

**OBSERVAÇÕES SOBRE AÇÃO DO FUNGO METARRHIZIUM ANISOPLIAE
METSCHNIKOFF SOBRE ALGUMAS ESPÉCIES DE TRIATOMINAE
(HEMIPTERA, REDUVIIDAE)**

Italo A. SHERLOCK (1) e Neide GUITTON (1)

RESUMO

Esporos do fungo *Metarrhizium anisopliae* (Metsch) em meio de arroz cozido foram suspensos em água destilada e aspergidos sobre ninfas e adultos de *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis* e *Rhodnius neglectus*. Durante seis meses de observações, apenas dois exemplares se mostraram discretamente infectados pelo fungo. A mortalidade dos triatomíneos testes foi semelhante a dos controles. Esporos de *M. anisopliae* no próprio meio de cultura foram mantidos junto a exemplares de *T. infestans* e *T. brasiliensis* em fases de ninfas e adultos. Após 20 dias iniciou-se a mortalidade dos triatomíneos testes, 80% dos quais se apresentaram altamente infectados pelo fungo, enquanto que nos controles nada de anormal se verificou. Exemplares mortos de *T. infestans* altamente infectados na experiência anterior, foram colocados junto a exemplares sadios de *T. infestans* e *T. brasiliensis*, mantendo-se outro grupo para controle. Vinte dias após, iniciou-se a mortalidade dos triatomíneos, mostrando-se a maioria infectada pelo fungo. Concluiu-se que *M. anisopliae* quando utilizado em suspensão aquosa apresenta baixa infectividade para os triatomíneos. Entretanto, quando utilizado em culturas puras, é altamente infectante, demonstrando possuir também ação letal para esse reduvídeo.

I N T R O D U Ç Ã O

O fato de alguns fungos parasitarem naturalmente insetos, tem sido aproveitado por diversos pesquisadores para utilizá-los no combate a certas pragas, principalmente nos meios agrícolas (BUCHER¹; CAMERON²; DE BACH⁵; FRANZ⁷; JENKINS⁸; VISHABA & col.⁹; VEIGA & AQUINO¹⁰).

No campo dos vectores de doenças ou parasitas do homem, COCKBAIM³ observou o parasitismo do percevejo *Cimex lectularius* pelo *Aspergillus flavus* e DIAS & LEÃO⁶ infectaram *T. infestans*, *T. vitticeps* e *P. megistus* com o fungo *Beauveria bassiana*, não constatando entretanto, índices significativos de mortalidade nos lotes de triatomíneos observados. Recentemente, (COSTA⁴) fez a infecção experimental de *Rhodnius prolixus* com o fungo *Metarrhizium*

anisopliae, tendo-o reisolado desse triatomíneo e observado grande número de insetos mortos, o que julgou devido à ação do fungo.

Em nosso trabalho apresentamos os resultados de observações que realizamos relativas à ação do *M. anisopliae* sobre algumas espécies de triatomíneos, em laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Usamos triatomíneos das colônias mantidas pelo Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, alimentados com sangue de aves, em fases de ninfas de 4.º e 5.º estágios e adultos, das seguintes espécies: *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius neglectus*. A cepa inicial do fungo foi fornecida

(1) Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, da Fundação Oswaldo Cruz. Salvador, Bahia, Brasil

pelo Instituto Biológico, da Bahia e era mantida, em meio de cultura de arroz cozido em sacos de plástico, na geladeira.

A verificação da infecção do triatomíneo após ser exposto ao contacto com o fungo era feita quando esse inseto já estava morto, para o que era colocado em câmara úmida, permitindo, assim, o desenvolvimento dos esporos.

Realizamos três tipos distintos de experimentos com algumas espécies de triatomíneos, expondo-os ao contacto com o fungo e observando-os durante um ano, conforme a seguir relatamos.

Experiência I — Esporos de fungo *M. anisopliae* foram suspensos em água destilada e aspergidos sobre 10 ninfas e 10 adultos de cada uma das seguintes espécies de triatomíneo: *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius neglectus*, utilizando-se para controle 10 exemplares adultos e ninfas de cada uma das espécies mencionadas. Os triatomíneos após aspergidos com a suspensão do fungo, foram mantidos em copos de plástico forrados com papel filtro e vedados com tecido de nylon, à temperatura do laboratório (26 a 30°C). Semanalmente os triatomíneos eram postos para se alimentar em galos. Os controles foram apenas aspergidos com água destilada e mantidos em condições semelhantes.

Experiência II — Esporos de *M. anisopliae*, no próprio meio da cultura de arroz cozido, foram colocados em copos de plástico, juntamente com 10 exemplares adultos e ninfas de cada uma das espécies *T. brasiliensis* e *T. infestans*. Estes copos eram mantidos na temperatura ambiental (26 a 30°C) dentro de cristalizadores forrados com algodão úmido, de maneira a proporcionar elevada umidade no interior dos vasos. Em condições semelhantes foram mantidos exemplares para controle.

Semanalmente os triatomíneos eram postos para se alimentar em galos.

Experiência III — Exemplares mortos de *T. infestans* altamente infectados por *M. anisopliae* nas experiências anteriores, foram colocados junto a 10 exemplares adultos de cada uma das espécies: *T. infestans* e *T. brasiliensis*, mantendo-se controles em condições semelhantes. Semanalmente os triatomíneos eram postos para se alimentar em galos.

RESULTADOS

Experiência I (Tabelas I e IV) — Durante seis meses de observações, apenas dois exemplares de triatomíneo se mostraram discretamente infectados pelo fungo. A mortalidade dos triatomíneos testes foi semelhante a dos controles, sendo respectivamente 50 e 45% (Tabela IV). Durante um ano de observações, exemplares de todas as espécies dos triatomíneos, tanto as “testes” como “controles”, puseram ovos, dos quais nasceram ninfas que se desenvolveram normalmente e após sacrificadas e colocadas em câmara úmida, jamais mostraram a infecção pelo fungo. Por outro lado, alguns dos exemplares contaminados em fase de ninfas se desenvolveram normalmente e após atingirem a fase de adultos, puseram ovos que estavam viáveis. Deve-se salientar que, até 50 dias de observação, apenas 5% dos exemplares morreram, índice igual ao observado nos controles, e que é comum em colônias mantidas normalmente em laboratório. Após 50 dias e até o final da observação, morreram 50% do total dos exemplares “testes” e 45% dos “controles”. Com essa diferença estatisticamente insignificante, somos levados a admitir a quase nula ação do fungo quando usado em suspensão aquosa.

Experiência II — Com exceção de um exemplar de *T. brasiliensis* que morreu no mesmo dia de exposto ao fungo e que não se apresentou infectado, após 19 dias em que os insetos foram colocados junto a cultura de *M. anisopliae*, iniciou-se a mortalidade dos triatomíneos, 80% dos quais, após colocados em câmara úmida, se apresentaram infectados pelo fungo. Os períodos em que se verificaram mortes de triatomíneos foi de 19 a 75 dias para *T. infestans* e de 17 a 56 dias para *T. brasiliensis*, enquanto que nos controles, durante 5 meses, não houve significativamente mortes e não houve infecção de triatomíneos (Tabelas II e IV).

Experiência III — Dez dias após terem sido colocados os exemplares de *T. brasiliensis* não infectados junto a espécimes infectados pelo fungo, iniciou-se a mortalidade dos triatomíneos, e a maioria dos exemplares mortos, após colocada em câmara úmida, se mostrou infectada. A mortalidade continuou até 3 meses após. Os exemplares controles permaneceram vivos por mais tempo.

T A B E L A I

Mortalidade de quatro espécies de triatomíneos após aspergidos com suspensão aquosa de *Metarrhizium anisopliae*, de acordo com o passar dos dias

Dias após aspersão dos triatomíneos	T. infestans (*)				T. brasiliensis (*)				P. megistus (*)				R. neglectus (*)				Total					
	Teste		Controle		Teste		Controle		Teste		Controle		Teste		Controle		Teste (**)		Controle			
	mor-tos	vi-vos	mor-tos	vi-vos	mor-tos	vi-vos	mor-tos	vi-vos	mor-tos	vi-vos	mor-tos	vi-vos	mor-tos	vi-vos	mor-tos	vi-vos	% to-tal	mor-tos	vi-vos	% to-tal		
0 — 10	1	19	0	10	0	20	0	10	0	20	0	10	0	20	0	10	1	79	1,2	0	40	0
11 — 20	2	17	0	10	0	20	0	10	0	20	0	10	0	20	0	10	2	77	2,5	0	40	0
21 — 30	0	17	1	9	0	20	0	10	0	20	1	9	0	20	0	10	0	77	0	2	38	5
31 — 40	0	17	0	9	0	20	0	10	0	20	0	9	0	20	0	10	0	77	0	0	38	0
41 — 50	1	16	0	9	0	20	0	10	0	20	0	9	0	20	0	10	1	76	1,2	0	38	0
mais de 50	10	6	6	3	9	11	3	7	11	9	2	7	6	14	5	5	36	40	45,0	16	22	40

(*) Foram utilizados 20 exemplares para testes e 10 exemplares para controles, de cada espécie

(**) Prova do qui-quadrado $X^2 = 0,104$ $P > 0,05$

Já os exemplares de *T. infestans*, depois de colocados com os exemplares infectados, só começaram a morrer 28 dias após, tendo os últimos exemplares morrido após 3 meses da exposição. Muitos dos controles perduraram por mais de seis meses.

Infeção pelo *M. anisopliae*

Nos triatomíneos mortos e colocados em câmara úmida, o fungo podia ser visto a partir do segundo dia. Em geral, com sete dias, havia proliferação abundante em quase todas as articulações do corpo do inseto. O desenvolvimento do fungo se processava da seguinte maneira. Inicialmente, se percebiam gotículas transparentes, talvez de hemolinfa, que transbordavam pelas articulações das pernas, junção mole das coxas e ligações moles das placas quitinizadas dos segmentos abdominais, principalmente nas porções mais apicais do corpo do inseto (cabeça e abdomen); depois, substituindo as gotículas líquidas, apareciam massas brancas nesses tecidos moles intersegmentares e articulares. Com o passar dos dias, o fungo ia desenvolvendo-se, tornando-se amarelo esverdeado, até adquirir a cor verde musgo. Cobria então quase todo o corpo do triatomíneo, estando entretanto implantado nas partes moles das junções e articulações do corpo do inseto. Após meses, como que feixes de esporos, que ao microscópio lembravam formações esponjosas, se desprendiam do inseto e caíam no chão do vasilharne. Com o tempo mais avançado ainda, o fungo ia adquirindo coloração mais escura, até atingir o negro grafite (Fig. 1).

Observaram-se duas tonalidades (amarela-da e esverdeada) de colônias desse fungo com a mesma idade, em diferentes exemplares de triatomíneos da mesma espécie, infectados na mesma oportunidade, tratando-se provavelmente de cepas diferenciadas da mesma colônia.

Apesar de poder infectá-lo com exuberante proliferação de esporos, o fungo não parece ser muito contagioso para o triatomíneo, pois da mesma forma que os controles, jamais tivemos mortos e infecção de triatomíneos, em nossas colônias que eram mantidas em sala contígua e das observações como foram demonstrados nos triatomíneos em experiência. Sua ação letal também não parece ser muito acentuada, pois permitiu sobrevida bastante longa para alguns exemplares de triatomíneos.

T A B E L A II
Mortalidade de *T. infestans* e *T. brasiliensis* após colocados junto a culturas de *Metarrhizium anisopliae*

Dias após a exposição dos triatomíneos	<i>T. infestans</i> (*)				<i>T. brasiliensis</i> (*)			
	Teste (**)		Controle		Teste (**)		Controle	
	mortos	vivos	mortos	vivos	mortos	vivos	mortos	vivos
0 — 10	0	10	0	5	1	9	0	5
11 — 20	0	10	1	4	3	6	0	5
21 — 30	2	8	0	4	4	2	0	5
31 — 40	0	8	0	4	0	2	0	5
41 — 50	6	2	0	4	0	2	0	5
Mais de 51 até 120	2	0	2	2	2	0	5	0

(*) Foram usados 10 exemplares para teste e 5 para controle de cada espécie

(**) Prova de Fisher, $P = 0,00001$

T A B E L A III
Mortalidade de *T. infestans* e *T. brasiliensis* sadios após colocados junto a espécimes experimentalmente infestados por *Metarrhizium anisopliae*

N.º de dias após expostos	<i>T. infestans</i> (*)				<i>T. brasiliensis</i> (*)			
	Teste (**)		Controle		Teste (**)		Controle	
	mortos	vivos	mortos	vivos	mortos	vivos	mortos	vivos
0 — 10	0	10	0	5	0	10	0	5
11 — 20	0	10	0	4	2	8	0	5
21 — 30	2	8	0	4	2	6	0	5
31 — 40	1	7	0	4	0	6	0	5
41 — 50	2	5	0	4	0	6	0	5
mais de 50	5	0	2	2	6	0	0	5

(*) Foram usados 10 exemplares para teste e 5 para controle de cada espécie

(**) Prova de Fisher, $P = 0,00001$

T A B E L A IV
Mortalidade de algumas espécies de triatomíneos contaminadas pelo fungo *Metarrhizium anisopliae* em três diferentes experiências

Tipo de experiência	Espécies de triatomíneos usadas	Condição dos triatomíneos	N.º de triatomíneos utilizados	Resultados	
				Mortos	Infectados
I — aspersão de suspensão aquosa de cultura de fungo em meio de arroz (*)	<i>T. infestans</i> , <i>T. brasiliensis</i> , <i>P. megistus</i> , <i>R. neglectus</i>	Teste (**)	80	40 (50%)	2 (2,5%)
		Controle	40	18 (45%)	0
II — fungo em cultura de meio de arroz em contacto direto com os triatomíneos	<i>T. infestans</i> , <i>T. brasiliensis</i>	Teste (***)	20	20 (100%)	15 (75%)
		Controle	10	2 (20%)	0
III — triatomíneos infectados com o fungo, postos em contacto com os sadios	<i>T. infestans</i> , <i>T. brasiliensis</i>	Teste (***)	20	20 (100%)	16 (80%)
		Controle	10	2 (20%)	0

(*) Até 50 dias, apenas 5% dos testes e dos controles morreram; os restantes morreram após esse período

(**) Prova do Qui-quadrado, $X^2 = 0,104$ $P > 0,05$

(***) Prova de Fisher, $P = 0,00001$

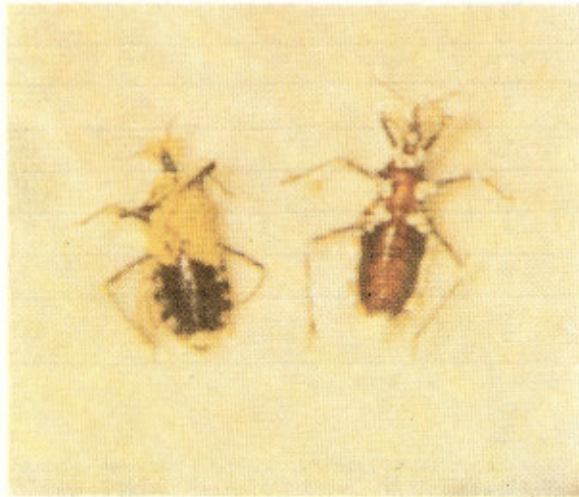


Fig. 1 — Aspectos da infecção e proliferação do fungo *Metarrhizium anisopliae* em triatomíneos experimentalmente infectados

os quais, após morrerem, foram constatados estar infectados.

Quanto aos efeitos sobre o homem e outros vertebrados, infelizmente, a não serem algumas observações não controladas, quase nada ainda se fez para verificar se existe ou não ação patogênica desse fungo para o organismo humano e para outros vertebrados, o que, fora de dúvida, é essencial para uma provável utilização prática do fungo na campanha contra os vectores da doença de Chagas. Contudo, sabemos que, o fungo é empregado na agricultura, a larga mão, além de outros, também pelos serviços da Secretaria de Agricultura do Estado da Bahia, em campanhas de combate a homópteros que são pragas de capim. Tivemos a oportunidade de observar, pessoalmente, alguns dos manipuladores do fungo, tanto no campo como no laboratório, e nelas não constatamos síndromes ou aspectos patológicos que pudessem incriminar ser *M. anisopliae* o causador.

Desde que o fungo mostrou possuir ação letal sobre os triatomíneos, acreditamos ser de muita importância que se realizem mais observações sobre esse aspecto, as quais, talvez conduzam ao aperfeiçoamento de armas menos poluentes para o combate aos triatomíneos.

DISCUSSÃO

Os esporos de *Metarrhizium anisopliae* nas experiências de laboratório que fizemos, mostraram-se infectantes para as seguintes espécies

de triatomíneos: *T. infestans*, *T. brasiliensis*, *P. megistus* e *R. neglectus*, principalmente quando utilizados em culturas puras. Entretanto, esse grau de infectividade foi drasticamente reduzido, quando os esporos do fungo foram suspensos em água. Foi possível transmitir esse fungo, a partir do contacto de triatomíneos experimentalmente infectados com exemplares sadios, tendo o fungo nesta oportunidade se mostrado bastante infectante, significando que a passagem por triatomíneos (subinoculação) aumenta a virulência do fungo para o inseto. A ação letal foi observada a partir do 10.º dia do contacto do inseto com o fungo.

Permanece obscuro o mecanismo patogênico do fungo para o organismo do triatomíneo. Parece-nos contudo que, há contaminação da hemolinfa e dos tecidos moles do inseto e não há qualquer ação sobre as partes quitinizadas do artrópode. Infelizmente, não tivemos condições de fazer estudos histopatológicos dos exemplares infectados para esclarecer esse aspecto e nem de isolar o fungo da hemolinfa dos triatomíneos.

A cultura em massa do fungo é fácil e relativamente barata, inclusive sob a forma de pó seco para ser aplicado em polvilhamentos, o que nos pareceu ser a maneira mais adequada para aplicá-lo. O método da aplicação sugerido por COSTA⁴, ou aplicação de suspensão aquosa do fungo, diminuiu a infectividade e a patogenicidade do fungo para o triatomíneo, conforme aqui demonstramos. Entretanto, isto não foi o que pareceu demonstrar COSTA⁴ no tra-

balho que apresentou ao VI Congresso Brasileiro de Microbiologia. Tivemos a oportunidade de assistir pessoalmente a apresentação desse trabalho e na ocasião discutimos sobre o método de trabalho empregado por esse Autor que não determinou sequer qual o número de exemplares observados, assim como não utilizou exemplares para controles e nem alimentou os exemplares da experiência, os quais poderiam ter morrido de fome. Portanto, apesar de ter o trabalho de COSTA⁴ o mérito de demonstrar a capacidade do fungo de infectar o triatomíneo, não pôde comprovar a ação letal do fungo para o inseto e nem informou sobre a localização do parasita nos tecidos moles do inseto. Pelo seu trabalho tem-se a impressão de que o fungo implantava-se nas partes quitinizadas do corpo do inseto. Finalizando, desejamos salientar que, apesar de termos confirmado a infecção e demonstrado a ação letal de *M. anisopliae* pela primeira vez sobre quatro espécies de triatomíneos, julgamos necessária a realização de mais observações a respeito, inclusive sobre a possibilidade de existência de patogenicidade para os vertebrados, assim, como o melhor método de fazer a contaminação dos triatomíneos em a natureza, o que talvez poderia ser feito por meio da liberação de machos propositalmente infectados, ou ainda o polvilhamento do fungo nos ecótopos onde se encontram os vectores da doença de Chagas.

SUMMARY

Observations on the action of the fungus *Metarrhizium anisopliae* METSCHNIKOFF on some species of *Triatominae* (Hemiptera, Reduviidae)

Adults and nymphs of *Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* and *Rhodnius neglectus* were sprayed with water suspension of spores of the fungus *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.). During six months two single sprayed triatomines were lightly infected with the fungus and mortality among triatomines were similar both in the test and control groups. 1) Adults and nymphs of *T. infestans* and *T. brasiliensis* were maintained together with cultures of *M. anisopliae*. After twenty days, the mortality started in the test group reaching 80% of the specimens which

were securely infected with the fungus, while only 20% of the controls (non-infected) died. 2) Adults and nymphs of *T. infestans* and *T. brasiliensis* were maintained together with dead specimens of *T. infestans* infected with *M. anisopliae*. Twenty days later the mortality of the tested specimens started, most of them were seen infected by the fungus. The control group remained normal. 3) The Authors concluded that *M. anisopliae* used in water suspension has low infectivity but when in pure state it is highly infective for triatomines, when it also seems to have lethal effect for the vectors of Chagas disease.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUCHER, G. E. — The regulation and control of insect by fungi. *Ann. Entomol. Soc. Quebec* 9: 30-42, 1964.
2. CAMERON, J. W. & MAC, B. — Factors affecting the use of microbial pathogens in insects control. *Ann. Rev. Entomol.* 8: 265-286, 1963.
3. COKBAIN, A. J. & HASTIC, A. C. — Susceptibility of the bed bug, *Cimex lectularius* Linnaeus, to *Aspergillus flavus* Link. *J. Insect Path.* 3: 95-97, 1961.
4. COSTA, M. D. de M. — Infecção experimental de *Rhodnius prolixus* (Barbeiro), criado em laboratório, pelo fungo entomógeno *Metarrhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. VI Congresso Brasileiro de Microbiologia. Resumo dos trabalhos. Salvador — Bahia, 1975.
5. DE BACH, P. — *Biological Control of Insects Pests and Weeds*. London, Chapman & Hall Ltd, 1964.
6. DIAS, J. C. P. & LEÃO, A. E. de A. — Parasitismo de fungos (*Beauveria bassiana*) sobre triatomíneos brasileiros criados em laboratório. *Atas Soc. Biol.* (Rio de Janeiro) II: 85-87, 1967.
7. FRANZ, J. M. — Biological control of pest insects in Europe. *Ann. Rev. Entomol.* 6: 183-200, 1961.
8. JENKIS, D. W. — Pathogens, parasites and predators of medically important arthropods. *Bull. World Health Org.* 30 (Suppl.): 150, 1964.
9. VISHABA, A. N.; SHAN KLAND, D. L.; CURTIS, R. W. & WILSON, M. C. — Substance inhibitory to insect feeding with insecticidal properties from fungi. *J. Econ. Entomol.* 55: 211-214, 1962.
10. VEIGA, A. F. de S. L. & AQUINO, M. de L. N. de A. G. — Nota sob o controle biológico da "Cigarrinha" das pastagens (*Homoptera, Cercopidae*) com o fungo entomógeno *Metarrhizium anisopliae* (Metsch) Sorok, no Estado de Pernambuco. *Pesq. Nord. Recife* 4: 71-72, 1972.