABELA 2 - Valores médios e análise de variância do tempo médio de vida em dias de larvas, pupas e adultos oriundos de larvas L2 de *Chrysomya putoria*, após tratamento com suspensões de conídios dos isolados de *Beauveria bassiana*, avaliadas diariamente pelo período 30 dias.

Tratamento ^a	Tempo médio de vida (dias)		
	Larva	Pupa	Total
AM 09, 10⁶	3,00 ± 0,2 ^B	2,50 ± 5,0 ^B	3,42 ± 0,9 ^{BC}
AM 09, 10⁸	2,06 ± 0,1 ^C	—	2,18 ± 0,2 ^C
JAB 07, 10⁶	3,64 ± 0,6 ^B	—	3,64 ± 0,6 ^B
JAB 07, 10⁸	3,04 ± 0,3 ^B	—	3,04 ± 0,3 ^{BC}
Controle^b	5,62 ± 0,7 ^A	13,43 ± 1,2 ^A	8,42 ± 0,7 ^A
Valor de F	38,03**	18,04**	70,2**
Pr>F ^c	<0,0001	0,0054	<0,0001
C.V. (%) ^d	12,39	45,69	14,18
DMS (Tukey) ^e	0,94	6,30	1,28

Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). NS não significativo; **significativo a 1% de probabilidade; *significativo a 5% de probabilidade.

^a Isolado e concentração de conídios/mL.

^b Tratamento controle: Solução de Tween 80 a 0,1%.

^c Pr>F: Probabilidade de significância associada ao valor de F

^d CV: Coeficiente de variação

^e DMS: Diferença mínima significativa.

A atividade entomopatogênica desse fungo para o estágio larval de outras moscas sinantrópicas, também foram descritos por outros autores. WATSON et al. (1995) avaliaram o efeito do tratamento do estágio larval de *Musca domestica* com inóculos em meio líquido contendo diferentes concentrações de conídios, observando mortalidade de 56 e 48% das larvas tratadas com 10¹⁰ conídios/mL dos isolados L90 e P89 de *B. bassiana*, respectivamente. STEINKRAUS et al. (1990) relataram mortalidades de 52 a 73% em larvas de terceiro ínstar de *M. domestica* desafiadas com este fungo. Contudo em estudo recente, LECUONA et al. (2005), não observaram significativa mortalidade de larvas L3 de *M. domestica* tratadas com cinco isolados de *B. bassiana*. Segundo estes autores, o efeito contraditório observado nas suas análises pode ser consequência da diferença de virulência entre cepas.

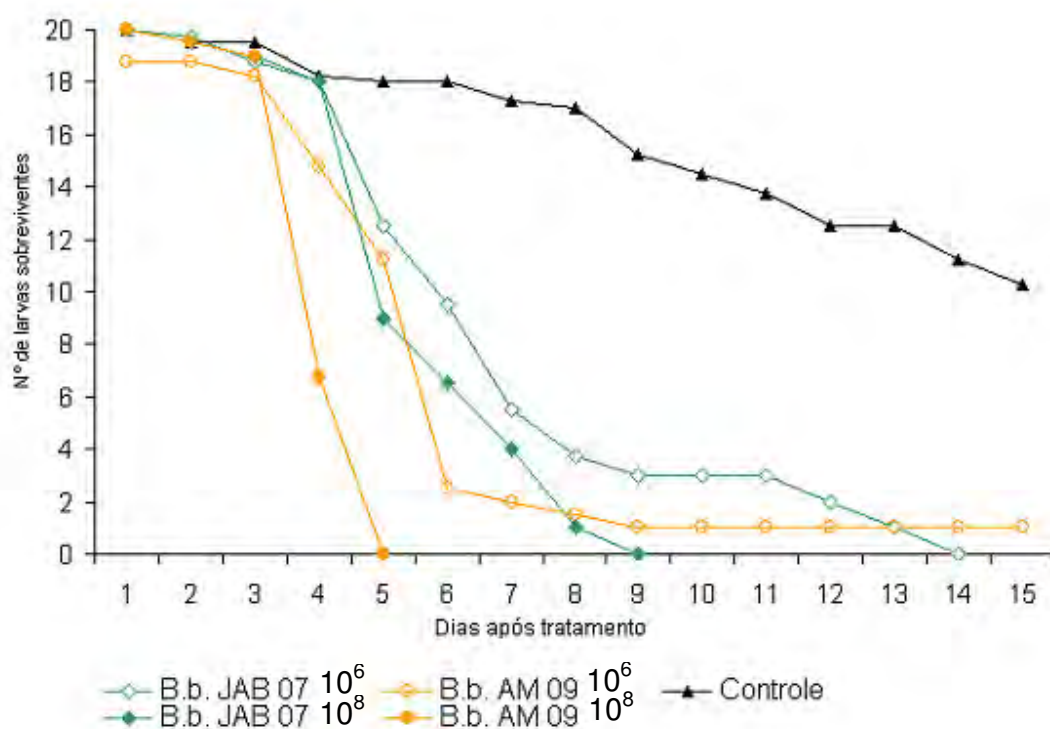


Figura 2: Sobrevivência das larvas de *Chrysomya putoria* tratadas com suspensões de conídios dos isolados AM 09 e JAB 07 de *Beauveria bassiana*, nas concentrações de 10^6 e 10^8 conídios/mL e controle, nos primeiros 15 dias após o tratamento

A análise do tempo médio de vida total das larvas tratadas com os isolados de *B. bassiana* não evidenciou efeito das concentrações de conídios usadas. Contudo, observando-se a Figura 2, verifica-se que os isolados AM 09 e JAB 07 promoveram 100% de mortalidade de larvas até o 5° e 9° dias, respectivamente, após o tratamento com 10^8 conídios/mL, sendo confirmado pela verificação da extrusão do patógeno nas larvas mortas (Figura 1). No entanto, igual efeito, somente foi obtido com a concentração de 10^6 conídios/mL, para o isolado JAB 07 a partir do 14° dia após tratamento, embora corroborem com os dados apresentados por BARSON, et al. (1994), apresentando 40% de mortalidade após 14 dias do tratamento larval de *M. domestica* com suspensões de 10^7 conídios/mL. Este fato sugere que maiores

concentrações de conídios possam promover maior mortalidade de larvas em menor tempo, efeito também observado por MACIEL et al. (2005) no aumento gradativo das fases pré-pupal e pupal após tratamento larvas de *C. macellaria* com inóculos de 10^5 até 10^8 conídio/mL.

3.3 Patogenicidade para pupas de *C. putoria*

Para o estudo da atividade patogênica dos diferentes isolados durante a fase pupal de *C. putoria* foram analisados a emergência de adultos, o tempo médio de vida dos adultos e mortalidade total. Apenas o isolado JAB 07 de *B. bassiana*, nas duas concentrações testadas, reduziu significativamente ($P < 0,01$) a emergência de adultos de *C. putoria* quando comparado ao controle (Tabela 3), mostrando-se mais efetivo na concentração de 10^8 conídios/mL, aumentando 50% a mortalidade quando comparados ao controle (Tabela 3), causando a extrusão do patógenos pelas pupas mortas (Figura 3), concordando com os relatos de ANGEL-SAHAGÚN et al. (2005) que observaram 44% de mortalidade, após tratamento de pupas de *H. irritans* com suspensões de 10^8 conídios/mL de *B. bassiana*.

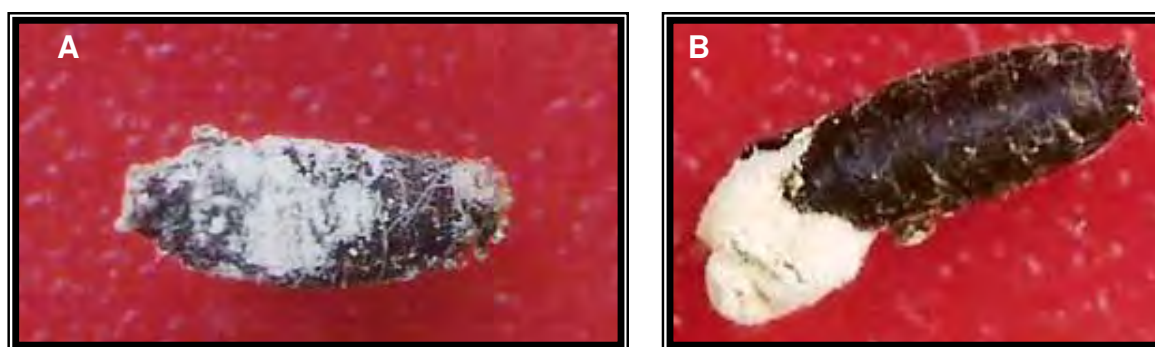


Figura 3 – Pupas de *Chrysomya putoria* morta pelo fungo *Beauveria bassiana*. **A**: Crescimento hifálico do patógeno sobre o cadáver da pupa; **B**: pupa exibindo a extrusão do patógeno na fase de conidiogênese.

Por outro lado, LEUCONA et al. (2005) e BERNARDI et al. (2006) observaram pequena ou nenhuma mortalidade de pupas de moscas domésticas após o tratamento com diferentes cepas de *B. bassiana*. Possivelmente, tais resultados sejam consequência de características físico-químicas específicas da pupa dos artrópodes, que favorecem sua defesa contra a ação lesiva de patógenos. BIDOCHKA & KHACHATOURIANS (1992) verificaram que proteínas cuticulares influenciaram diretamente na germinação e crescimento de *B. bassiana* em *Melanoplus sanquinipes*, enquanto MARMARAS et al. (1993) mostraram que proteínas presentes na cutícula de *C. capitata* foram responsáveis pelo reconhecimento e eliminação de bactérias infectantes. Para WATSON et al. (1995) estas características cuticulares podem ser a possível justificativa para a diferença de susceptibilidade apresentada por *M. domestica* e *S. calcitrans* quando tratadas com *B. bassiana*.

TABELA 3 - Valores médios e análise de variância da emergência de adultos, tempo médio de vida de adultos e mortalidade total obtidas de pupas de *Chrysomya putoria* tratadas com suspensões de conídios de isolados de *Beauveria bassiana*. Avaliação conduzida até 20 dias após o início da emergência de adultos.

Tratamento ^a	Emergência (%) ^b	TMV ^c	Mortalidade total
AM 09, 10⁶	13,50 ± 1,3 ^A	10,12 ± 0,2 ^A	9,50 ± 1,7 ^B
AM 09, 10⁸	13,00 ± 3,6 ^{AB}	9,89 ± 0,5 ^A	11,25 ± 4,1 ^{AB}
JAB 07, 10⁶	8,50 ± 2,9 ^{CB}	10,34 ± 0,3 ^A	12,50 ± 3,7 ^{AB}
JAB 07, 10⁸	5,50 ± 1,7 ^C	10,16 ± 0,4 ^A	15,50 ± 1,3 ^A
Controle^d	13,50 ± 0,6 ^A	10,36 ± 0,2 ^A	7,50 ± 1,0 ^B
Valor de F	10,15 ^{**}	1,31 ^{NS}	5,07 ^{**}
Pr>F ^e	0,0003	0,3108	0,0087
C.V. (%) ^f	21,11	3,29	23,93
DMS (Tukey) ^g	4,98	0,73	5,88

Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). NS não significativo; **significativo a 1% de probabilidade.

^a Isolado e concentração de conídios/mL.

^b Média das porcentagens dos valores observados transformados em arco seno;

^c TMV: Tempo médio de vida dos adultos (em dias).

^d Tratamento controle: Solução de Tween 80 a 0,1%.

^e Pr>F: Probabilidade de significância associada ao valor de F

^f CV: Coeficiente de variação

^g DMS: Diferença mínima significativa.

Na avaliação da mortalidade total de pupas de *C. putoria*, observou-se aumento significativo ($P < 0,01$) na mortalidade dos grupos banhados com suspensões dos isolados JAB 07 (10^8 conídios/mL) de *B. bassiana* (Tabela 3).

Analisando graficamente a sobrevivência de moscas emergidas de pupas tratadas com os diferentes fungos, se observa que no tratamento com o isolado JAB 07 de *B. bassiana* houve pequena emergência de adultos e, também pequena mortalidade nesta fase (Figura 4), pois a maior parte das mortes ocorreu na fase de pupa. Para o isolado AM 09 de *B. bassiana* se observou acentuada mortalidade de adultos emergidos (Figura 4).

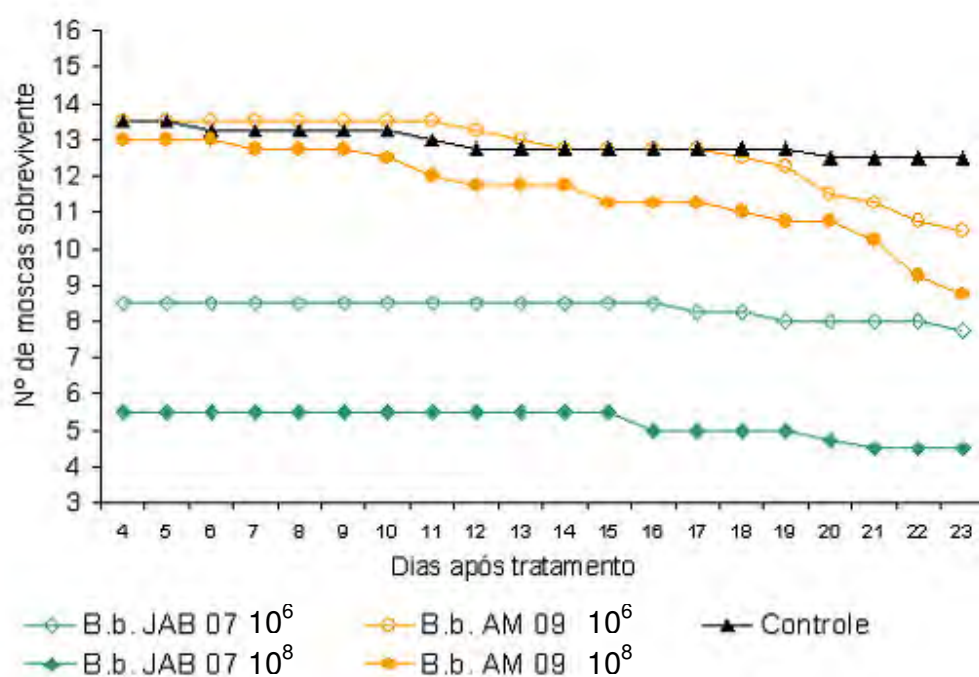


Figura 4: Sobrevivência de adultos de *Chrysomya putoria* emergidos de pupas tratadas com suspensões de conídios dos isolados AM 09 e JAB 07 de *Beauveria bassiana*, nas concentrações de 10^6 e 10^8 conídios/mL e controle, até o 23º dia após tratamento.

Outro aspecto importante a ser considerado é a redução na sobrevivência de adultos provocada pelo aumento da concentração dos inóculos, sendo mais evidente a

atividade dose-resposta para o isolado JAB 07 de *B. bassiana* (Figura 4), apesar da análise estatística não ter acusado diferença no tempo médio de vida das moscas tratadas com 10^6 ou 10^8 conídios/mL.

A redução na longevidade dos adultos emergidos de pupas tratadas é importante para o controle de *C. putoria*, diminuindo a duração da fase reprodutiva da mosca. Após inocularem pupas da mariposa *Phthorimaea operculella* com *B. bassiana*, HAFEZ et al. (1997) obtiveram significativo decréscimo na emergência e longevidade de adultos, e postura e viabilidade dos ovos. Adultos de *C. capitata* apresentaram menor longevidade após o tratamento das pupas com diferentes isolados de *M. anisopliae* (BISSOLLI, 2004).

Os resultados obtidos no bioensaio com pupas de *C. putoria* demonstraram maior atividade patogênica do isolado JAB 07 de *B. bassiana*, quando aplicado na concentração de 10^8 conídios/mL.

3.4 Patogenicidade para adultos de *C. putoria*

Na análise comparativa da atividade patogênica dos isolados de *B. bassiana* aplicados diretamente sobre adultos de *C. putoria*, observou-se resultados significativos ($P < 0,05$) na redução do tempo médio de vida (isolado JAB 07) e no aumento da mortalidade, em ambos os isolados, das moscas tratadas com suspensões de 10^8 conídios/mL, confirmado pela presença de extrusão do patógeno nos cadáveres das moscas (Figura 6). O efeito dose-resposta para estes isolados ficou evidente nesta análise, pois os adultos tratados com suspensões de 10^6 conídios/mL apresentaram mortalidades estatisticamente similares ao grupo controle (Tabela 4). Esses resultados estão congruentes com os obtidos por WATSON et al. (1995) e BERNARDI et al. (2006) que mostraram o efeito dose-resposta para a ação patogênica de isolados de *B. bassiana* no controle de adultos de moscas sinantrópicas.

Adultos de *C. putoria* tratados com suspensões 10^8 conídios/mL dos isolados AM 09 e JAB 07 de *B. bassiana* apresentaram percentuais de mortalidade de 59,9 e 60,6

respectivamente, durante o período de 20 dias, sendo cerca de 50% maiores do que os valores observados no controle (Tabela 4).

Tais achados estão em concordância com estudos de *M. domestica* os descritos por LECUONA et al. (2005) que verificaram mortalidade acima de 85% de adultos após o tratamento com suspensões de 10^8 conídios/mL de seis de um total de 19 isolatos *B. Bassiana* e por SIRI et al. (2005) com 94% de mortalidade após 14 dias do desafio com inóculos de 10^7 conídios/mL do mesmo fungo. Dados também observados com *H. irritans* relatados por ANGEL-SAHAGÚN et al. (2005) com mortalidades de 73,8 e 40% para dois isolados testados na concentração de 10^8 conídios/mL e LOHMEYER & MILLER (2006) com 98,4 e 100% de mortalidade no 4° e 7° dia respectivamente, após inoculação de *B. bassiana* à 10^8 conídios/mL.

TABELA 4 - Valores médios e análise de variância da emergência de adultos, tempo médio de vida de adultos e mortalidade total obtidas de adultos de *Chrysomya putoria* tratados com suspensões de conídios de isolados de *Beauveria bassiana*. Avaliação conduzida até 20 dias após o início da emergência de adultos.

Tratamentos ^a	TMV ^b	Mortalidade (%) ^c
AM 09, 10^6	9,43 ± 0,4 ^{AB}	43,99 ± 11,2 ^{AB}
AM 09, 10^8	8,69 ± 0,2 ^{AB}	59,92 ± 11,0 ^A
JAB 07, 10^6	9,61 ± 0,2 ^{AB}	39,67 ± 5,1 ^{AB}
JAB 07, 10^8	8,41 ± 1,1 ^B	60,58 ± 19,7 ^A
Controle^d	9,86 ± 0,4 ^A	32,89 ± 8,3 ^B
Valor de F	4,79*	4,2*
Pr>F ^e	0,0109	0,0177
C.V. (%) ^f	6,16	25,47
DMS (Tukey) ^g	1,24	26,37

Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). NS não significativo; *significativo a 5% de probabilidade.

^a Isolado e concentração de conídios/mL.

^b TMV: Tempo médio de vida dos adultos (em dias).

^c Media das porcentagens dos valores observados transformados em arco seno;

^d Tratamento controle: Solução de Tween 80 a 0,1%.

^e Pr>F: Probabilidade de significância associada ao valor de F

^f CV: Coeficiente de variação

^g DMS: Diferença mínima significativa.

Pela visualização gráfica da sobrevivência de adultos de *C. putoria* durante o período de 20 dias, verificou-se acentuada mortalidade das moscas a partir do 14º dia, após o tratamento com os isolados de *B. bassiana* (Figura 5), na concentração de 10^8 conídios/mL, contrapondo-se ao estudo realizado por BARSON et al. (1994) que obteve 100% de mortalidade de moscas domésticas adultas, quatro a seis dias após o tratamento com suspensões aquosas de 10^5 conídios/mL de *B. bassiana*. A discrepância observada entre os resultados destes autores e os relatados neste estudo pode ser consequência de fatores como a susceptibilidade dos diferentes dípteros sinantrópicos e a patogenicidade das cepas utilizadas, dentre outros.

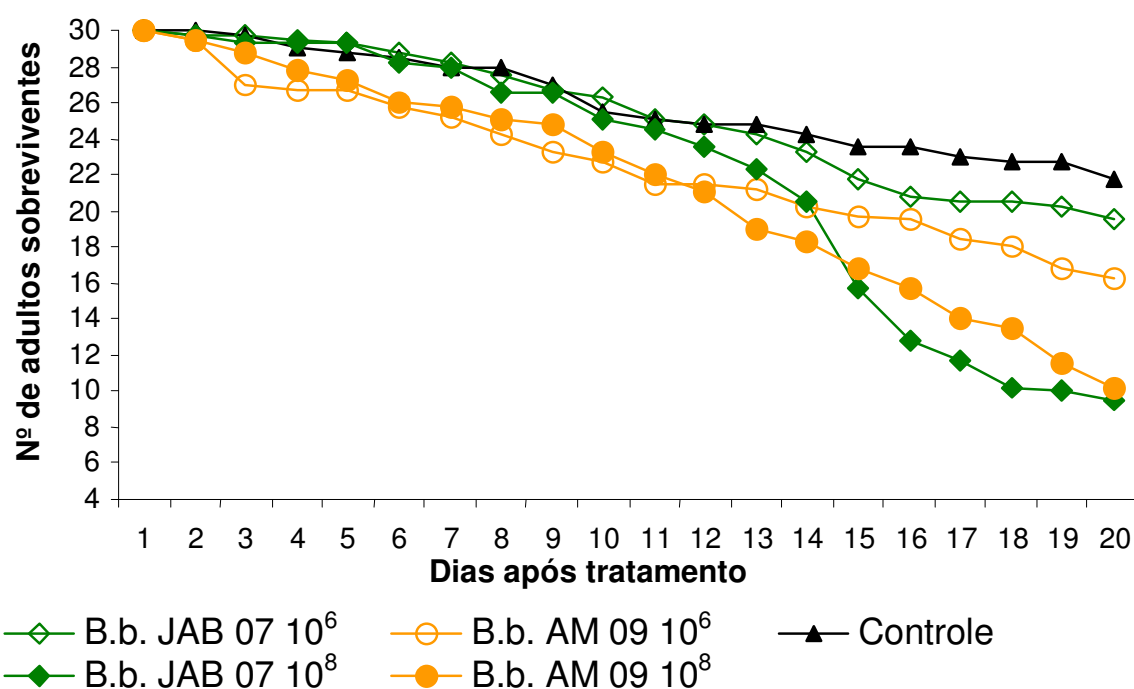


Figura 5: Sobrevivência de adultos de *Chrysomya putoria* pulverizados com suspensões de conídios dos isolados AM 09 e JAB 07 de *Beauveria bassiana*, nas concentrações de 10^6 e 10^8 conídios/mL e controle, até o 20º dia após tratamento.



Figura 6 – Moscas adultas de *Chrysomya putoria* mortas pelo fungo *B. bassiana* exibindo a extrusão do patógeno.

4. CONCLUSÕES

1. O fungo *B. Bassiana* possui atividade patogênica para *C. putoria*.
2. A fase larval de *C. putoria* é mais susceptível a *B. Bassiana*.
3. Ambos os isolados de *B. Bassiana*, larvas e adultos de *C. putoria*, com destaque para o isolado JAB 07 de *B. bassiana* que também foi eficaz no controle de pupas.
4. O fungo apresenta maior atividade quando aplicado na concentração de 10^8 conídios/mL.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos, In:_____. **Controle Microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FELQ, 1998. cap.11, p.289-381.

ANGEL-SAHAGÚN, C. A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; GALINDO-VELASCO, E.; LÓPEZ-EDWARDS, M.; REBOLLEDO-DOMINGUEZ, O.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; REYES-VELÁZQUEZ, W. P.; SKODA, S. R.; FOSTER, J. E. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to

entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). **Journal of Insect Science**, Wallingfort, v.5, n. 50, 2005.

AXTEEL, R. C. Poultry integrated pest management: status and future. **Integrated Pest Management Reviews**, v.4, p.53-73, 1999.

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. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, v.64, p.107-113, 1994.

BELO, M. Frequência estacional de moscas emergidas em fezes de galinhas poedeiras. **Boletim de Ciência Agronômica**, Jaboticabal, v.6, n.1, p.21-24, 1991.

BERNARDI, E.; PINTO, D. M.; NASCIMENTO, J. S.; RIBEIRO, P. B.; SILVA, C. I. Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre o desenvolvimento de *Musca domestica* L. (Díptera: Muscidae) em laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.127-129. 2006.

BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. C. Growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on cuticular components from the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, v.59, p.165-173, 1992.

BISSOLLI, G. **Patogenicidade e virulência de fungos entomopatogênicos para larvas e pupas da mosca-das-frutas *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)**. 2004. 50f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

CABRAL, M. M. O.; MENDONÇA, P. M.; GOMES, C. M. S.; BARBOSA FILHO, J.M.; QUEIROZ, M. M. C.; MELLO, R. P. Biological activity of neolignans on the post-embryonic development of *Chrysomya megacephala*. **Fitoterapia**, Milan, v.78, p.20-24, 2007.

DIMBI, S.; MANIANIA, N.K.; LUX, S.A.; EKESI, S.; MUEKE, J.K. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera: Tephritidae). **Mycopathologia**, Dordrecht, v.156, p. 375-382, 2003.

GABRE, R. M.; ADHAM, F. K.; CHI, H. Life table of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). **Acta Oecologia**, Madrid, v.27, p.179-183, 2005.

HAFEZ, M.; ZAKI, F. N.; MOURSY, A.; SABBOUR, M. Biological effects of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Seller). **Journal of Pesticide Science**, Toshima-Ku, v.70, n.8, p.158-159, 1997.

KAUFMAN, P. E.; REASOR, C.; RUTZ, D. A.; KETZIZ, J. K.; ARENDS, J. J. Evolution of *Beauveria bassiana* applications against adult house fly, *Musca domestica*, in commercial caged-layer poultry facilities in New York state. **Biological Control**, London, v.33, p.360-367, 2005.

KONSTANTOPOULOU, M.A.; MAZOMENOS, B.E. Evolution of *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii* strains and four wild-type fungal species against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata*. **BioControl**, Dordrecht, v. 50, p. 293-305, 2005.

LECUONA, R. E.; TURICA, M.; TABOCCO, F.; CRESPO, D. C. Microbial Control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with selected Strains of *Beauveria bassiana*. **Journal Medical Entomology**, Lanham, v.42, n.3, p.332-336, 2005.

LOHMEYER, K.H; MILLER, J.A. Pathogenicity of three formulations of entomopathogenic fungi for control of adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, n.6, p. 1943-1947, 2006.

MARCHIORI, C.H.; VIEIRA, C.I.S; CALDAS, E.R; TEIXEIRA, F.F; SILVA, C.G; LINHARES, A.X. Dípteros muscóides associados com fezes bovinas e seus parasitóides em Goiás. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 4, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352000000400011&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 04 Jun. 2007.

MACIEL, M. V.; LIMA, E.A.L.A.; ALVES, N.D.; FEIJÓ, F.M.C. Ação de *Beauveria bassiana* no desenvolvimento pós-embrionário de *Cochliomya macellaria* (díptera: Calliphoridae) em laboratório. **Caatinga**, Mossoró, v. 18, n.1, p. 1-5, 2005.

MARMARAS, V. J.; BOURNAZOS, S. N.; KATSORIS, P. G.; LAMBROPOULOU, M. Defense mechanisms in insect: certain integumental proteins and tyrosinase are responsible for nonself-recognition na immobilization of *Escherichia coli* in the cuticle of developing *Ceratitis capitata*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v.23, p.169-180. 1993.

MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.6, p.1675-1680. 2004.

SAS Institute Inc., 1999. SAS/STAT user's Guide Version 8, First ed., vol. 1-3. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

SIRI, A.; SCORSETTI, A. C.; DIKGOLZ, V. E.; LOPEZ, C. C. Natural Infections caused by the fungus *Beauveria bassiana* as a pathogen of *Musca domestica* in the neotropic. **Biological Control**, London, v.50, p.937-940, 2005.

STEINKRAUS, D. C.; GEDEN, C. J.; RUTZ, D. A.; KRAMER, J. P. First report of the natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v.27, p.309-312. 1990.

WATSON, D. W.; GEDEN, C. J.; LONG, S. J.; RUTZ, D. A. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). **Biological Control**, London, v.5, p.405-411. 1995.

WATSON, D. W.; RUTZ, D. A.; LONG, S. J. *Beauveria bassiana* and sawdust bedding for the management of the house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in calf hutches. **Biological Control**, London, v.7, p. 221-227, 1996.

WRAIGHT, S.P.; CARRUTHERS, R.I., BRADLEY, C.A.; JARONSKI, S.T.; LACEY, L.A.; WOOD, P. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.71, p. 217-226 (1998).

CAPÍTULO 4 - PATOGENICIDADE DE *Paecilomyces fumosoroseus* PARA A MOSCA SINANTRÓPICA DE AVIÁRIO *Chrysomya putoria* (DÍPTERA: CALLIPHORIDAE)

RESUMO - O presente estudo investigou, em condições de laboratório, a atividade patogênica dos isolados IBCB 75 e IBCB 133 de *Paecilomyces fumosoroseus*, aplicados nas concentrações de 1×10^6 e 1×10^8 conídios/mL, nos estágios de ovo, larva L2, pupa e adulto de *Chrysomya putoria*. Nos bioensaios com ovos, larvas e pupas, grupos de 30, 20 e 20 ímagos, respectivamente, foram banhados com as suspensões de conídios e no ensaio com adultos, grupos de 30 moscas, foram pulverizadas com as mesmas suspensões. Em todos os ensaios, utilizaram-se quatro repetições por tratamento e os grupos controle foram tratados com o veículo das suspensões. O tratamento de ovos com os isolados IBCB 75 e IBCB 133 de *P. fumosoroseus* não afetou o percentual de eclosão e mortalidade de larvas, e o tempo médio de vida e emergência de adultos de *C. putoria*. Ambos os isolados foram eficientes no controle da fase larval de *C. putoria* quando aplicados na concentração de 10^8 conídios/mL. A aplicação do fungo em pupas da mosca reduziu a emergência de adultos e aumentou a mortalidade total. A maior atividade patogênica foi mostrada pelo isolado IBCB 133 que promoveu significativa mortalidade de larvas e aumentou a mortalidade total de adultos, nos ensaios com larvas e pupas, respectivamente. O fungo não atuou na fase adulta do ciclo da mosca, pois não reduziu o tempo médio de vida e a mortalidade. Os resultados permitiram concluir que *P. fumosoroseus* é patogênico para *C. putoria*. O isolado IBCB 133 é patogênico para larvas e pupas, enquanto IBCB 75 é patogênico apenas para pupa, mas ambos não têm atividade patogênica para as fases de ovo e adulto. A eficiência do controle é influenciada pela concentração de conídios da suspensão usada, sendo a concentração de 10^8 conídios/mL a mais efetiva.

Palavras - chave: controle biológico, controle microbiano, fungo entomopatogênico, avicultura de postura, bioensaios.

CHAPTER 4 - PATHOGENICITY OF *Paecilomyces fumosoroseus* FOR SYNANTHROPIC FLIES OF AVIARY *Chrysomya putoria* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)

SUMMARY - The present study investigated, in laboratory conditions, the pathogenic activity of the IBCB 75 and IBCB 133 isolates of *Paecilomyces fumosoroseus*, applied in concentrations of 1×10^6 and 1×10^8 conidia/ml, in the stages of egg, L2 larvae, pupa and adult of *Chrysomya putoria*. In the bioassays with eggs, larvae and pupae, groups of 30, 20 and 20 imagos or adult forms, respectively, were bathed with conidia suspension and in the essay with the adults, groups of 30 flies, were pulverized with the same suspensions. In all assays, there were used four replicates per treatment and control groups were treated with tween 80 solution (1%). The treatment of the eggs with IBCB 75 and IBCB 133 isolates of *P. fumosoroseus* did not affect emergence percentage and larvae mortality and average life time and emergence of *C. putoria* adults. Both isolates were effective on the control of *C. putoria* when applied in the concentration of 10^8 conidia/ml in the larvae stage. The fungus application in pupae stage of the fly reduced adult emergence and increased total mortality. The major pathogenic activity was shown by the isolate IBCB 133, which promoted significant larvae mortality and raised total adult mortality, in assays with larvae and pupae, respectively. The fungus did not actuate in the adult stage of the fly's cycle, because it did not reduce the average life time and mortality. The present results permit to conclude that *P. fumosoroseus* is pathogenic to *C. putoria*. The isolate IBCB 133 is efficient for the control of larvae and pupa stages while IBCB 75 only affect the pupa stage, but both isolates do not show pathogenic activity for egg and adult stages. The efficiency of the control is influenced by the concentration of the conidia suspension, pointing as the most efficient, the concentration of 10^8 conidia/ml.

Key words: biological control, microbial control, entomopathogenic fungus, poultry, bioassays.

1. INTRODUÇÃO

As moscas do gênero *Chrysomya* representam um sério problema sanitário para a indústria avícola de postura (AVANCINI & SILVEIRA, 2000), pois as galinhas são alojadas em gaiolas suspensas, em alta densidade, com conseqüente acúmulo de excrementos, excelente substrato para o desenvolvimento de moscas sinantrópicas (SILVA et al., 2000). Estes artrópodes causam prejuízos econômicos diretos e indiretos para o avicultor, pois os ovos são freqüentemente contaminados por estes dípteros (AXTELL, 1999), além de constituírem uma ameaça à saúde pública veiculando agentes etiológicos de enfermidades como enteroviroses, enterobacterioses, oocistos de protozoários e ovos de helmintos (CABRAL et al., 2007).

Existem várias alternativas de controle destes dípteros em aviários, mas o uso indiscriminado de inseticidas químicos, que constitui a prática mais utilizada nas granjas, propicia a seleção de biótipos resistentes (SCOTT et al., 2000), aumenta os riscos de poluição ambiental e aparecimento de resíduos nos ovos e carnes das aves, e favorecendo o desequilíbrio na população de outros artrópodes inimigos naturais das moscas (BRUNO et al., 1993).

A identificação da relação parasito-hospedeiro em um ecossistema específico, representa, neste contexto, uma perspectiva promissora para o tratamento de inúmeras pragas (BASSO et al., 2005). O controle biológico utilizando agentes microbianos, especialmente fungos como *Paecilomyces fumosoroseus* apresenta significativo potencial profilático, tendo em vista que estes microrganismos exercem atividade patogênica para uma grande variedade de artrópodes (WRAIGHT et al., 2000; CASTILLO et al., 2000; SKOVAGARD & STEENBERG, 2002; ANGEL-SAHAGÚN et al., 2005; INGLIS e TIGANO, 2006). A maioria dos estudos referentes ao controle de moscas sinantrópicas por fungos foram realizados em condições de laboratório, envolvendo outras espécies como *Musca domestica* (GEDEN et al., 1995; LECUONA et al., 2005; SIRI et al., 2005), a mosca varejeira *Lucilia sericata* (WRIGHT et al., 2004) e a mosca de estábulo *Stomoxys calcitrans* (WATSON et al., 1995).

Tendo em vista que não há na literatura estudos envolvendo a atividade de fungos para o controle de moscas do gênero *Chrysomya*, associado ao desafio que representa estabelecer programas profiláticos eficazes contra estes vetores, o presente trabalho teve por finalidade investigar, em condições de laboratório, a atividade entomopatogênica de *P. fumosoroseus*, aplicado nas concentrações de 1×10^6 e 1×10^8 conídios/mL, para os estágios de ovo, larva (L2), pupa e adulto de *Chrysomya putoria*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fungo

Foram utilizados os isolados IBCB133 e IBCB75 de *P. fumosoroseus*, pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da FCAV/Unesp. Os isolados foram mantidos em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio BDA (batata, dextrose e ágar) inclinado, estocados a 4°C. Para utilização nos ensaios foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA, acondicionadas em estufa a $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$, durante 15 dias, com ausência de iluminação. A viabilidade dos isolados, determinada seguindo metodologia descrita por MARQUES et al.(2004), nos ensaios de ovo, larva, pupa e adulto os resultados observados de viabilidade foram respectivamente, de: IBCB 133 (100, 97, 99 e 99%) e IBCB 75 (98, 98, 99 e 93%).

Para a produção dos inóculos, os esporos da parte superficial de colônias jovens do fungo foram transferidos, para tubos contendo 20 mL de solução Tween 80® (0,1% v/v) esterilizada. Após vigorosa agitação em agitador elétrico de tubos, as suspensões foram padronizadas em 1×10^6 e 1×10^8 conídios/mL, com auxílio da câmara de Neubauer.

2.2 Obtenção e manutenção das colônias de *C. putoria*.

Amostras de excrementos contendo larvas de *C. putoria*, coletadas em aviários de galinhas de postura, pertencentes a FCAV/Unesp, foram acondicionadas em caixas de isopor de 15 litros (BELO, 1991) (Figura 1 do apêndice) adaptadas para implantação e manutenção da colônia utilizada durante os bioensaios com os diferentes estágios de desenvolvimento da mosca.

Os adultos provenientes dessas larvas foram confinados nas caixas de isopor e para sua manutenção utilizou-se uma mistura de leite em pó e açúcar (1:1) e água destilada oferecida *ad libitum* em algodão saturado. A ovipostura foi estimulada oferecendo carne bovina *in natura*. Em seguida, os ovos foram transportados para copos de plástico (60 mm de diâmetro x 70 mm de altura) vedados com tecido *voile* e contendo dieta artificial composta de farelos de trigo (18%), de milho (17%), de soja (51%), de arroz (14%) e água em quantidade suficiente para proporcionar consistência pastosa. Após a eclosão, as larvas permaneceram nos mesmos recipientes até atingirem o terceiro ínstar, quando foram colocadas nas caixas de manutenção de moscas para a empupação e emergência de adultos, todos mantidos à temperatura ambiente. A cada 30 dias novas larvas da mosca foram coletadas no ambiente natural e introduzidas na colônia para minimizar o efeito endogâmico.

2.3 Patogenicidade dos fungos para ovos de *C. putoria*

Grupos de 30 ovos com até quatro horas de idade, foram banhados com as suspensões de conídios obtidas como já descrito e os grupos controle foram banhados apenas no veículo da suspensão. Em seguida, foram colocados sobre papel de filtro esterilizado o qual foi depositado sobre 5 g de carne bovina moída em processo inicial de decomposição que serviu de dieta para as larvas eclodidas (Figura 2 do apêndice). Esta preparação foi acondicionada em recipiente de plástico (30 mm de diâmetro x 50 mm de altura) interligado a outro idêntico por um orifício no intuito de oferecer um

ambiente mais seco para a empupação. Os recipientes foram vedados com malha fina de nylon e acondicionados em câmaras úmidas à $27 \pm 0,5$ °C, umidade relativa do ar entre 60 e 70% e fotoperíodo de 14 horas. A avaliação de eclosão foi realizada a partir de 12 horas após a inoculação do fungo.

No estágio larval, os ímagos foram inspecionados diariamente para verificação da empupação e as pupas formadas foram separadas e acondicionadas em placas de Petri com algodão umedecido. As moscas adultas emergidas foram transferidas para caixas de isopor (2 litros), adaptadas de acordo com BELO (1991), mantidas à temperatura ambiente, oferecendo, *ad libitum*, dieta composta por uma mistura de leite em pó e açúcar refinado (1:1), e água em algodão saturado, durante o período de 20 dias para avaliação diária da longevidade. A extrusão do patógeno em pupas e adultos foi observada como um dado complementar para verificação da atividade patogênica.

2.4 Patogenicidade dos fungos para larvas L2 de *C. putoria*

Grupos de 20 larvas (L2), com 72 horas de idade, foram imersos durante 30 segundos nas suspensões de conídios ou veículo das suspensões (controle), como descrito anteriormente, e em seguida, mantidos em dois recipientes de plástico. Para evitar a remoção de conídios do tegumento, as larvas foram deixadas por 24 horas nos recipientes de plástico e em seguida foram alimentadas com a dieta artificial usada para manutenção de larvas, autoclavada, oferecida na forma de sachês (Figura 5 do apêndice). A montagem, finalidade e manutenção dos recipientes plásticos foram realizadas conforme descrito no ensaio anterior.

A inspeção das larvas foi efetuada diariamente por 30 dias para verificação da mortalidade e empupação. As pupas foram transferidas para caixas de isopor (2 litros) adaptadas conforme descrito por BELO (1991) (Figura 4 do apêndice), para observação da emergência e do tempo de vida dos adultos. Larvas, pupas e adultos mortos foram transferidos para câmaras úmidas mantidas (Figura 6 do apêndice) a 27°C para verificação da extrusão do patógeno.

2.5 Patogenicidade dos fungos para pupas de *C. putoria*

Grupos de 20 pupas com um a dois dias de idade, com quatro repetições, foram imersos durante 30 segundos nos veículos ou nas suspensões de conídios já referidas e mantidos à temperatura ambiente, em caixas de isopor, como descrito no ensaio com ovos. As caixas foram inspecionadas diariamente para observação de emergência e mortalidade de adultos, durante 20 dias após o 3º dia de incubação, ocasião em que ocorreu a primeira emergência. As pupas que não geraram adultos até o 5º dia após o tratamento, foram consideradas mortas. Pupas e adultos mortos foram transferidos para câmaras úmidas mantidas a 27°C para verificação da extrusão do patógeno.

2.6 Patogenicidade dos fungos para adultos de *C. putoria*

Grupos de 30 moscas adultas, com um a cinco dias de idade, foram separados em recipientes de plástico, cobertos com tecido *voile* e mantidos a temperatura de 0°C até a completa imobilização das moscas. Com auxílio de um pequeno aspersor manual, foram pulverizados com 1 mL das suspensões de conídios e mantidos em temperatura ambiente, sendo oferecido água em algodão saturado. Os grupos controles foram pulverizados apenas com o veículo das suspensões. Após 12 horas, as moscas foram transferidas e mantidas durante 20 dias em caixas de isopor, como anteriormente descrito, para avaliação diária da longevidade dos adultos (Figura 7 do apêndice). Os adultos mortos foram transferidos para câmaras úmidas mantidas a 27°C para verificação da extrusão do patógeno (Figura 6 do apêndice).

2.7 Análise estatística

Todos os ensaios foram conduzidos com quatro repetições. Para análise dos dados utilizou-se o programa SAS, versão 8.2 (SAS, 1999). Inicialmente, todas as

variáveis foram estudadas de maneira descritiva, pelo cálculo da média, desvio padrão e mediana. Em seguida os valores percentuais de mortalidade foram transformados em $\text{Arc seno} = \left[\left(\sqrt{\%mortalidade/100} \right) \times 180 \right] / \pi$, e o tempo médio de vida (TMV) foi calculado pela média ponderada da mortalidade e o tempo em dias $\text{TMV} = \sum(\text{dias} \times \text{sobreviventes}) / \sum \text{sobreviventes}$. Todas as médias dos dados foram analisadas em um delineamento inteiramente casualizado (ANOVA) e as comparações múltiplas foram aferidas pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Patogenicidade para ovos de *C. putoria*

A aplicação dos isolados IBCB 75 e IBCB 133 de *P. fumosoroseus* em ovos de *C. putoria* não apresentou efeito significativo ($P > 0,05$) sobre o percentual de eclosão (Tabela 1). O tempo médio de eclosão de larvas de *C. putoria* foi de 12 horas, e a germinação dos isolados IBCB 75 e IBCB 133, após 12 horas de incubação, foi de 90 e 82%, respectivamente (dados não mostrados). Como, devido ao tempo necessário para manipulação, os conídios foram inoculados em ovos obtidos até quatro horas após a postura, provavelmente a eclosão das larvas ocorreu antes da germinação e penetração do fungo no ovo, o que justifica a baixa atividade patogênica para este estágio de *C. putoria*.

Na relação parasito-hospedeiro, o sucesso de controle biológico resulta da efetiva interação entre os ciclos biológicos de ambas as espécies, o que não ocorreu nesta fase do ciclo da mosca. Os isolados IBCB 75 e IBCB 133 de *P. fumosoroseus* não foram patogênicos para ovos de *C. putoria*. Este resultado é semelhante ao obtido por ANGEL-SAHAGÚN et al. (2005) que, após tratarem ovos de *Haematobia irritans* com inóculos contendo 10^6 conídios/mL de 12 isolados de *P. fumosoroseus*, verificaram redução significativa na porcentagem de emergência de adultos para apenas dois

isolados. A atividade patogênica na fertilidade de ovos de *Ceratitis capitata* foi descrita por CASTILLO et al. (2000), que observaram redução significativa no percentual de eclosão após tratamento de fêmeas adultas com inóculos de 10^6 conídios dos isolados CG 260 e CECT 2705 de *P. fumosoroseus*. No presente estudo não houve aumento significativo na mortalidade de larvas de *C. putoria* provenientes dos ovos tratados com inóculos de 10^6 e 10^8 conídios/mL de ambos os isolados (Tabela1). Porém, se observa aumento no tempo médio de empupação das larvas quando comparadas ao grupo controle, sendo estatisticamente significativo apenas para os ovos tratados com 10^6 conídios/mL do isolado IBCB 133 de *P. fumosoroseus*. ANGEL-SAHAGÚN et al. (2005) relataram aumento no tempo de empupação de larvas de *H. irritans* tratadas com 10^6 conídios/mL de diferentes isolados deste deuteromiceto.

TABELA 1 - Valores médios e análise de variância para a eclosão, mortalidade larval, tempo médio de empupação, tempo médio de vida das pupas e emergência de adultos de *Chrysomya putoria* após tratamento de ovos com suspensões de conídios dos isolados de *Paecilomyces fumosoroseus*.

Tratamento ^a	Eclosão (%)	Mortalidade larval	TME ^b (dias)	TMVP ^c (dias)	Emergência (%)
IBCB 133, 10^6	89,17 ± 6,9 ^A	3,75 ± 3,9 ^A	7,33 ± 0,3 ^{AB}	3,84 ± 0,2 ^A	95,25 ± 9,6 ^A
IBCB 133, 10^8	95,00 ± 5,8 ^A	2,25 ± 1,0 ^A	7,39 ± 0,3 ^{AB}	3,83 ± 0,2 ^A	88,75 ± 10,3 ^A
IBCB 75, 10^6	80,00 ± 12,2 ^A	1,50 ± 2,4 ^A	7,57 ± 0,2 ^A	4,08 ± 0,6 ^A	85,75 ± 25,4 ^A
IBCB 75, 10^8	91,67 ± 1,9 ^A	4,00 ± 3,2 ^A	7,10 ± 0,3 ^{AB}	3,91 ± 0,1 ^A	99,00 ± 2,1 ^A
Controle^d	87,50 ± 5,0 ^A	2,00 ± 1,8 ^A	6,82 ± 0,1 ^B	3,58 ± 0,1 ^A	97,00 ± 4,0 ^A
Valor de F	2,44 ^{NS}	0,71 ^{NS}	4,39*	1,59 ^{NS}	0,75 ^{NS}
Pr>F ^e	0,0918	0,5996	0,0151	0,2272	0,5750
C.V. (%) ^f	8,09	97,76	3,84	7,46	14,04
DMS (Tukey) ^g	15,67	5,76	0,61	0,63	28,56

Médias seguidas por pelo menos por uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). NS não significativo; *significativo a 5% de probabilidade.

^a isolado, seguido da concentração de conídios/mL usada.

^b TME: Tempo médio de empupação;

^c TMVP: Tempo médio de vida das pupas.

^d Tratamento controle: Solução de Tween 80 a 0,1%.

^e Pr>F: Probabilidade de significância associada ao valor de F

^f C.V.: Coeficiente de variação

^g DMS: Diferença mínima significativa.

Na análise do tempo médio de vida da pupa, não se verificou diferença significativa na emergência de adultos de *C. putoria* após tratar os ovos com os dois isolados em ambas concentrações de conídios (Tabela 1), corroborando a ausência da atividade do fungo para esta fase do ciclo biológico da mosca. Outro aspecto interessante constatado na análise do tratamento dos ovos refere-se à completa ausência da extrusão do patógeno em pupas e adultos de *C. putoria*, confirmando a hipótese da baixa atividade patogênica do fungo nas condições experimentais deste bioensaio.

3.2 Patogenicidade para larvas L2 de *C. putoria*

No bioensaio realizado com larvas (L2), avaliou-se o efeito patogênico dos tratamentos fúngicos por meio do estudo do tempo médio de vida dos diferentes estágios de desenvolvimento de *C. putoria*. Portanto, se considerou as larvas de segundo ínstar e os estágios de pupa e adultos, obtidos a partir dessas larvas. No final do ensaio a extrusão do patógeno foi verificada sobre larvas, pupas e adultos mortos (Figura 1).

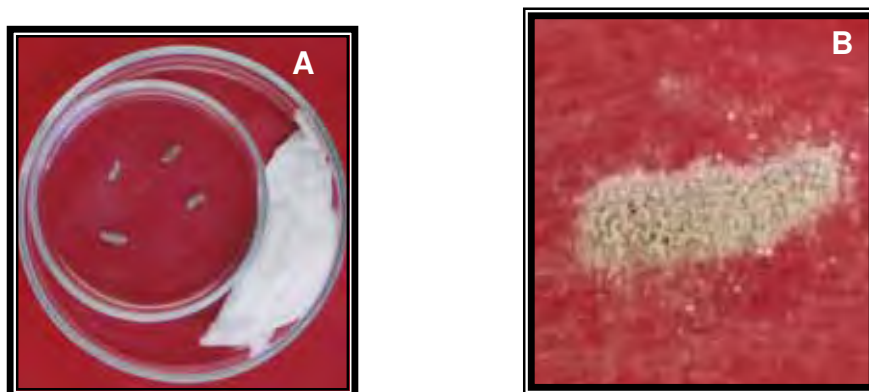


FIGURA 1. Larvas de *C. putoria* mortas pelo fungo *P. fumosoroseus*. **A:** visualização de uma das câmaras úmidas para verificação da extrusão do patógeno; **B:** Larva apresentando extrusão do fungo.

TABELA 2 - Valores médios e análise de variância do tempo médio de vida em dias de larvas, pupas e adultos oriundos de larvas L2 de *Chrysomya putoria*, após tratamento com suspensões de conídios dos isolados de *Paecilomyces fumosoroseus*, avaliadas diariamente pelo período 30 dias.

Tratamento ^a	Tempo médio de vida (dias)			
	Larva	Pupa	Adulto	Total
IBCB 133, 10⁶	5,99 ± 0,4 ^A	13,13 ± 2,0 ^A	20,00 ± 3,8 ^A	8,29 ± 0,0 ^A
IBCB 133, 10⁸	3,68 ± 0,0 ^B	11,15 ± 0,3 ^A	14,67 ± 10,0 ^A	6,27 ± 1,7 ^B
IBCB 75, 10⁶	5,64 ± 0,6 ^A	13,46 ± 1,2 ^A	19,46 ± 1,9 ^A	8,26 ± 0,6 ^A
IBCB 75, 10⁸	4,91 ± 0,9 ^{AB}	13,32 ± 1,7 ^A	12,11 ± 14,9 ^A	6,98 ± 1,4 ^{AB}
Controle^b	5,61 ± 0,7 ^A	13,43 ± 1,2 ^A	12,61 ± 8,9 ^A	8,42 ± 0,7 ^A
Valor de F	9,50 ^{**}	1,99 ^{NS}	0,67 ^{NS}	3,34 [*]
Pr>F ^c	0,0005	0,1471	0,6233	0,0381
C.V. (%) ^d	11,55	10,83	58,07	13,81
DMS (Tukey) ^e	1,30	3,05	20,00	1,90

Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). NS não significativo; **significativo a 1% de probabilidade; *significativo a 5% de probabilidade.

^a Isolado e concentração de conídios/mL.

^b Tratamento controle: Solução de Tween 80 a 0,1%.

^c Pr>F: Probabilidade de significância associada ao valor de F

^d CV: Coeficiente de variação

^e DMS: Diferença mínima significativa.

O isolado IBCB 133 de *P. fumosoroseus* apresentou alta patogenicidade para larvas na concentração de 10⁸ conídios/mL, mostrando efeito significativo (P<0,01) sobre o desenvolvimento larval de *C. putoria* (Tabela 2), promovendo 90% de mortalidade com 15 dias após o tratamento (Figura 2). No entanto, ambos os isolados não demonstraram efeito patogênico (P>0,05) para larvas de *C. putoria* tratadas com inóculos contendo 10⁶ conídios/mL, não reduzindo o tempo médio de vida das larvas (Tabela 2).

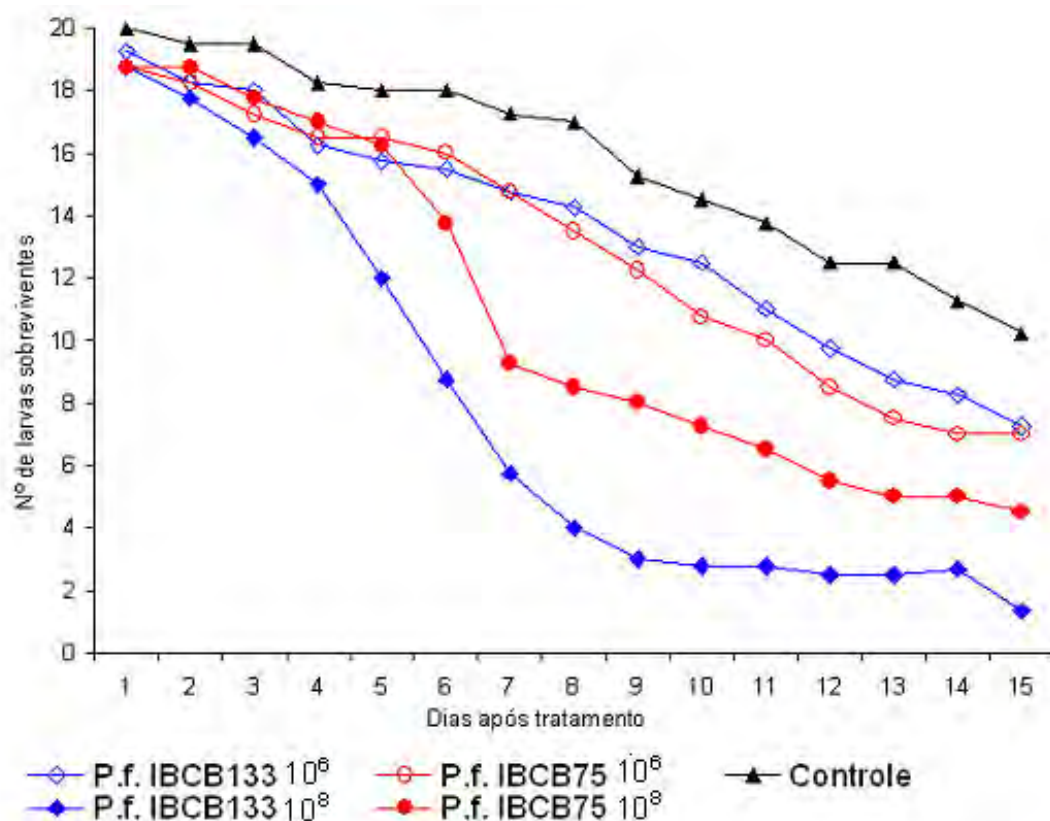


FIGURA 2: Sobrevivência das larvas de *Chrysomya putoria* tratadas com suspensões de conídios dos isolados IBCB 133 e IBCB 75 de *P. fumosoroseus*, nas concentrações de 10⁶ e 10⁸ conídios/mL e controle, nos primeiros 15 dias após o tratamento.

A análise da mortalidade larval no tempo (Figura 2) demonstrou efeito dose-dependente para ambos os isolados estudados quando comparados ao grupo controle. Estes dados estão em concordância aos descritos por CASTILLO *et al.* (2000) que verificaram redução significativa dose-dependente na ovipostura, na fertilidade dos ovos e na longevidade de fêmeas adultas de *C. capitata* desafiadas com inóculos crescentes destes fungos.

3.3 Patogenicidade para pupas de *C. putoria*

Neste ensaio, a extrusão do patógeno foi observada tanto em exemplares de pupas como de adultos mortos (Figura 3). Os resultados indicaram que houve diferença na emergência de adultos a partir de pupas tratadas. O menor número de adultos emergidos ocorreu no tratamento com o isolado IBCB 133, na concentração de 10^6 conídios/mL, que diferiu significativamente dos demais, enquanto no tratamento com o mesmo isolado, na concentração de 10^8 conídios/mL, a emergência de adultos não diferiu do controle (Tabela 3).

TABELA 3 - Valores médios e análise de variância da emergência de adultos, tempo médio de vida de adultos e mortalidade total obtidas de pupas de *Chrysomya putoria* tratadas com suspensões de conídios de isolados de *Paecilomyces fumosoroseus*. Avaliação conduzida até 20 dias após o início da emergência de adultos.

Tratamento ^a	Emergência (%) ^b	TMV ^c	Mortalidade total
IBCB 133, 10^6	44,25 ± 5,5 ^C	9,64 ± 1,0 ^A	13,75 ± 3,3 ^A
IBCB 133, 10^8	45,73 ± 5,9 ^{BC}	9,06 ± 1,2 ^A	15,50 ± 2,4 ^A
IBCB 75, 10^6	59,41 ± 6,0 ^A	10,14 ± 0,1 ^A	7,75 ± 1,7 ^B
IBCB 75, 10^8	50,08 ± 4,4 ^{ABC}	8,80 ± 0,9 ^A	14,75 ± 3,2 ^A
Controle^d	55,26 ± 1,8 ^{AB}	10,36 ± 0,2 ^A	7,50 ± 1,0 ^B
Valor de F	6,6**	2,65 ^{NS}	9,93**
Pr>F ^e	0.0029	0,0746	0,0004
C.V. (%) ^f	9,75	8,58	20,93
DMS (Tukey) ^g	10,85	1,80	5,41

Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). NS não significativo; **significativo a 1% de probabilidade.

^a Isolado e concentração de conídios/mL.

^b Média das porcentagens dos valores observados transformados em arco seno;

^c TMV: Tempo médio de vida dos adultos (em dias).

^d Tratamento controle: Solução de Tween 80 a 0,1%.

^e Pr>F: Probabilidade de significância associada ao valor de F

^f CV: Coeficiente de variação

^g DMS: Diferença mínima significativa

Na análise do tempo médio de vida dos adultos, emergidos a partir das pupas tratadas com os isolados IBCB 75 e IBCB 133 de *P. fumosoroseus*, em ambas as concentrações de conídios, também não mostrou redução significativa ($P>0,05$) na sobrevivência das moscas, quando comparado ao controle (Tabela 3).

O efeito do fungo sobre as pupas foi melhor evidenciado na avaliação da mortalidade total onde se observou aumento significativo ($P<0,01$) na mortalidade dos grupos banhados com 10^8 conídios/mL do isolado IBCB 75 e de ambas as concentrações do isolado IBCB 133 de *P. fumosoroseus*. Apenas no tratamento com 10^6 conídios/mL do isolado IBCB 75 não se observou aumento significativo na mortalidade (Tabela 3). Tais resultados estão em concordância aos descritos por ANGEL-SAHAGÚN et al. (2005), em que a aplicação de inóculos com 10^8 conídios/mL de isolados de *P. fumosoroseus* em pupas de *H. irritans* resultou em mortalidades estatisticamente significativas que alcançaram cerca de 50% dos imagos analisados.

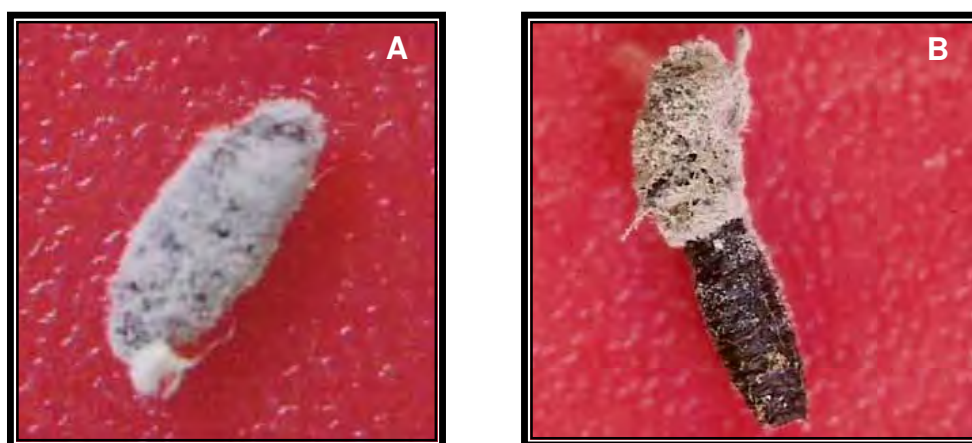


FIGURA 3. Pupas mortas pelo fungo *Paecilomyces fumosoroseus*. **A:** pupa colonizada pelo fungo na fase hifálica. **B:** Mosca emergindo da pupa colonizada pelo fungo na fase de esporulação.

Outro aspecto importante a ser considerado é a redução na sobrevivência de adultos provocada pelo aumento da concentração dos inóculos. Apesar da análise estatística não ter acusado diferença no tempo médio de vida das moscas tratadas com

10^6 ou 10^8 conídios/mL do isolado IBCB 75 de *P. fumosoroseus*, o efeito dose-resposta pode ser verificado na Figura 4, onde se observou acentuada redução na sobrevivência de adultos na concentração de 10^8 conídios/mL.

Este fenômeno é importante para o controle de *C. putoria*, pois diminui a duração da fase reprodutiva da mosca, provavelmente reduzindo a ovipostura. Após inocularem pupas da mariposa *Phthorimaea operculella* com *B. bassiana*, HAFEZ et al. (1997) obtiveram significativo decréscimo na emergência e longevidade de adultos, postura e viabilidade dos ovos. Adultos de *C. capitata* apresentaram menor longevidade após o tratamento das pupas com diferentes isolados de *M. anisopliae* (BISSOLLI, 2004).

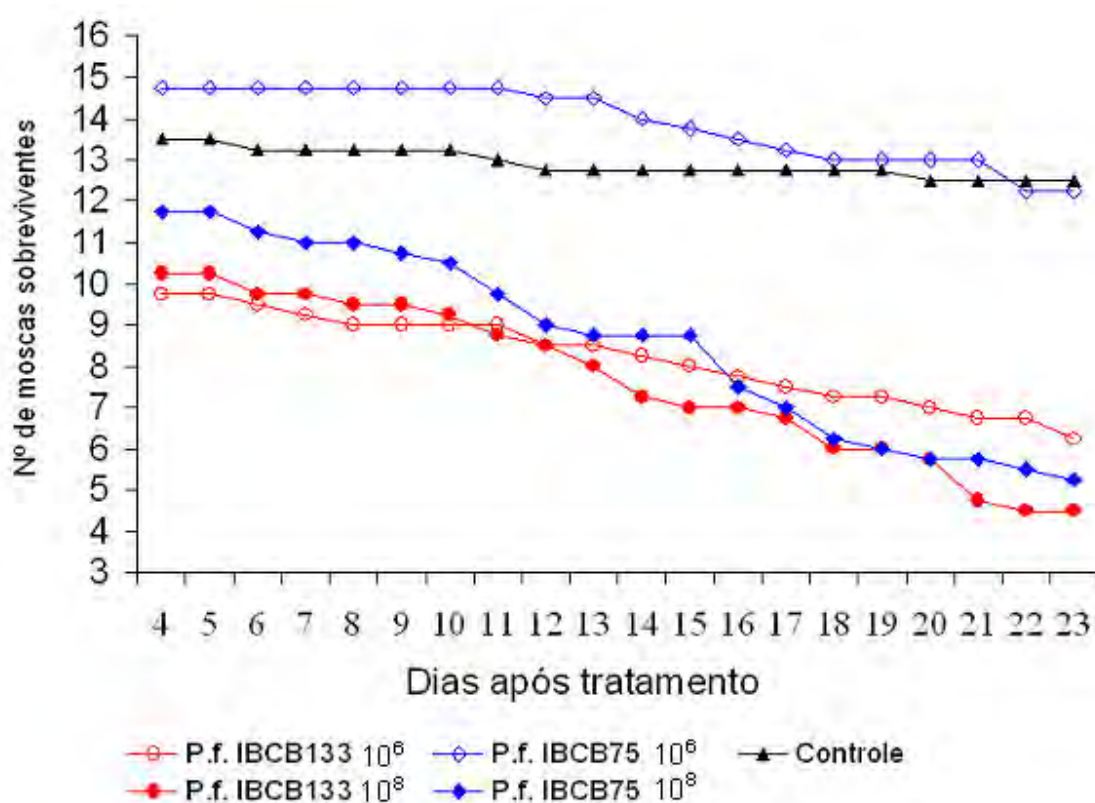


FIGURA 4: Sobrevivência de adultos de *Chrysomya putoria* emergidos de pupas tratadas com suspensões de conídios dos isolados IBCB 133 e IBCB 75 de *P. fumosoroseus*, nas concentrações de 10^6 e 10^8 conídios/mL e controle, até o 23º dia após tratamento.

3.4 Patogenicidade para adultos de *C. putoria*

A aplicação de ambos os isolados de *P. fumosoroseus* sobre adultos de *C. putoria*, não mostrou resultados significativos ($P>0,05$) na redução do tempo médio de vida e no aumento da mortalidade das moscas tratadas com suspensões de 10^6 e 10^8 conídios/mL (Tabela 4).

TABELA 4 - Valores médios e análise de variância do tempo médio de vida de adultos e mortalidade total obtidas de adultos de *Chrysomya putoria* tratados com suspensões de conídios de isolados de *Paecilomyces fumosoroseus*. Avaliação conduzida até 20 dias após o início da emergência de adultos.

Tratamentos ^a	TMV ^b	Mortalidade(%) ^c
IBCB 133, 10^6	9,80 ± 0,2 ^A	40,24 ± 2,5 ^A
IBCB 133, 10^8	9,74 ± 0,2 ^A	41,51 ± 6,6 ^A
IBCB 75, 10^6	9,73 ± 0,6 ^A	36,97 ± 9,6 ^A
IBCB 75, 10^8	9,53 ± 0,4 ^A	51,55 ± 21,1 ^A
Controle^e	9,86 ± 0,4 ^A	32,88 ± 8,3 ^A
Valor de F	0,40 ^{NS}	1,47 ^{NS}
Pr>F ^f	0,8069	0,2598
C.V. (%) ^g	4,02	28,23
DMS (Tukey) ^h	0,85	25,04

Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). NS não significativo; **significativo a 1% de probabilidade; *significativo a 5% de probabilidade.

^a Isolado e concentração de conídios/mL.

^b TMV: Tempo médio de vida dos adultos (em dias).

^c Media das porcentagens dos valores observados transformados em arco seno;

^d Tratamento controle: Solução de Tween 80 a 0,1%.

^e Pr>F: Probabilidade de significância associada ao valor de F

^f CV: Coeficiente de variação

^g DMS: Diferença mínima significativa.

A extrusão do patógeno ocorreu em poucos exemplares de adultos mortos. O efeito dose-resposta para os isolados também não ficou evidente nesta análise, pois os adultos tratados com suspensões de 10^6 e 10^8 conídios/mL apresentaram mortalidades estatisticamente similares ao grupo controle (Figura 5). Estes resultados divergem das

observações de CASTILLO *et al.* (2000) e ANGEL-SAHAGÚN *et al.* (2005) que verificaram mortalidade significativa de adultos de *C. capitata* desafiados com inóculos de 10^6 conídios/mL, e de *H. irritans* pulverizados com inóculos de 10^8 conídios/mL de diferentes isolados do *P. fumosoroseus*, respectivamente.

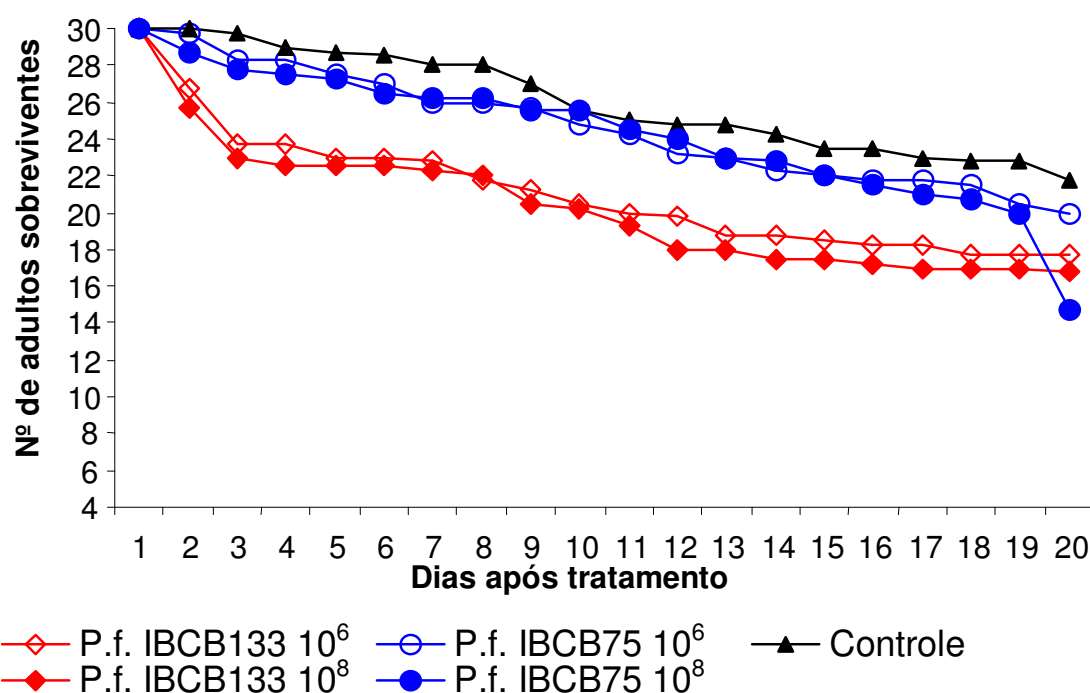


Figura 5: Sobrevivência de adultos de *Chrysomya putoria* pulverizados com suspensões de conídios dos isolados IBCB 133 e IBCB 75 de *P. fumosoroseus*, nas concentrações de 10^6 e 10^8 conídios/mL e controle, até o 20º dia após tratamento.

Alguns autores descreveram a ocorrência de *P. fumosoroseus* naturalmente parasitando dípteros, tais como *Tachinidae* (INGLIS & TIGANO, 2006) e *Musca domestica* (SKOVGARD & STEEMBERG, 2002). O fungo demonstrou elevada patogenicidade para mosca branca, *Bemisia argentifolli* (WRAIGHT *et al.*, 1998), apresentando considerável potencial para produção comercial em massa e para o uso alternativo no controle biológico desta praga (WRAIGHT *et al.*, 2000). A discrepância observada entre os resultados destes autores e os relatados neste estudo pode ser

consequência de fatores como a diferença de susceptibilidade entre dípteros e a patogenicidade das cepas utilizadas, entre outros.

4. CONCLUSÕES

1. O fungo *P. fumosoroseus* é patogênico para a mosca sinantrópica de aviário *C. putoria*.
2. O isolado IBCB 133 é patogênico para os estágios de larva e pupa de *C. putoria*, e IBCB 75 apenas para pupa, mas ambos não apresentam atividade patogênica para os estágios de ovo e adulto.
3. A eficiência do controle é influenciada pela concentração de conídios da suspensão usada, sendo a concentração de 10^8 conídios/mL a mais eficiente.

5. REFERÊNCIAS

ANGEL-SAHAGÚN, C. A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; GALINDO-VELASCO, E.; LÓPEZ-EDWARDS, M.; REBOLLEDO-DOMINGUEZ, O.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; REYES-VELÁZQUEZ, W. P.; SKODA, S. R.; FOSTER, J. E. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). **Journal of Insect Science**, Wallingfort, v.5, artigo 50, 2005.

AVANCINI, R. M. P.; SILVEIRA, G. A. R. Age structure and abundance in populations of muscoid flies from a poultry facility in southeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, p.259-264, 2000.

AXTELL, R. C. Poultry integrated pest management: status and future. **Integrated Pest Management Review**, v. 4, p.53-73, 1999.

BASSO, L. M. S.; MONTEIRO, A. C.; BELO, M. A. A.; SOARES, V. E.; GARCIA, M. V.; MOCHI, D. A. Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, p.595-600, 2005.

BELO, M. Frequência estacional de moscas emergidas em fezes de galinhas poedeiras. **Boletim Ciência Agronômica**, Jaboticabal, v.6, p.21-24, 1991.

BISSOLLI, G. **Patogenicidade e virulência de fungos entomopatogênicos para larvas e pupas da mosca-das-frutas *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)**. 2004. 50f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

BRUNO, T. V.; GUIMARÃES, J. H.; SANTOS, A. M. M.; TUCCI, E. C. Moscas sinantrópicas (Díptera) e seus predadores que se criam em esterco de aves poedeiras confinadas no estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v.37, p.577-590, 1993.

CABRAL, M. M. O.; MENDONÇA, P. M.; GOMES, C. M. S.; BARBOSA FILHO, J. M.; QUEIROZ, M. M. C.; MELLO, R. P. Biological activity of neolignans on the post-embryonic development of *Chrysomya megacephala*. **Fitoterapia**, Milan, v.78, p.20-24, 2007.

CASTILLO, M. A.; MOYA, P.; HERNANDEZ, E.; YUFERA, E. P. Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extracts. **Biological Control**, London, v.19, p.274-282, 2000.

GEDEN, C. J.; RUTZ, D. A.; STEINKRAUS, D.C. Virulence of different isolates and formulations of *Beauveria bassiana* for house flies and the parasitoid *Muscidifurax raptor*. **Biological Control**, London, v.5, p.615-621, 1995.

HAFEZ, M.; ZAKI, F. N.; MOURSY, A.; SABBOUR, M. Biological effects of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Seller). **Journal of Pesticide Science**, Toshima-Ku, v.70, p.158-159, 1997.

INGLIS, P. W.; TIGANO, M. S. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS sequences. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.29, p.132-136, 2006.

LECUONA, R. E.; TURICA, M.; TABOCCO, F.; CRESPO, D. C. Microbial Control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with selected Strains of *Beauveria bassiana*. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v.42, p.332-336, 2005.

MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34,n.6, p.1675-1680, 2004.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT- user's guide version 8**. Cary, 1999.

SCOTT, J. G.; ALEFANTIS, T. G.; KAUFMAN, P. E.; RUTZ, D. A. Insecticide resistance in house flies from caged-layer poultry facilities. **Pest Management Science**, Sussex, v.56, p.1-7, 2000.

SILVA, G. S.; COSTA, A. J.; ROCHA, U. F.; SOARES, V. E.; MENDES, J.; YOSHIDA, L. The efficacy of 25% diflubenzuron fed to poultry to control synanthropic flies in the dung. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.9, p.119-123, 2000.

SIRI, A.; SCORSETTI, A. C.; DIKGOLZ, V. E.; LOPEZ, C. C. Natural Infections caused by the fungus *Beauveria bassiana* as a pathogen of *Musca domestica* in the neotropic. **Biological Control**, London, v.50, p.937-940, 2005.

SKOVGARD, H.; STEENBERG, T. Activity of pupal parasitoids of the stable fly *Stomoxys calcitrans* and prevalence of entomopathogenic fungi in the stable fly and the house fly *Musca domestica* in Denmark. **Biological Control**, London, v.47, p.45-60, 2002.

WATSON, D. W.; GEDEN, C. J.; LONG, S. J.; RUTZ, D. A. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). **Biological Control**, London, v.5, p.405-411, 1995.

WRAIGHT, S. T.; CARRUTHERS, R. I.; BRADLEY, C. A.; JARONSKI, S. T.; LACEY, L. A.; WOOD, P.; GALAINI-WRAIGHT, S. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolli*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.71, p.217-226, 1998.

WRAIGHT, S. T.; CARRUTHERS, R. I.; JARONSKI, S. T.; BRADLEY, C. A.; GARZA, C. J.; GALAINI-WRAIGHT, S. Evolution of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolli*. **Biological Control**, London, v.17, p.203-217, 2000.

WRIGHT, C.; BROOKS, A.; WALL, R. Toxicity of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to adult females of the blowfly *Lucilla sericata* (Diptera: Calliphoridae). **Pest Management Science**, Sussex, v.60, p.639-644, 2004.

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos nos ensaios deste trabalho foi possível verificar que os fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *P. fumosoroseus* são patogênicos para *C. putoria*, destacando-se *B. bassiana* e *M. anisopliae* por serem mais eficientes para o controle de larvas e adultos da mosca, pois *P. Fumosoroseus* atuou somente na fase de pupa. Verificou-se também diferença entre isolados de mesmo fungo, sendo os isolados E 9 de *M. anisopliae*, AM 9 de *B. bassiana* e o IBCB 133 de *P. Fumosoroseus*, os mais patogênicos, principalmente quando utilizados na concentração de 10^8 conídios/mL, que foi a mais adequada para promover a atividade patogênica dos fungos nos vários estágios do ciclo biológico da mosca. Devido à importância epidemiológica de *C. putoria* para saúde pública e animal, é necessário estabelecer estratégias que permitam a utilização de *B. bassiana* e *M. anisopliae* como alternativa aos tratamentos convencionais com pesticidas químicos, atualmente empregados no manejo sanitário de aviários de postura. Como *C. putoria* habitualmente se alimenta e reproduz em excretas de aves, uma das estratégias seria a pulverização de suspensão de conídios sobre os mesmos, o que possibilitaria a atuação direta sobre larvas e indireta sobre adultos. Sendo assim, mais estudos tornam-se necessários para investigação de metodologias de aplicação e formulações, visando a aplicação efetiva do controle biológico em aviários.

APÊNDICE

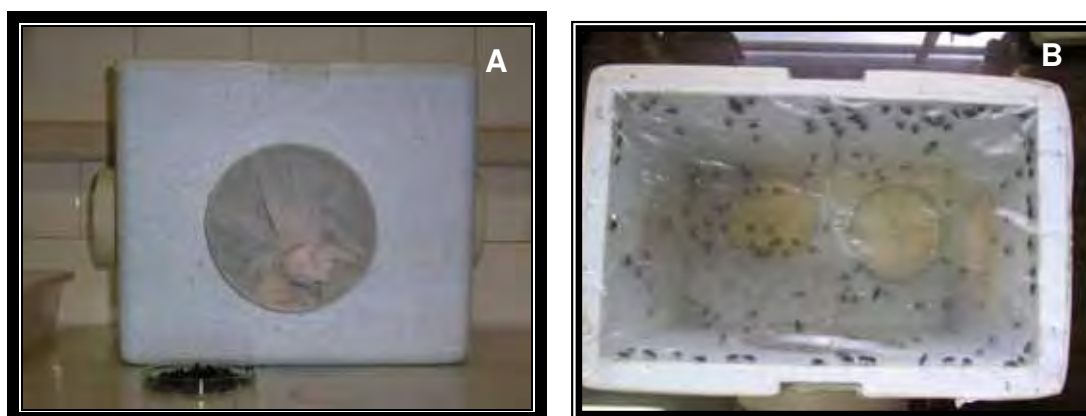


Figura 1. Caixas de criação das moscas. **A:** Vista lateral; **B:** Vista superior.

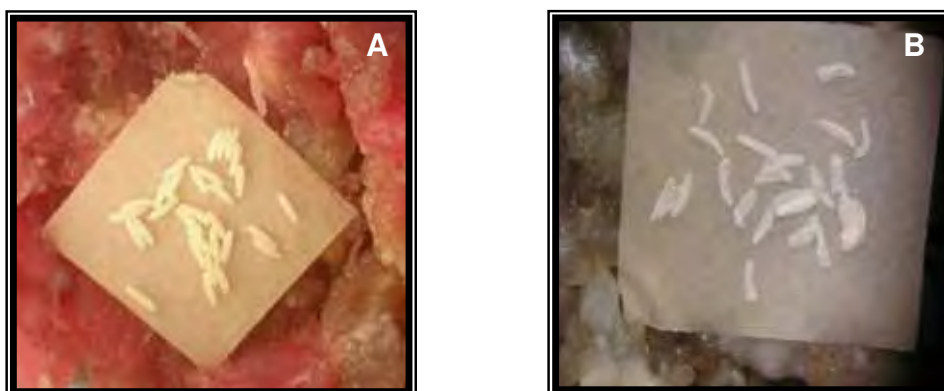


Figura 2. Ovos acondicionados sobre papel de filtro e este sob dieta de carne bovina; **A:** Ovos tratados antes da eclosão; **B:** ovos após eclosão.



Figura 3. Visualização de uma câmara úmida e dos recipientes plásticos interligados (→) e vedados com tecido *voile*, onde os grupos de ovos e larvas foram mantidos durante a fase larval.



Figura 4. Caixa de isopor adaptada para manutenção das moscas durante a fase adulta de todos ensaios.



Figura 5. Sachês contendo a ração que com a dieta usada nos ensaios das larvas de *C. putoria*.



Figura 6. Câmara úmida composta de duas placas de Petri e algodão umedecido para verificação da extrusão do patógeno.



Figura 7. Visualização das caixas de isopor em que os adultos de *C. putoria* foram acondicionados.