

Seleção e avaliação da virulência de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. submetidos a diferentes temperaturas

Selection and evaluation of virulence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. submitted to different temperature

Kelly Christiane Constanski^{1*}; Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves²; Livia Maria Nogueira³; Patricia Helena Santoro⁴; Junio Tavares Amaro⁵; Janaína Zorzetti⁶

Resumo

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) tem sido relatado como um promissor agente de controle de insetos. É necessário investigar a atividade patogênica e também fatores como a temperatura que pode interferir no seu desenvolvimento, estabelecendo assim bases para o seu uso em programas de controle biológico. O objetivo desse trabalho foi selecionar isolados de *Beauveria bassiana* tolerantes a temperaturas elevadas e verificar a virulência destes antes e após a exposição às temperaturas. Realizou-se uma pré-seleção, na qual 15 isolados foram inoculados em meio completo e incubados a 30°, 35° e 40° C. Para os isolados/temperaturas onde houve crescimento, foi avaliado a germinação e unidades formadoras de colônias (UFC). Para as temperaturas de 35 e 40°C não houve desenvolvimento de nenhum isolado, sendo as melhores porcentagens de germinação e UFC obtidas com Unioeste 4, CG 26 e UEL 24 a 30°C. Estes por sua vez, foram inoculados em meio completo a 25°C e a 32°C para comparação dos parâmetros de desenvolvimento. Houve atraso na germinação a 32°C para todos os isolados já para as UFC não houve diferença entre os isolados nem entre as temperaturas com porcentagens variando de 80,1 a 90,4% de colônias formadas. Entretanto, houve redução na produção de conídios a 32°C para todos os isolados. Para o teste de virulência foi observada diminuição de 88% da mortalidade confirmada de adultos de *Alphitobius diaperinus* a 32°C para o isolado Unioeste 4.

Palavras-chave: Fatores abióticos, fungos entomopatogênicos, virulência

Abstract

The entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) has been reported as agent of Insects control. It is necessary to investigate the pathogenic activity and also factors such as temperature that might interfere their development, to make sure that could be used in biology program control. The aim of this study was to select isolates of *Beauveria bassiana* tolerants to high temperatures and to verify the virulence of them before and after exposure. A pre-selection was realized whereby 15 isolates were inoculated in complete medium and incubated at 30°C, 35°C and 40°C. For isolates there was an increase isolates/temperature, were evaluated the germination and colony forming units (CFU). No development of any isolated was found at temperatures of 35 and 40°C and the best percentage of

¹ Bióloga, Doutoranda em Agronomia - Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR. E-mail: kconstanski@hotmail.com

² Prof. Dr. do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR. E-mail: pedroneves@uel.br

³ Bióloga, Mestranda em Agronomia - Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, PR. E-mail: livianogue@hotmail.com

⁴ Eng^o Agr^o Pesquisadora do Instituto Agrônomo do Paraná, IAPAR, Londrina, PR. E-mail: ph_santoro@yahoo.com.br

⁵ Eng^o Agr^o Mestrando em Agronomia - Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR. E-mail: muchojunio@hotmail.com

⁶ Eng^o Agr^o Mestranda em Agronomia - Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, - PR. E-mail: jzorzetti@hotmail.com

* Autor para correspondência

germination in CFU was obtained by Unioeste 4, CG 26 and UEL 24 at 30°C that were inoculated in complete medium at 25°C and 32°C to compare of development parameters. For all isolates there was a germination delay at 32°C and there was no difference between the isolates and neither the temperatures with percentages among 80,1 and 90,4% of colonies formed in CFU. However, for conidia production there was a reduction to all isolates at 32°C. For virulence test was observed a decrease of 88% confirmed adults mortality of *Alphitobius diaperinus* at 32°C by Unioeste 4 confirmed mortality.

Key words: Abiotic factors, entomopathogenic fungi, virulence

Introdução

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) é uma das espécies mais estudadas no controle de artrópodes no mundo, provavelmente em função da ampla distribuição geográfica e da grande variedade de hospedeiros. Quando as condições climáticas são favoráveis este patógeno pode causar epizootias naturais em populações de insetos de várias ordens (ALVES, 1998).

A temperatura é um dos fatores abióticos mais importantes para o desenvolvimento desse fungo, além de poder restringir o uso destes como agentes de controle de insetos. O uso efetivo de entomopatógenos dentro de um manejo de pragas requer, dentre outros fatores, a seleção de organismos tolerantes à temperatura nos ecossistemas envolvidos (FERNANDES et. al., 2008).

De modo geral, a faixa favorável de temperatura para *B. bassiana* é de 20 °C a 30 °C, porém, para cada estágio e espécie há uma faixa de temperatura ideal (ALVES; LEUCONA, 1998). Este fator não regula somente a fisiologia do fungo, mas também a sua capacidade de infectar o hospedeiro e para esse tipo de avaliação, devem ser considerados não só sua virulência em relação ao inseto alvo, mas sua adequação as condições ambientais (FERNANDES et. al., 2008; SOARES; MARCHAL; FERRON, 1983).

Existem exemplos na qual a tolerância a temperatura é um fator limitante ao uso desses microrganismos, como na cama-de-frango em aviários para o controle de *Alphitobius diaperinus* e também na cafeicultura para o controle de *Hypothenemus hampei* (ALEXANDRE et. al., 2006). Assim, este trabalho teve como objetivo selecionar isolados de *B. bassiana* tolerantes às temperaturas elevadas e avaliar sua virulência antes e

após a exposição a estas temperaturas.

Material e Métodos

Pré-seleção dos isolados

Foram utilizados 15 isolados de *B. bassiana* provenientes de várias regiões do Brasil, (Tabela 1) mantidos no Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Controle Microbiano de Insetos da Universidade Estadual de Londrina.

Na pré-seleção os isolados foram avaliados nas temperaturas de 30°, 35° e 40°C, sendo que a escolha das temperaturas foi realizada visando condições mais próximas a realidade de campo. As variáveis avaliadas foram: germinação dos conídios e unidades formadoras de colônias (UFC).

Para a germinação foram utilizadas placas de petri contendo 20 ml de meio completo (MC) (ALVES et al, 1998) inoculando-se 0,1 mL da suspensão do fungo padronizada em 1×10^7 conídios ml em solução aquosa de Tween 20 a 0,02% (V V⁻¹). A avaliação foi realizada 24 horas após a inoculação, com auxílio de microscópio óptico. Observaram-se aproximadamente 200 conídios, divididos em dois campos, quantificando-se os germinados e os não germinados. Para avaliação das UFC, foi preparada uma suspensão de 1×10^4 conídios ml em solução aquosa de Tween 20 a 0,02% (V V⁻¹), pulverizou-se 0,1 ml da suspensão sobre placas de Petri com MC. A avaliação foi realizada oito dias após a inoculação, quantificando-se as colônias formadas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições (placas) por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 1. Isolados, hospedeiros, (%) de conídios germinados e UFC a 30°C dos isolados de *Beauveria bassiana* que foram utilizados na pré-seleção.

Isolados	Hospedeiros	(%) Germinação	(%)UFC
UEL 24	<i>Cosmopolites sordidus</i>	34,7 a*	CC**
UEL 105	não determinado	0,6 c	0,0 c
UEL 107	Coleoptera: Cerambycidae	1,0 bc	60,5 b
CG 17	<i>Hypothenemus hampei</i>	2,2 b	44,1 b
CG 26	Coleoptera: Curculionidae	36,0 a	CC
CG 71	não determinado	3,0 b	37,7 b
CG 138	<i>Cosmopolites sordidus</i>	0,2 c	68,4 a
CG 152	Coleoptera: Chrysomelidae	1,8 b	51,2 b
CG 212	Coleoptera: Cerambycidae	1,7 b	30,1 bc
CG 481	<i>Diabrotica speciosa</i>	0,8 bc	10,5 c
Unioeste 4	<i>Alphitobius diaperinus</i>	50,0 a	CC
Unioeste 39	<i>Cosmopolites sordidus</i>	0,7 bc	64,9 b
IBCB 87	<i>Cosmopolites sordidus</i>	3,0 b	CC
IBCB 98	<i>Cosmopolites sordidus</i>	10,4 b	0,0 c
ESALQ 447	<i>Solenopsis invicta</i>	0,6 c	70,5 a

*Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P< 0,05) de significância.

**CC – Coalescência das colônias

Avaliação dos isolados expostos as temperaturas de 25°C e 32°C

Na segunda fase do estudo os isolados selecionados foram repicados em duas temperaturas (25° e 32° C) para comparação dos parâmetros avaliados. Dos 15 isolados avaliados, foram selecionados os três que se mostraram mais tolerantes as temperaturas testadas (Unioeste 4, UEL 24 e CG26). Estes isolados foram repicados novamente nas duas temperaturas por três vezes consecutivas com intervalos de 10 dias e seguindo metodologia descrita anteriormente quantificou-se a germinação e UFC. Para avaliação da produção de conídios cinco colônias de cada isolado foram utilizadas, recortando-se o centro de cada uma com um vazador circular (2,27 cm²). Os discos de meio de cultura com o fungo foram suspensos em solução aquosa de Tween 20 a 0,02% (V V⁻¹) e submetidos à agitação por 30s em “vortex”.

Após as diluições necessárias, o número de conídios foi quantificado por meio de câmara de Neubauer.

Avaliação da virulência dos isolados de B. bassiana

Com os três isolados selecionados realizou-se o teste de virulência sobre adultos de *Alphitobius diaperinus*. Os conídios obtidos após a terceira repicagem nas duas temperaturas (25° e 32°C) foram quantificados e padronizadas em 8x10⁶ que é a CL 50 determinada para adultos de *Alphitobius diaperinus* para o isolados Unioeste 4 (SANTORO et. al., 2008). Foi aplicado 0,5 ml da suspensão sobre os insetos com pulverizador Airbrush, acoplado a um compressor-aspirador Fanen-Diapump na pressão de 0,8 kgf cm⁻¹. No tratamento testemunha foi pulverizado apenas

água destilada esterilizada.

Os insetos foram acondicionados em placa de acrílico com ração para frangos, esterilizada. Os tratamentos foram mantidos em câmara climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas) e a avaliação realizada no décimo dia após a instalação do experimento, quantificando-se os insetos mortos. Em seguida, os insetos foram transferidos para câmara úmida ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas), permanecendo por cinco dias para a confirmação da mortalidade pela exteriorização do patógeno. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições de 50 insetos cada, os dados de mortalidade foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Resultados e Discussão

Pré-seleção dos isolados

Na pré-seleção a 30°C , temperatura em que ocorreu desenvolvimento de alguns isolados, observou-se uma variação na germinação de conídios, caracterizando que alguns isolados têm maior tolerância à temperatura que outros (Tabela 1). Os isolados CG 138, UEL 105, Unioeste 39 e ESALQ 447 foram os mais sensíveis a temperatura obtendo menos de um por cento de conídios germinados, já o Unioeste 4, UEL 24 e CG 26 se mostraram mais tolerantes com 50, 34,7 e 36% de conídios germinados respectivamente (Tabela 1). Com relação às UFC foi observada uma elevada variabilidade na tolerância à temperatura. As UFC foram de zero para os isolados UEL 105 e “placa cheia” para CB 98, quando não foi possível separar as colônias aos 8 dias, para os isolados UEL 24, CG 26, IBCB 87 e Unioeste 4 (Tabela 1). Neste caso a elevada porcentagem de UFC e baixa germinação podem caracterizar um atraso na

germinação e baixo efeito deletério sobre a fase de crescimento vegetativo.

Nas temperaturas de 35°C e 40°C a germinação de conídios e a UFC foram nulas para todos os isolados. Estes resultados corroboram com os obtidos por Inglis et al, (1996), que observaram baixa germinação e a inibição das UFC a 35°C . Outros autores observaram ainda que quanto maior a exposição do fungo a uma temperatura desfavorável maior é o número de conídios não germinados podendo chegar a zero (FERNANDES et. al., 2008).

Avaliação dos isolados expostos as temperatura de 25°C e 32°C

Com base nos resultados obtidos no teste anterior foram escolhidos para a segunda fase do estudo os isolados Unioeste 4, UEL 24 e CG 26 que apresentaram germinação e UFC superior aos demais isolados.

As avaliações da germinação de conídios ocorreram com 24 e 32 horas após a inoculação da suspensão de fungo. Nesses períodos não foi verificada a germinação para os três isolados. Já para as UFC não houve diferença entre os isolados nas duas temperaturas (Tabela 2). Estes dados demonstram que possivelmente ocorreu um atraso na germinação, pois houve a formação de colônias após 8 dias de incubação, assim como relatado por Alexandre et. al. (2006). Atrasos na germinação de conídios de *B. bassiana* expostos a temperaturas elevadas também foram observados por Devi et. al. (2005) e também em *M. Anisopliae* (RANGEL et. al., 2005), este atraso pode estar relacionado a necessidade do microrganismo em reparar os danos causados pela temperatura antes da germinação, como foi demonstrado em esporos de *Bacillus* sp. por Nicholson et. al. (2000).

Tabela 2. Efeito *in vitro* das temperaturas de 25°C e 32°C sobre o fungo *Beauveria bassiana*, em três variáveis do desenvolvimento.

Isolados	Germinação %		UFC*		Produção de conídios (1X10 ⁷)**	
	25°C	32°C	25°C	32°C	25°C	32°C
Unioeste 4	89,9	0	90,4Aa	80,1Ba	64,2Aa	49,4Ba
UEL 24	91,0	0	89,2Ab	87,1Ab	48,2Ab	40,8Bb
CG 26	91,2	0	89,5Ab	85,3Ab	48,6Ab	39,8Bb
CV (%)	1,71		10,27		7,14	

Médias seguidas das mesmas letras maiúscula na linha e letras minúscula na coluna dentro de cada variável não diferem entre si pelo teste de Tukey (P< 0,05) de significância. UFC* (%) Unidade formadora de colônias.** 1X10⁷ conídios ml.

A produção de conídios/colônia variou de acordo com a temperatura de incubação, sendo maior quando os fungos foram mantidos a 25°C (Tabela 2). A comparação de tais resultados com os de outros trabalhos na literatura demonstra a ampla variação existente entre isolados de fungos, haja vista que Pachamuthu, Kamble e Yuen (1999), Oliveira, Neves e Kawazoe (2003) e Andaló et. al. (2004), obtiveram entre 4,9x10⁷ a 1,6x10⁹ conídios/colônia em estudos de compatibilidade.

Mortalidade de *Alphitobius diaperinus*

Verificou-se que a temperatura afetou a virulência de *B. Bassiana*, pois o isolado Unioeste 4 foi responsável pela mortalidade confirmada de 48,1% quando este foi produzido a 25°C e de 5,8% quando produzido a 32°C (Tabela 3). Um outro estudo realizado por Alexandre et. al. (2006) mostrou resultados semelhantes onde isolados de *B. bassiana* (Unioeste 02 e Uel 25) e *Metharizium anisopliae* (Uel 50 e CB 116) foram mais virulentos a larvas de *A. diaperinus* quando mantidos a 26°C do que quando mantidos a 32°C.

Tabela 3. Mortalidade confirmada de adultos de *Alphitobius diaperinus* por isolados de *Beauveria. bassiana* com crescimento nas temperaturas de 25°C e 32°C.

Isolados	Temperatura			
	25°C		32°C	
Unioeste 4	48,1	Aa	5,8	Ba
UEL 24	1,5	Ab	0,5	Aa
CG 26	0,0	Ab	0,2	Aa
Testemunha	0,0	Ab	0	Aa

Médias seguidas das mesmas letras maiúscula na linha e letras minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P< 0,05) de significância, (CV %) = 8,34.

Os isolados UEL 24 e CG 26 não foram patogênicos em ambas as temperaturas testadas. É importante salientar que o isolado Unioeste 4 foi previamente selecionado para o controle de *A. diaperinus* por sua maior virulência a este inseto

(SANTORO et. al., 2008).

Os dados do presente estudo indicam que temperaturas mais elevadas podem comprometer a produção de conídios e a virulência do isolado.

Isto reforça a necessidade de se realizar mais testes para verificar se há uma adaptação ao microclima ou macroclima onde o entomopatógeno é aplicado, onde vive e o comportamento do hospedeiro, pois além de restrições térmicas ambientais, os fungos entomopatogênicos também podem experimentar temperaturas elevadas pela termorregulação de acolhimento, por exemplo os gafanhotos, que podem elevar a temperatura do corpo pela seleção de habitat ou ficarem sob o sol (CHAPPELL; WHITMAN, 1990). Tais exposições possivelmente podem selecionar conídios de entomopatógenos que são menos ou mais adaptados às altas temperaturas (FARGUES et. al., 1997).

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que existe uma sensibilidade diferenciada a temperaturas para isolados de *B. bassiana*. Esta sensibilidade pode ser explorada com a finalidade de se obter isolados mais adaptados às condições específicas como a cama-de frango em produção de aves, para o controle de *A. Diaperinus*, bem como em programas de controle de ectoparasitos de animais domesticados.

Conclusões

Temperaturas acima de 32°C são deletérias aos isolados de *B. bassiana* estudados, pois reduzem a produção de conídios e a virulência de entomopatógeno a adultos de *A. diaperinus*.

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida ao primeiro autor e ao produtor Anízio Fecchio, proprietário do aviário onde foram feitas as coletas dos insetos.

Referências

ALEXANDRE, T. M.; ALVES, L. F. A.; NEVES, P. M. O. J.; ALVES, S. B. Efeito da temperatura e substrato sobre *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

e sua relação no controle do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*, v. 35, n. 1, p. 75-82, 2006.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Fealq, p. 289-381, 1998.

ALVES, S. B.; ALMEIDA, J. E. M.; MOINO JUNIOR, A.; ALVES, L. F. A. Técnica de laboratório. In: ALVES, S. B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Fealq, p. 21-38, 1998.

ALVES, S. B.; LEUCONA, R. E. Epizootologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In ALVES, S. B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Fealq, p. 97-169, 1998.

ANDALÓ, V.; MOINO JUNIOR, A.; SANTA CECÍLIA, L. V. C.; SOUZA, G. C. Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com agrotóxicos visando o controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus tenxensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). *Neotropical Entomology*, v. 33, p. 468-467, 2004.

CHAPPELL, M. A.; WHITMAN, D. W. Grasshopper thermoregulation. In: CHAPMAN, R. (Ed.). *Biology of grasshoppers*. New York: Wiley, 1990, p. 143-172.

DEVI, K. U.; SRIDEVI, V.; MOHAN, C. M.; PADMAVATHI, J. Effect of high temperature and water stress on *in vitro* germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 88, n. 3, p. 181-189, 2005.

FARGUES, J.; ROUGIER, M.; GOUJET, R.; SMITS, N.; COUSTER, C.; ITIER, B. Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by nearultraviolet (UVB and UVA) and visible radiation. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 69, n. 1, p. 70-78. 1997.

FERNANDES, E. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotoleranc of *Beauveria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, Bethesda, v. 98, n. 1, p. 69-78, 2008.

NICHOLSON, W. J.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H. J.; SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64, n. 3, p. 548-572. 2000.

OLIVEIRA, C. N.; NEVES, P. M. O. J.; KAWAZOE, L. S. Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 60, n. 4, p. 663-667, 2003.

PACHAMUTHU, P.; KAMBLE, S. T.; YUEN, G. Y. Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain ESC-1 to the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) and its compatibility with insecticides. *Biol. Microb. Control*, v. 92, n. 2, p. 340-346. 1999.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; ANDRESON, A. J.; ROBETS, D. W. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 88, n. 2, p. 116-125, 2005.

SANTORO, P. H.; NEVES, P. M. O. J.; CAVAGUCHI, S. A.; CONSTANSKI, K.; AMARO, J. T.; ALVES, L. F. A.; GOMES, B. B. Controle associado de *Alphitobius diaperinus* e efeito de microrganismos eficazes no desenvolvimento de *Beauveria bassiana*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 43, n. 1, p. 1-8, 2008.

SOARES, G. G.; MARCHAL, M.; FERRON, P. Susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera, Curculionidae) larvae to *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviride* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) at two different temperatures. *Environmental Entomology*, v. 12, n. 6, p. 1886-1890, 1983.

