CONTROLE MICROBIANO DE *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832)
(ISOPTERA - TERMITIDAE) UTILIZANDO *Beauveria bassiana* (BALS.)
VUILL. E *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK.

PAULO MARÇAL FERNANDES

Engenheiro Agrônomo

Orientador: PROF. DR. SÉRGIO BATISTA ALVES

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz",
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área de Concentração: En
tomologia.

PIRACICABA
ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL
FEVEREIRO/1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

F363c Fernandes, Paulo Marçal
 Controle microbiano de Cornitermes cumulans (Kollar, 1832)
(Isoptera-Termitidae) utilizando Beauveria bassiana(Bals.) Vuill.
e Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorok. Piracicaba, 1991.
 114p.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Cupim em pastagem - Controle biológico 2. Fungo entomo-
patogênico 3. Fungo para controle biológico 4. Pastagem - Praga -
Controle biológico I. Escola Superior de Agricultura Luiz de
Queiroz, Piracicaba.

CDD 632.736

CONTROLE MICROBIANO DE *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832) (ISOPTERA - TERMITIDAE) UTILIZANDO *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. E *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK.

PAULO MARÇAL FERNANDES

Aprovado em: 01.02.1991.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Sérgio Batista Alves	- ESALQ/USP
Prof. Dr. Evôneo Berti Filho	- ESALQ/USP
Prof. Dr. Francisco A.M. Mariconi	- ESALQ/USP
Prof. Dr. Ricardo P.L. Carvalho	- UNESP/Jaboticabal
Dr. Enrico de Beni Arrigoni	- COPERSUCAR

Prof. Dr. Sérgio Batista Alves
- Orientador -

Aos meus pais, Joaquim e Leopoldina

*À minha esposa Marta e aos meus
filhos Maria Clara, Paulo Filho e
Mariana*

*À todos aqueles que acreditam que
a mediocridade não vencerá ...*

OFEREÇO E DEDICO ESTE TRABALHO

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter me dado saúde e paz durante a realização do Curso de Pós-Graduação.

Ao **Departamento de Entomologia da ESALQ** pela acolhida e por ter me colocado à disposição suas instalações e equipamentos.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Batista Alves**, pela orientação, estímulo e amizade.

Aos **Professores do Curso de Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ**, pelos ensinamentos e colaboração.

À **Universidade Federal de Goiás (U.F.G.)** pelo apoio durante a realização do Curso de Pós-Graduação.

À **Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)** pela bolsa de estudos.

Ao **CNPq, FINEP e FAPESP** pelo apoio à pesquisa no Brasil.

Aos colegas **Valquiria R.S. Veloso, Antonio H. Garcia** e demais professores do Departamento Fitossanitário da Escola de Agronomia da UFG pelo apoio e incentivo.

Aos **funcionários do Departamento de Entomologia da ESALQ**, especialmente a **Solange Vieira** pelo apoio e amizade.

Aos **funcionários da Biblioteca da ESALQ** pela colaboração e apoio.

Aos **colegas do Curso de Pós-Graduação** pelos incentivos e amizade.

Ao **Sr. Euclides Tomazella** por ter me cedido sua propriedade para realização dos experimentos.

A **Profª Drª Marineia Lara Haddad** pelo apoio estatístico.

A **Drª Eliana Marques Cancellato** do Museu de Zoologia da USP pela identificação dos cupins.

Ao **Prof. Evôneo Berti Filho** pela elaboração do Summary.

A **Sandra de Marchi Vello** pelos serviços datilográficos.

Aos **meus familiares** pelo apoio e incentivo.

A **todos** que contribuíram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS ,.....	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	x
SUMMARY	xii
 1. INTRODUÇÃO	 1
 2. REVISÃO DE LITERATURA	 4
2.1. <i>Cornitermes cumulans</i> (Kollar, 1832)	4
2.1.1. Distribuição geográfica e aspectos ecológicos	4
2.1.2. Aspectos biológicos e comportamentais	7
2.1.3. Hábito alimentar e danos às culturas	10
2.1.4. Microclima no interior do cupinzeiro	11
2.1.5. Métodos de controle	13
2.2. Estudos Envolvendo Fungos Entomopatogênicos e Cupins	16
2.2.1. Bioensaios de laboratório para seleção de fungos <u>pa</u> togênicos a cupins	17
2.2.2. Processo de infecção de fungos sobre cupins	19
2.2.3. Influência de aspectos comportamentais dos cupins na disseminação de fungos entomopatogênicos	22
2.2.4. Utilização de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria</i> <i>bassiana</i> no controle de colônias de cupins no campo.	24
2.3. Armazenamento e Formulação de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i>	24
2.4. Persistência de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> no solo e no inseto morto	30
 3. MATERIAL E MÉTODOS	 33
3.1. Estudos de Laboratório com <i>Cornitermes cumulans</i> e Fungos <u>En</u> tomopatogênicos	33

3.1.1. Seleção de recipientes e substratos para manutenção de <i>Cornitermes cumulans</i> visando a realização de bioensaios com fungos	33
3.1.2. Comparação de métodos de inoculação de <i>Beauveria bassiana</i> sobre <i>Cornitermes cumulans</i>	34
3.1.3. Bioensaios para seleção de isolados de fungos virulentos a <i>Cornitermes cumulans</i>	35
3.1.4. Longevidade de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> armazenados em diferentes formulações e ambientes	37
3.2. Controle de Colônias de <i>Cornitermes cumulans</i> por <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> em Condições de Campo ..	39
3.2.1. Comparação de isolados dos fungos no controle de colônias de <i>Cornitermes cumulans</i>	39
3.2.2. Comparação de doses dos fungos no controle de colônias de <i>Cornitermes cumulans</i>	40
3.2.3. Comparação de formulações dos fungos no controle de colônias de <i>Cornitermes cumulans</i>	41
3.2.4. Comparação de métodos de aplicação dos fungos no controle de colônias de <i>Cornitermes cumulans</i>	42
3.2.5. Sobrevivência e ciclo biológico dos fungos no interior dos cupinzeiros	43
3.2.6. Comparação dos custos de controle de colônias de <i>Cornitermes cumulans</i> utilizando inseticidas químicos e fungos	46
3.2.6.1. Inseticidas químicos	46
3.2.6.2. <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i>	47
3.3. Suscetibilidade de outras espécies de cupins a <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i>	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1. Estudos de Laboratório com <i>Cornitermes cumulans</i> e os Fungos Entomopatogênicos	50

4.1.1. Seleção de recipientes e substratos para manutenção de <i>Cornitermes cumulans</i> visando a realização de bioensaios com fungos	50
4.1.2. Comparação de métodos de inoculação de <i>Beauveria bassiana</i> isolado 760 sobre <i>Cornitermes cumulans</i>	51
4.1.3. Bioensaios para seleção de isolados de fungos virulentos a <i>Cornitermes cumulans</i>	53
4.1.4. Longevidade de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> armazenados em diferentes formulações e ambientes	60
4.2. Controle de Colônias de <i>Cornitermes cumulans</i> por <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> em Condições de Campo ...	64
4.2.1. Comparação de isolados dos fungos no controle de colônias de <i>Cornitermes cumulans</i>	64
4.2.2. Comparação de doses dos fungos no controle de colônias de <i>Cornitermes cumulans</i>	67
4.2.3. Comparação de formulações dos fungos no controle de colônias de <i>Cornitermes cumulans</i>	71
4.2.4. Comparação de métodos de aplicação dos fungos no controle de colônias de <i>Cornitermes cumulans</i>	75
4.2.5. Sobrevivência e ciclo biológico dos fungos no interior dos cupinzeiros de <i>Cornitermes cumulans</i>	80
4.2.5.1. Longevidade dos conídios dos fungos no interior dos cupinzeiros	80
4.2.5.2. Ciclo biológico dos fungos no interior dos cupinzeiros	84
a) Comportamento das colônias de <i>Cornitermes cumulans</i> e desenvolvimento dos fungos no interior dos cupinzeiros tratados	84
b) Mortalidade e conidiogênese sobre <i>Cornitermes cumulans</i> no interior dos cupinzeiros em duas épocas	90

c) Mortalidade das colônias de <i>Cornitermes</i> <i>cumulans</i> de cupinzeiros de diferentes ta manhos	93
4.2.6. Comparação de custos de controle das colônias de <i>Cornitermes cumulans</i> utilizando inseticidas quími cos e fungos	96
4.3. Suscetibilidade de Outras Espécies de Cupins a <i>Beauveria</i> <i>bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i>	99
5. CONCLUSÕES	102
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Mortalidade de colônias de <i>Cornitermes cumulans</i> polvilha <u>do</u> com <i>Metarhizium anisopliae</i> utilizando diferentes m <u>ét</u> odos de aplicação	78
Figura 2. Mortalidade de colônias de <i>Cornitermes cumulans</i> polvilha <u>das</u> com <i>Beauveria bassiana</i> utilizando diferentes m <u>ét</u> odos de aplicação	79
Figura 3. Longevidade de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhi</i> <u>zium anisopliae</u> no interior de cupinzeiros de <i>Corniter</i> <u>mes cumulans</u> em Piracicaba - SP.....	81
Figura 4. Mortalidade e conidiogênese sobre <i>Cornitermes</i> <i>cumulans</i> no interior de cupinzeiros polvilhados com <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> em duas épocas	92
Figura 5. Mortalidade de colônias de <i>Cornitermes cumulans</i> em cupin <u>zeiros</u> de diferentes tamanhos polvilhados com <i>Beauveria bassiana</i> ou <i>Metarhizium anisopliae</i>	95

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Dados referentes aos isolados de fungos testados sobre <i>Cornitermes cumulans</i>	36
Tabela 2. Mortalidade de <i>Cornitermes cumulans</i> inoculados com <i>Beauveria bassiana</i> , utilizando diferentes métodos, em laboratório	52
Tabela 3. Virulência de 10 isolados de fungos a <i>Cornitermes cumulans</i> em laboratório	54
Tabela 4. Virulência de 5 isolados de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> a <i>Cornitermes cumulans</i> em laboratório..	55
Tabela 5. Viabilidade média (%) de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> armazenados em diferentes formulações e ambientes, durante 6 meses	60
Tabela 6. Mortalidade e conidiogênese sobre <i>Cornitermes cumulans</i> no interior de cupinzeiros polvilhados com diferentes isolados de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i>	65
Tabela 7. Produção de conídios por diferentes isolados de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> pelo método da bandeja	67
Tabela 8. Mortalidade e conidiogênese sobre <i>Cornitermes cumulans</i> no interior de cupinzeiros polvilhados com diversas doses de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i>	68
Tabela 9. Doses letais de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> para controle de colônias de <i>Cornitermes cumulans</i>	70

Tabela 10. Mortalidade de <i>Cornitermes cumulans</i> no interior de cupinzeiros polvilhados com diversas formulações de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i>	72
Tabela 11. Mortalidade e conidiogênese sobre <i>Cornitermes cumulans</i> no interior de cupinzeiros polvilhados com <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> utilizando diferentes métodos	76
Tabela 12. Virulência de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i> a <i>Cornitermes cumulans</i> , em laboratório, após 30, 45 e 90 dias no interior de cupinzeiros no campo	83
Tabela 13. Tempos letais de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> para controle de colônias de <i>Cornitermes cumulans</i> em duas épocas	91
Tabela 14. Tempos letais de <i>Beauveria bassiana</i> ou <i>Metarhizium anisopliae</i> para controle de colônias de <i>Cornitermes cumulans</i> em cupinzeiros de diferentes tamanhos	94
Tabela 15. Custos de controle de colônias de <i>Cornitermes cumulans</i> utilizando inseticidas químicos e fungos.....	97
Tabela 16. Patogenicidade de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> a diversas espécies de cupins em Piracicaba (SP) e Goiânia (GO)	100

CONTROLE MICROBIANO DE *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832)
(ISOPTERA - TERMITIDAE) UTILIZANDO *Beauveria bassiana* (BALS.)
VUILL. E *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK.

Autor: Paulo Marçal Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Batista Alves

RESUMO

Estudou-se em laboratório e campo a potencialidade dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhi*zium *anisopliae* (Metsch.) Sorok. como alternativa biológica no controle de colônias de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832), importante praga das pastagens no Brasil. Em bioensaio de laboratório selecionaram-se isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* com alta virulência a *C. cumulans* os quais foram, posteriormente, comparados em testes de campo, obtendo-se 2 isolados (1 de *B. bassiana* e 1 de *M. anisopliae*) que provocaram 100% de mortalidade e elevado índice de conidiação sobre os cadáveres. Foram feitos outros testes de campo para estudo de doses, formulações, métodos e épocas de aplicação e sobrevivência dos fungos no interior dos cupinzeiros de *C. cumulans*. A dose de 2 g de conídios puros, aplicada com uma polvilhadeira manual, provocou mais de 90% de mortalidade das colônias pelas 2 espécies de fungos. A espécie *B. bassiana* foi mais eficiente no inverno e *M. anisopliae* no verão. Conídios de *M. anisopliae* se mantiveram viáveis e virulentos a *C.*

cumulans, no mínimo, por 90 dias no interior dos cupinzeiros, enquanto *B. bassiana* perdeu a viabilidade em menos de 45 dias. Comprovou-se também, em bioensaios de laboratório e testes de campo, a patogenicidade e eficiência desses fungos no controle das seguintes espécies de cupins: *Cornitermes snyderi* Emerson, *Syntermes* sp., *Cryptotermes* sp., *Coptotermes havilandii* Holmgren, *Heterotermes* sp. e *Nasutitermes* sp. Na comparação de custos de controle entre *B. bassiana*, *M. anisopliae* e três inseticidas químicos, ficou evidente que os fungos são mais econômicos que os inseticidas químicos para o controle de *C. cumulans*.

MICROBIAL CONTROL OF *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832)(ISOP
TERA, TERMITIDAE) WITH *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. AND
Metarhizium anisopliae (METSCH.) SOROK.

Author: Paulo Marçal Fernandes

Adviser: Prof. Dr. Sérgio Batista Alves

SUMMARY

This research deals with the use of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. as a biological alternative on the control of *Cornitermes cumulans* (Kollar), an important pest of pastures in Brazil. Isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae* highly virulents to *C. cumulans* were selected by laboratory bioassays and compared in field tests. From these field tests two isolates were selected, one of *B. bassiana* and one of *M. anisopliae*, which caused 100% of mortality and a high index of conidiation on the dead termites. Field tests were also carried out to determine dosages, formulations, methods and time of application, as well as the survival of the fungi inside the nests of *C. cumulans*. The dosage of 2 g of pure conidia, applied by dusting, caused more than 90% of mortality of the termite nests by the two species of fungi. *B. bassiana* was more effective in the wintertime while *M. anisopliae* was more effective in the summertime. The *M. anisopliae* conidia were viable and virulent to *C. cumulans* for at least 90 days inside the

termite nests, whereas the *B. bassiana* ones lost the viability in less than 45 days. The laboratory bioassays and the field tests also confirmed the pathogenicity and efficiency of these fungi on the control of the following species of termites: *Cornitermes snyderi* Emerson, *Syntermes* sp., *Cryptotermes* sp., *Coptotermes havilandi* Holmgren, *Heterotermes* sp. and *Nasutitermes* sp. The comparison of costs of control among *B. bassiana*, *M. anisopliae* and three chemical insecticides indicated that the fungi are more economical than the chemical insecticides on the control of *C. cumulans*.

1. INTRODUÇÃO

O cupim de montículo *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832) infesta a maioria das pastagens na região centro-sul do Brasil. Embora seus danos às plantas sejam pouco conhecidos, são considerados pragas, pois ocorrem em altas densidades, reduzindo a área útil de pastoreio, dificultando tratos culturais e depreciando as propriedades agrícolas. Atualmente, o principal método de controle desta espécie de cupim é através da utilização dos inseticidas químicos, os quais apresentam eficiência variável; são tóxicos aos animais e poluem o ambiente.

Os cupins apresentam aspectos biológicos, ecológicos e comportamentais que favorecem os fungos entomopatogênicos como *Beauveria*, *Metarhizium* e outros. A maioria dos fungos entomopatogênicos apresentam desenvolvimento ótimo sob umidades relativas próximas ao ponto de saturação e temperaturas entre 20 e 30°C (ROBERTS & YENDOL, 1971) e são muito sensíveis aos efeitos da radiação solar (ALVES, 1986a). Em ninhos de *C. cumulans* a temperatura é mantida próxima a 20°C e a umidade relativa próxima a 100% (PARRA et alii, 1974), e como estes insetos são fototrópicos negativos, o ambiente no interior do cupinzeiro é sempre escuro. Além disso, certos aspectos comportamento

tais e biológicos dos cupins, como: trofolaxia, canibalismo, lambimento do corpo e fisogastria da rainha, facilitam a disseminação dos fungos e o desenvolvimento de epizootias nas colônias.

Visando estudar as potencialidades dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* no controle de *C. cumulans*, foi desenvolvido o presente trabalho com os seguintes objetivos:

- Selecionar isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* virulentos a *C. cumulans* em laboratório e eficientes no controle das colônias no campo.

- Comparar, sob condições de campo, a eficiência de controle de colônias de *C. cumulans* com diferentes doses, formulações e métodos de aplicação de *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

- Comparar a longevidade de conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* armazenados em diferentes formulações e ambientes.

- Comparar o ciclo de vida e persistência de conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* polvilhados no interior de cupinzeiros de *C. cumulans* no campo.

- Verificar a suscetibilidade de outras espécies de cupins e a eficiência de controle de colônias em outros

locais, utilizando os isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* que apresentaram maior eficiência de controle de colônias de *C. cumulans* em Piracicaba (SP).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832)

2.1.1. Distribuição geográfica e aspectos ecológicos

De acordo com o mapa de distribuição geográfica de *Cornitermes cumulans* elaborado por CANCELLO (1989), observa-se que esta espécie ocorre em toda região centro-sul do Brasil (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) e também no Estado da Bahia. Em outros países tem sido referido na Argentina e Paraguai. TORALES (1982) afirmou que o gênero *Cornitermes* se distribui principalmente nas regiões de florestas tropicais e cerrados da América do Sul e que a temperatura, umidade e competição têm sido considerados como fatores limitantes em sua distribuição. Ainda segundo esta autora, *C. cumulans* faz parte das espécies que habitam regiões de invernos amenos e verões muito quentes.

Embora a distribuição do gênero *Cornitermes* possa estar limitada a certas regiões da América do Sul, em função dos fatores climáticos, é inegável que a densidade populacional de cupinzeiros de *Cornitermes* e outros gêneros subterrâ

neos e também de montículo, tem aumentado devido ao intenso desmatamento de florestas e cerrados nas últimas décadas. Segundo WOOD (1975), estudos conduzidos na Austrália e África demonstraram que o desmatamento parcial ou total de florestas e savanas provocaram alterações qualitativas e quantitativas na fauna de cupins. BANDEIRA (1979) estudou a distribuição e diversidade de cupins em áreas de floresta primária, capoeira e pastagem na Amazônia Central no Estado do Amazonas. Segundo o autor o número total de ninhos de cupins foi maior na pastagem do que na floresta primária. *Nasutitermes* foi o gênero mais frequente (30 espécies encontradas sendo 16 na pastagem, 13 na capoeira e 10 na floresta), mas 4 espécies de *Cornitermes* foram encontrados nos três tipos de vegetação.

Espécies de *Cornitermes* e outros cupins de montículo e subterrâneos proliferam rapidamente em áreas desmatadas e formadas com pastagem. Aparentemente o ambiente onde prevalece a vegetação herbácea, após desmatamento ou não, favorece estas espécies. Áreas de campo limpo naturais como no Parque Nacional de Emas no Estado de Goiás apresentaram em média 55 cupinzeiros de *C. cumulans* por hectare (REDFORD, 1984). Além disso, o desmatamento pode reduzir a competição interespecífica, pela eliminação de espécies de cupins arborícolas e outras, que não se adaptam ao ambiente desmatado. Predadores de cupins como formigas, pássaros, tatus, tamanduás, etc., podem desaparecer completamente após o desmatamento.

O papel de cupinzeiros de *C. cumulans* na ecologia do cerrado no Parque Nacional de Emas e proximidades, foi estudado por REDFORD (1984). Este autor comparou a densidade por hectare, taxa de abandono de ninhos, estrutura e habitantes adicionais de cupinzeiros de *C. cumulans*, com outras quatro espécies que constroem ninhos de barro (*Velocitermes* heteropterus, *Syntermes* dirus, *Orthognathotermes* gibberorum e *Armitermes* euamignathus). A densidade média para as cinco espécies foi de 323 cupinzeiros por hectare, sendo a mais frequente *O. gibberorum* com 204 e em seguida *C. cumulans* com 55 cupinzeiros. *C. cumulans* apresentou a menor taxa de abandono. Pelo menos 17 espécies de cupins e 10 de formigas foram encontradas habitando cupinzeiros de *C. cumulans*. Foi encontrada uma forte correlação entre ataques por tatus e ausência de colônias de *C. cumulans*. Outros animais como opiliões, escorpiões, aranhas, centopéias, miriápodos, abelhas, vespas, ratos, lagartos e cobras (vivendo na base dos cupinzeiros), insetos termítófilos (Elateridae, Tenebrionidae, Cicindelidae, Asilidae), passáros, aves (cupinzeiro substitui as árvores), tatus, felinos e tamanduás utilizam de alguma forma os cupinzeiros de *C. cumulans*, fazendo com que esta espécie tenha uma grande importância na ecologia do cerrado e contribui para que *C. cumulans* seja considerada uma espécie-chave.

Segundo WOOD (1975) ainda não há informações precisas sobre as espécies de cupins húmícolas e outras que não danificam diretamente as culturas, para se afirmar que estes

cupins apresentam efeitos benéficos para a estrutura e fertilidade do solo ou provocam danos indiretos às plantas. PERES FILHO et alii (1990) efetuaram análises química e textural do cupinzeiro de *C. cumulans* e do solo próximo a este e concluíram que o material do cupinzeiro, principalmente o cartão, é mais rico em nutrientes do que o solo local e que toda camada externa é mais rica em argila.

2.1.2. Aspectos biológicos e comportamentais

Apesar de existirem muitos trabalhos sobre a biologia e hábitos de outras espécies de cupins, pouco tem sido realizado com *Cornitermes cumulans*. GRASSÉ (1958), estudando a arquitetura dos ninhos de *Cornitermes cumulans* no Estado de São Paulo, apresentou três fases do crescimento dos ninhos: hipógea, hipógea-epígea e epígea. Na primeira fase (hipógea) o ninho é totalmente subterrâneo, de forma oval e com 30 cm de diâmetro e as galerias de saída estão na parte inferior do ninho. Na segunda fase (hipógea-epígea) o ninho apresenta duas zonas distintas: o ninho subterrâneo com canais de saída inferiores e laterais e a calota externa (epígea). Na terceira fase o ninho apresenta seu aspecto definitivo com paredes mais sólidas, podendo atingir 1,60 m de altura e 0,95 m de diâmetro basal. O ninho é então muito duro externamente, constituído, de fora para dentro, por uma grossa parede de argila e saliva, seguindo-se uma região chamada paraécia (um espaço vazio entre a pa

rede externa e a parte interna) e a região mais interna, bem mais mole, escura e com muitas galerias de aspecto característico. Nas galerias existem acúmulos de uma mistura de fezes e resíduos vegetais, que são utilizados na construção e revestimento das mesmas. Ainda segundo GRASSÉ (1958), o casal real não vive numa câmara real específica e a rainha, embora fisiogástrica, se move de uma câmara a outra e no período de abril e maio poucos ovos são encontrados nos ninhos.

CUNHA (1961) faz um relato minucioso da vida e costumes dos cupins, após observações diárias, e durante 10 anos, de colônias de *Cornitermes cumulans* principalmente. "Uma rainha coletada juntamente com operários foi observada colocando 40 ovos por minuto. Os operários fazem pequenos aglomerados com os ovos. A postura em ninhos no campo diminui à medida que diminuem as chuvas e seca o solo e subsolo. No forte das águas é máxima. Em agosto, setembro e outubro, quando ainda não chove no Brasil-Central, a produção é infima, se não nula. As rainhas ao se tornarem pesadonas buscam uma câmara folgada na parte inferior do ninho, abaixo do nível do solo. Somente se movimentam por todo ninho quando leve e deixa os ovos a esmo. A rainha necessita de uma multidão de servidores. Rainhas de substituição ou formas neotênicas (aleluias sem asas) podem substituir a rainha em caso de morte desta. Estas formas são ágeis e põem poucos ovos, o que é compensado pelo grande número delas. O rei é raro em espécies mais evoluídas como *C. cumulans*. Os operários efetuam todos serviços da comunidade (cons

trução, reparo etc.), cuidam da rainha e demais castas, e além disso são o "aparelho digestivo da comunidade" pois buscam, mastigam e digerem o alimento sendo que uma parte elabora da é vomitada nas bocas das ninfas, rainha, soldados etc. (trofolaxia). O soldado é bom protetor apenas nas entradas das galerias. Quando o ninho é invadido por formigas, praticamente um operário é capturado por formiga, mas esta é a forma de defesa deles, preservam a rainha e tudo bem. Os *Cornitermes* são extraordinariamente prolíficos e a postura chega a milhares de ovos por dia nas épocas chuvosas. Após a eclosão as ninfas são levadas para outras partes do ninho pelos operários que as alimentam por alguns dias, quando então passam a cuidar de si, lambendo as paredes das galerias cobertas de fezes dos operários adultos. A principal maneira de disseminação dos *Cornitermes* e outras espécies próximas é a migração de operários, soldados, ninfas e ovos carregados, e raramente uma rainha. Em dois ou três anos o cupinzeiro aflora à terra".

TORALES (1982-84), estudou aspectos biológicos e comportamentais de *Cornitermes cumulans* de seis colônias mantidas em laboratório. Sobre a arquitetura do ninho a autora concorda com a descrição de GRASSÉ (1958). Acrescenta que as células da parte central do ninho são ocupadas por ninfas de diversos tamanhos e por acúmulos de ovos, e, em uma célula aparentemente sem nenhuma característica especial, se encontra a rainha sempre rodeada de operários e soldados. Os operários tocam continuamente a rainha com as antenas e palpos nas pleuras e parte posterior do abdômem e isto estimula a mesma a colocar

ovos que são levados pelos operários. A autora observou ainda, que os indivíduos mortos foram aglomerados com areia e cimento retal ou apareciam em bolas de terra amassada misturada com partículas de alimento.

2.1.3. Hábito alimentar e danos às culturas

Segundo NOGUEIRA (1981) *Cornitermes cumulans* é uma espécie humívora, pois concentra grandes quantidades de matéria orgânica em suas câmaras de celulose. Segundo Negret & Redford (1982)¹, citados por CANCELLO (1989), estes cupins alimentam-se de capim e ervas vivas ou mortas. O capim é cortado em pequenos pedaços que são levados para o ninho. Em testes preliminares de laboratório sobre a preferência alimentar de *C. cumulans*, os autores observaram que os operários coletaram mais capim morto do que vivo e quando foi oferecido apenas raízes ou folhas mortas, eles preferiram as últimas.

TORALES (1982-84) ofereceu diversos tipos de alimentos a *C. cumulans* provenientes de colônias mantidas em laboratório. Os alimentos oferecidos foram farinhas, serragem de madeira, sementes de capim, diversas partes da planta de milho e de eucaliptos secos, etc. A autora observou se o alimento foi

¹ NEGRET, H.C. & REDFORD, K.H. The biology of nine termite species (Termitidae: Isoptera) from the cerrado of Central Brasil. *Psyche*, **89**: 81-106, 1982.

acêito, transportado e armazenado. Os alimentos preferidos foram: neston, sémola, farinha de milho, aveia e serragem ("as serrin"). No interior do ninho estes alimentos foram cortados em pedaços pequenos e misturados dando a impressão de terem sido mastigados antes de serem depositados nas câmaras.

Os danos de *C. cumulans* à plantas cultivadas ainda necessitam de maiores estudos, pois até o momento somente duas citações de observações de danos foram encontradas. ARAUJO (1970) afirma que esta espécie foi encontrada atacando raízes e sementes de milho e raízes de arroz. Segundo CANCELLO (1989) *C. cumulans* ataca plantações como cana-de-açúcar, milho, arroz, café, amendoim, além de plantações de eucaliptos (dados contidos nas fichas de registro do Museu de Zoologia da USP).

Recentemente FERNANDES & ALVES² obtiveram, em laboratório, danos significativos de *C. cumulans* em sementes e plântulas de milho.

2.1.4. Microclima no interior do cupinzeiro

Segundo NOIROT (1970), de um modo geral, os ninhos

²FERNANDES, P.M. & ALVES, S.B. (ESALQ/USP, Piracicaba, SP). Hábito alimentar e danos as culturas de *Cornitermes cumulans* em laboratório. (Em elaboração).

nhos dos cupins apresentam um microclima diferente do ambiente ao redor e a temperatura, umidade relativa e atmosfera interna são os fatores mais importantes. A temperatura no interior do ninho varia com a espécie e com o tipo de ninho (arbóreo, subterrâneo etc.) e aparentemente é regulada pelos cupins e não somente devido a estrutura do ninho, pois alguns cupinzeiros como os de *Nasutitermes exitiosus* apresentam temperatura interna superior a do solo ao redor, mas quando o ninho é morto a temperatura fica igual à do solo. Com relação à umidade relativa, COLLINS (1969) afirma que, de um modo geral, os cupins são muito sensíveis a dessecação devido a pouca quitinização da cutícula e baixa capacidade de retenção de água, e por isso a umidade relativa no interior do ninho é sempre mantida alta (maior que 90%).

NOIROT (1970) afirmou que os dados sobre a composição do ar no interior de cupinzeiros são limitados. A concentração de gás carbônico no cupinzeiro é alta, mas inferior a 3% na maioria dos trabalhos de pesquisa já realizados. Além disso, os níveis de gás carbônico nos cupinzeiros são sempre inferiores aos limites de tolerância dos cupins que são muito resistentes a este gás e também aos baixos níveis de oxigênio.

PARRA et alii (1974) realizaram medições de temperatura e umidade relativa, utilizando pares termoeletricos, no interior de colônias de insetos sociais como: saúvas, abelhas, formiga "quem-quem" e em cupinzeiro de *Cornitermes cumu*

laens. A temperatura no interior do cupinzeiro de *C. cumulans* durante 24 horas variou de 18 a 22°C e a umidade relativa esteve sempre próxima a 100%.

2.1.5. Métodos de controle

Há várias décadas vêm sendo feitas tentativas de controle de *Cornitermes cumulans* e outras espécies que infestam pastagens, utilizando-se diferentes métodos e produtos cupinícidias. MONTE (1941) recomendou o sal verde-paris em solução aquosa (50 g/l) que deve ser derramado diretamente sobre a camada escurecida (celulósica), após a retirada de um tampão na parte superior do ninho. A fumigação com uma mistura de arsênico e enxôfre foi indicada por MONTE (1941) e FONSECA (1944). FONSECA (1944) indicou arrancamento, quebra e queima dos ninhos. Esse mesmo autor em 1945 recomendou a utilização do fogo no controle dos montículos grandes, fazendo-se uma perfuração vertical e uma lateral, de modo semelhante a um forno de barro e, em seguida, a introdução de uma mecha de pano de ania gens com combustível e posterior ateamento de fogo. Embora possa ser eficiente, a utilização do fogo é um método demorado e requer, por medida de segurança, certos cuidados na sua execução, principalmente na estação seca do ano (VANETTI, 1959).

A eliminação mecânica dos ninhos recomendada por CUNHA (1935) e MONTE (1941), não se constitui em um método efi

ciente de controle, devido ao aparecimento de "reis e rainhas de substituição" (ARAUJO, 1940), levando à multiplicação dos ninhos.

O controle de *C. cumulans* utilizando inseticidas químicos, principalmente os clorados, foi iniciado por VANETTI (1959). Este autor testou a eficiência de vários inseticidas clorados, na forma de emulsão e pó molhável, juntamente com o sal verde-paris. De um modo geral, o tratamento na forma líquida foi mais eficiente que na forma de pó. O verde-paris apresentou eficiência de controle inferior a 40%. Os melhores inseticidas foram Aldrex (8,4 g de i.a./ninho), Dieldrex (8,1 g i. a./ninho) e Nitrosin (1,8 g i.a./ninho), que alcançaram 90% de controle após 150 dias da aplicação.

AMANTE (1963) testou 11 produtos, sendo 5 clorados (emulsões e pós), dois fosforados (pó e granulado) e os demais de composição variável, sob forma líquida. A avaliação foi feita após 95 dias. Os concentrados emulsionáveis se mostraram mais eficientes do que os líquidos, pós e granulados, atingindo a mortalidade de 81,5%; 77,8% e 74,7% para o Telodrin CE15%, Aldrex CE40% e Endrex CE20%, respectivamente. FURQUIM et alii (1968) testaram 10 inseticidas, sendo que apenas o concentrado emulsionável de isobenzã (Telodrin) apresentou eficiência de controle de *C. cumulans*. NAKANO & PROSPERO (1969) compararam inseticidas clorados, fosforados e carbamatos no controle de ninhos de *C. cumulans*. Após 30 dias, apenas Nitrosin (Aldrin +

Paradiclorobenzeno) e Paration Etílico apresentaram 100% de eficiência de controle.

MARICONI et alii (1971a) compararam os inseticidas considerados eficientes no controle de *C. cumulans* naquela época, mais a fosfina e aldrin em pó e três métodos de aplicação (perfuração aberta, fechada e retirada da parte superior do ninho). A avaliação foi feita 19 meses após os tratamentos. Os resultados mostraram que não houve influência do método de aplicação. Os inseticidas Nitrosin, Endrin e Telodrin foram os mais eficientes atingindo 100% de mortalidade dos ninhos tratados. A eficiência de Nitrosin e a ineficiência da fosfina foram confirmadas por MARICONI et alii (1971b). Em outro ensaio semelhante (MARICONI et alii, 1976), resultados de alta eficiência de controle de ninhos de *C. cumulans* foram obtidos com o fention e endossulfan.

O uso de iscas inseticidas granuladas no controle de *C. cumulans* foi testado por NOGUEIRA et alii (1971). Estes autores compararam 4 iscas formicidas granuladas, à base de heptacloro, nonacloro, aldrin e dodecacloro e obtiveram um controle de 90% com esta última. Estes resultados foram confirmados por MARICONI et alii (1977). Entretanto estas iscas granuladas têm apresentado resultados variáveis no controle de cupinzeiros em pastagem no Estado de Goiás, conforme comunicação pessoal de agrônômicos e agricultores daquela região.

MARICONI et alii (1989) compararam os inseticidas

fention (P.S. 5% - 1,00 g i.a./ninho; CE 50% com 250 e 1,25 g i.a./ninho) e dodecacloro (Mirex G 0,45% - 0,18 g i.a./ninho) no primeiro local e fention (CE 50% - 1,00 g i.a./ninho), aldoxicarbe (65% - 1,00 g i.a./ninho), bifentrina (CE 10% - 0,20 g i.a./ninho), profenofós (CE 50% - 1,00 g i.a./ninho) e dodecacloro (Mirex G 0,45% - 0,18 g i.a./ninho) no segundo local. A avaliação foi feita após 6 e 8 meses e os melhores inseticidas (100% de ninhos mortos) foram o dodecacloro e o fention CE 50% com 2,50 e 1,00 g de ingrediente ativo (i.a.) por ninho.

2.2. Estudos Envolvendo Fungos Entomopatogênicos e Cupins

Os principais trabalhos envolvendo fungos e outros entomopatógenos e diversas espécies de cupins foram desenvolvidos nas duas últimas décadas. LUND (1971), escrevendo um capítulo sobre controle microbiano de térmitas, não foi além de escassas citações resumidas em duas páginas. Este autor cita algumas tentativas de utilização de patógenos como *Aspergillus flavus*, *Serratia marcescens*, *Entomophthora virulenta*, *Bacillus thuringiensis*, *Absidia caerulea* e outros, no controle de termitas como *Reticulitermes* spp. De centenas de patógenos avaliados em laboratório, poucos apresentavam potencial para justificar estudos de controle no campo.

2.2.1. Bioensaios de laboratório para seleção de fungos patogênicos a cupins

KO et alii (1982) comprovaram a presença de fungos entomopatogênicos em amostras de solo de certas regiões do Hawaii, nas quais a longevidade de *Coptotermes formosanus* era muito baixa. Os cupins foram incubados em 20 amostras de solo coletadas de diferentes regiões do Hawaii. De 75 a 100% dos cupins morreram em duas semanas em sete das nove amostras da região de Kamuela. Após plaqueamento dos cadáveres, foram isolados *Entomophthora coronata*, *Metarhizium anisopliae*, *Aspergillus flavus* e uma bactéria não identificada, presentes em 60 a 100% dos mortos. Inoculando *E. coronata* e *M. anisopliae* em amostras de solo utilizadas como controle no experimento anterior (Região de Hilo), os autores comprovaram a influência destes fungos na baixa longevidade de *Coptotermes formosanus* nas amostras de Kamuela.

LAI et alii (1982) avaliaram a patogenicidade de um isolado de *Beauveria bassiana*, dois isolados de *Beauveria* sp. e três isolados de *Metarhizium anisopliae* a operários de *Coptotermes formosanus*. Com exceção de um isolado *Metarhizium anisopliae* foi mais patogênico que *Beauveria* spp. Os tempos letais variaram com a dosagem do patógeno, mas os LT₅₀ foram de 4,6 dias para *Beauveria* sp. (Dose de 3.137,8 conídios/mg de peso do inseto) e de 4,2 dias para *Metarhizium anisopliae* (dose de 1.148 conídios/mg).

HANEL (1981) testou a virulência de um isolado de *Metarhizium anisopliae* a operários de *Nasutitermes exitiosus*. O autor realizou uma série de 8 bioensaios, cada um com 6 concentrações do fungo (de $1,29 \times 10^3$ a $1,29 \times 10^7$ conídios/ml) que foram pulverizadas sobre os insetos. A concentração letal média (LC_{50}) aos 8 dias foi de $5,16 \times 10^5$ conídios/ml e aos 11 dias foi de $3,56 \times 10^4$ conídios/ml. O autor afirma que um único conídio foi suficiente para matar um cupim nas condições do bioensaio. HANEL (1982a) testou a eficiência de controle de *Nasutitermes exitiosus* em laboratório utilizando 3 isolados de *Conidiobolus obscurus*, 10 isolados de *Entomophthora virulenta*, 3 isolados de *Metarhizium anisopliae*, 2 isolados de *Paecilomyces fumoso-roseus* e 4 isolados de *Absidia coerulea*. O autor selecionou os melhores isolados de acordo com a infectividade a operários, ninfas e soldados, crescimento e esporulação do fungo em duas temperaturas (25-27 e 30-31°C) e tempo de sobrevivência de estágios infectivos. Somente *M. anisopliae* preencheu as três exigências. Em seguida o autor comparou, em outra série de bioensaios, os três isolados de *M. anisopliae*. A mortalidade foi avaliada durante 15 dias e os cadáveres foram colocados em câmara úmida por duas semanas e em três temperaturas (26, 30 e 31°C), para avaliar a dominância de *M. anisopliae* sobre fungos e bactérias saprofíticas. Apenas um dos isolados de *M. anisopliae* esporulou bem sobre os cadáveres e foi dominante em relação aos fungos e bactérias saprofíticas.

2.2.2. Processo de infecção de fungos sobre cupins

O processo de infecção de insetos por fungos foi dividido por ROBERTS & HUMBER (1981) em várias fases: fixação de conídio na cutícula, germinação, penetração, crescimento na hemocèle, produção de toxinas, morte do hospedeiro, invasão de todos órgãos do hospedeiro, crescimento externo do fungo, produção de unidades infectivas e dispersão das mesmas. Ainda segundo estes autores, a penetração da cutícula envolve ação física e enzimática, mas as enzimas envolvidas no processo não foram ainda identificadas, e a morte do hospedeiro, devido a toxinas, pode ser precedida de sintomas como: tremores, perda de coordenação e busca de partes mais elevadas do substrato. ALVES (1986b) afirmou que a morte do inseto, 4 a 5 dias após a inoculação com fungos ocorre devido à produção de micotoxinas, mudanças patológicas na hemocèle, ação histolítica, bloqueio mecânico do aparelho digestivo devido ao crescimento vegetativo e a outros danos físicos decorrentes do crescimento do micélio.

O processo de infecção de cupins por fungos entomopatogênicos pode apresentar alguns aspectos peculiares em relação ao descrito acima para insetos de um modo geral, devido a características morfológicas e comportamentais destes insetos sociais. YENDOL & PASCHKE (1965) estudaram a patologia da infecção do cupim subterrâneo *Reticulitermes flavipes* por *Entomophthora coronata* e *E. virulenta*. *E. coronata* provo

cou mortalidade de 97% dos cupins em 84 horas após inoculação, enquanto *E. virulenta* foi inócuo para *R. flavipes*. Os autores afirmaram que *E. coronata* matou os cupins em até 12 horas após inoculação e a morte foi precedida de paralisia, perda de coordenação e incapacidade de voltar a posição normal quando colocados dorsalmente. A penetração do tegumento ocorreu 12 horas após inoculação, em diversas partes do corpo do cupim, e com a mesma frequência para áreas esclerotizadas ou não. Antes da morte do inseto o fungo não havia invadido profundamente a hemocèle. Os autores observaram a penetração de conídios apenas na parede do esôfago no tubo digestivo. Alterações histológicas e histoquímicas no tegumento e bioquímicas na hemolinfa de rainhas de *Odontotermes obesus* infectadas com *Aspergillus flavus* foram estudadas por SANNASI (1969a,b). O autor observou que a epicutícula na região dos escleritos foi levantada no ponto de penetração do fungo e as camadas da endocutícula foram empurradas para baixo. Além disso, a endocutícula da região intersegmental também apresentou melanização nos pontos de penetração do fungo. Durante a infecção, a endocutícula apresentou uma grande quantidade de polifenóis e o teor de ácido ascórbico na hemolinfa foi gradualmente reduzido.

BAO & YENDOL (1971) estudaram a histopatologia de *Reticulitermes flavipes* inoculados com *Beauveria bassiana*. Os autores observaram que entre 5 e 10 horas após inoculação os cupins reduziram a atividade e se agruparam. Após 10 horas ocorreram tremores das antenas e pernas, que continuaram até a

morte. Após 15 horas os sintomas observados foram: paralisia, perda de coordenação, aumento na descarga anal e perda de sensibilidade a estímulos táteis. A morte ocorreu entre 24 e 36 horas. Segundo os autores vários fatores influenciam a rapidez da morte do inseto, tais como: quantidade de inóculo, virulência do fungo e condições do hospedeiro. Ainda afirmam que a produção de micotoxinas pela penetração do fungo, também pode aumentar a rapidez de morte do inseto. A penetração do tegumento ocorreu antes de 16 horas da inoculação e ocorreu infecção pelo trato digestivo (boca, faringe e esofago). A sequência de invasão dos órgãos do inseto após penetração pelo tegumento foram: corpos gordurosos, tecido nervoso e músculos. Segundo os autores a ausência de crescimento micelial antes da morte do inseto sugere que micotoxinas podem ter um papel ativo no processo.

KRAMM & WEST (1982) estudaram a histopatologia de *Reticulitermes* sp. inoculados com 3 isolados de *Beauveria* *bàssiana* e 2 isolados de *Metarhizium* *anisopliae*. A maioria dos cupins inoculados com ambos isolados de *M. anisopliae* morreram em 24 horas, mas nenhum crescimento micelial foi observado até 48 horas após a inoculação. A penetração dos conídios de *M. anisopliae* ocorreu exclusivamente pelo tegumento e somente após a morte do inseto. Os autores lançaram a hipótese de que os cupins são mortos por alguma outra causa, como metabólitos tóxicos ou abrasão da cutícula levando a desidratação do inseto, e não devido à invasão direta do corpo pelo fungo. Já os isola

dos de *B. bassiana* provocaram completa mortalidade de *Reticu
litermes* sp. em 5 dias, sendo que a penetração dos conídios
ocorreu primariamente pelo intestino anterior (ingluvio e prou
ventrículo) e 12 horas antes da morte do inseto.

HANEL (1982b) estudou o ciclo de vida de *Metaru
hizium anisopliae* sobre *Nasutitermes exitiosus*. A germinação
e penetração da cutícula pelos conídios ocorreu após a formau
ção, não obrigatória, de um ou mais apressórios. Uma placa de
penetração ou corpos hifais entre as camadas da cutícula foru
ma a base para invasão da cavidade do corpo, onde a hemolinfa
distribui os corpos hifais que vão se formando. A morte do inu
seto devido as várias toxinas, ocorre 48 horas após e em seguiu
da órgãos e tecidos são invadidos pelo fungo. Nenhuma melanizau
ção, atividade hemocítica ou outra reação de defesa dos cuu
pins foi observada. O autor resumiu a estratégia do fungo em 5
ítems: (1) máxima distribuição de corpos hifais enquanto o inu
seto vive; (2) morte das bactérias do tubo digestivo por toxiu
nas; (3) extrusão do conteúdo intestinal para reduzir possibiu
lidade de bacteriose secundária; (4) utilização do tecido hosu
pedeiro para produção de conídios; (5) formação de estágios
de resistência quando ocorre invasão por contaminantes (*Mucor*
spp. e *Aspergillus* spp.).

2.2.3. Influência de aspectos comportamentais dos cuu pins na disseminação de fungos entomopatogênicos

KRAMM et alii (1982) estudaram o papel do canibau

lismo e do lambimento do corpo, entre indivíduos de *Reticulitermes* sp., na transferência de conídios de *Metarhizium anisopliae*, entre estes cupins. Os insetos saudáveis concentraram a atividade de lambimento nos insetos inoculados com o fungo e, desse modo, foram contaminados. Cupins mortos pelo fungo foram evitados sendo, portanto, menos eficientes na disseminação da doença. Cupins ativos, expostos a *M. anisopliae* por até 4 horas, foram mais eficientes na disseminação de conídios do que indivíduos inativos (expostos a *M. anisopliae* por 48 horas).

KRAMM & WEST (1982) estudaram a viabilidade e virulência de conídios de vários isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Gliocladium virens* (= *Trichoderma viride*) após a passagem pelo tubo digestivo de *Reticulitermes* sp. Conídios viáveis foram encontrados após 8 horas, no intestino posterior. Após reisolamento em meio de cultura, os fungos mantiveram virulência a *Reticulitermes*. Um isolado de *M. anisopliae* e outro de *B. bassiana* provocaram mortalidade de 100% dos cupins em 2 e 5 dias respectivamente, enquanto os demais gastaram de 12 a 15 dias. Os autores ressaltam que a manutenção da viabilidade e virulência dos conídios dos fungos após passagem pelo tubo digestivo dos cupins, tem uma grande importância epizootica. Os cupins podem ingerir os conídios e por defecação, trofolaxia proctodeal, lambimento do corpo etc., disseminar a doença para outros membros da colônia.

2.2.4. Utilização de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* no controle de colônias de cupins no campo

Apesar dos diversos estudos já desenvolvidos no mundo, envolvendo fungos entomopatogênicos e diferentes espécies de cupins, somente um trabalho de controle de colônias de cupins no campo foi encontrado na literatura. HANEL & WATSON (1983) desenvolveram estudos em laboratório e campo visando a transmissão de *Metarhizium anisopliae* entre indivíduos e a indução de epizootias em colônias de *Nasutitermes exitiosus*. Altos níveis de mortalidade em grupos de *N. exitiosus* em laboratório, foram obtidos pela adição de operários contaminados com *M. anisopliae*. Este fungo polvilhado ou pulverizado em indivíduos de colônias no campo, no ninho ou nos locais de coleta de alimento, foi capaz de iniciar epizootias nas mesmas. Através da amostragem de indivíduos das colônias, os autores mostraram que a doença persistiu nas colônias por até 15 semanas. Entretanto, o fungo não conseguiu exterminá-las completamente. Os autores discutiram as possíveis causas da inibição do fungo e sugeriram a seleção de isolados de *M. anisopliae* capazes de superar estas barreiras.

2.3. Armazenamento e Formulação de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*

Segundo COUCH & IGNOFFO (1981) um inseticida mi

crobiano deve ser produzido, formulado e estabilizado de modo que suas propriedades inseticidas sejam mantidas sob condições normais de armazenamento. Um inseticida microbiano deve se manter viável, sob condição ambiente, em prateleiras para comercialização por, no mínimo, 18 meses, a não ser que o mesmo seja produzido sob contrato, para entrega e utilização pelo consumidor. Neste caso, as propriedades inseticidas devem ser mantidas por 3 a 6 meses.

Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* são facilmente produzidos por diversos métodos e em diferentes substratos, mas são pouco estáveis quando armazenados sob condição ambiente. Os principais fatores que afetam a estabilidade (viabilidade e virulência) destes patógenos no armazenamento, são a temperatura, umidade, concentração de CO₂, formulação e luminosidade. CLERK & MADELIN (1965) estudaram a influência destes fatores, exceto formulação, na longevidade de conídios de *B. bassiana*, *Paecilomyces farinosus* e *M. anisopliae*. A longevidade dos conídios destes fungos foi reduzida pela exposição a luz e por aumento da temperatura (8, 18 e 25°C). Os conídios de *B. bassiana* e *P. farinosus* perderam a capacidade de germinação mais rapidamente nas umidades mais altas, enquanto que *M. anisopliae* sobreviveu mais tempo nas umidades extremas. Na combinação escuro, 8°C e 0% de umidade relativa (U.R.) conídios de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *P. farinosus* apresentaram germinação de conídios próxima a 90% após 635, 28 e 140 dias, respectivamente. *M. anisopliae* apresentou 92% de conídios germina

dos após 252 dias na combinação escuro, 8°C e 75% UR. O aumento na concentração de CO₂ ou retirada de O₂ eliminou o efeito desfavorável de umidades relativas intermediárias, na longevidade de conídios de *M. anisopliae*. Os autores discutiram a influência, na longevidade, de variações no metabolismo dos conídios. WALSTAD et alii (1970), estudando os efeitos de fatores ambientais sobre *B. bassiana* e *M. anisopliae*, mostraram a influência da temperatura na longevidade de conídios. A 8°C conídios de ambos fungos apresentaram germinação acima de 80% após 12 meses, enquanto que a 21°C este tempo foi reduzido para 15 dias (*B. bassiana*) e 75 dias (*M. anisopliae*). Uma revisão sobre a influência de fatores ambientais no crescimento e sobrevivência de fungos entomopatogênicos pode ser encontrada no trabalho de ROBERTS & CAMPBELL (1977).

DAOUST & ROBERTS (1983a) estudaram os efeitos da combinação de temperatura (37, 26, 19 e 4°C) e umidade relativa (U.R.) (0, 12, 33, 53, 75 e 98%), mais a combinação -20°C e 0% UR, na viabilidade e virulência a mosquitos, de conídios de 3 isolados de *Metarhizium anisopliae* armazenados durante 2 anos. Os conídios sobreviveram por mais tempo nas temperaturas moderadas combinadas com alta U.R. (26 ou 19°C e 97% U.R.) ou nas combinações de baixas temperaturas e baixas U.R. (4°C e 0% U.R.). Nestas condições, aproximadamente, 80% dos conídios germinaram após, no mínimo, 8 meses. As U.R. intermediárias entre 33 e 75%, dependendo do isolado, foram desfavoráveis a sobrevivência dos conídios, principalmente a 19 ou 26°C. Nestas condi

dições os isolados perderam viabilidade em menos de 30 dias. De um modo geral a longevidade dos conídios aumentou quando a temperatura foi reduzida de 37 até 4°C. A virulência dos isolados foi mantida alta, por 18 meses sobre *Culex pipiens pipiens* e por 12 meses sobre *Anopheles stephensi*, quando os conídios foram armazenados nas condições favoráveis apresentadas acima.

DAOUST & ROBERTS (1983b) estudaram os efeitos do meio de cultura na longevidade e virulência a mosquitos, de conídios de *Metarhizium anisopliae* durante um ano de armazenamento. Foram comparados seis meios micológicos e 3 tipos de arroz, sob 4 combinações de temperatura e umidade relativa (U. R.) (26°C e 0% U.R.; 19°C e 0% U.R.; 19°C e 98% U.R. e 4°C e 0% U.R.). Os autores observaram que estas condições de armazenamento foram mais críticas para a sobrevivência e virulência de *M. anisopliae* do que o meio de cultura utilizado na produção do fungo.

Os efeitos de diferentes formulações na sobrevivência de estruturas infectivas e virulência a insetos, de fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* têm sido mais intensamente estudados nos últimos anos. Apesar disso uma formulação que mantenha viabilidade e virulência destes fungos no armazenamento e eficiência de aplicação no campo, ainda não foi encontrada. Aspectos importantes a serem observados na formulação de um entomopatógeno foram

discutidos em alguns trabalhos de revisão bibliográfica (COUCH & IGNOFFO, 1981; FARGUES & ROBERT, 1985).

DAOUST et alii (1983) estudaram os efeitos de formulações de *Metarhizium anisopliae* em óleos minerais e vegetais, veículos aquosos ou não, pós e grânulos, na viabilidade de conídios armazenados a diferentes temperaturas durante 12 meses. As formulações oleosas e aquosas, independentes da temperatura, reduziram a longevidade dos conídios quando comparados com conídios não formulados. As formulações granuladas e pós molháveis mantiveram altas viabilidades de conídios durante 12 meses a 4°C, enquanto que a 20°C a germinação dos conídios foi próxima de 80% após 6 meses e inferior a 50% após 12 meses, mas de um modo geral não diferiram dos conídios não formulados (controle). Complementando este trabalho, DAOUST et alii (1982) estudaram os efeitos de diferentes formulações (pós e granulados) na virulência de *Metarhizium anisopliae* as larvas de mosquitos, após armazenamento a 4 e 20°C durante 8 a 12 meses. Todas formulações granuladas apresentaram menor porcentagem de mortalidade e maiores tempos letais do que conídios não formulados, após 8 meses de armazenamento a 4°C. Tempos letais menores que o controle (conídios não formulados) somente foram obtidos para uma das formulações em pó (Thixcin R), após 10 meses de armazenamento a 4°C. O autor conclui sua discussão ressaltando a necessidade de determinar a eficiência de uma formulação micoinseticida, através de bioensaios para medir sua virulência à praga visada, antes da aplicação do produto no

campo.

ALVES et alii (1987) estudaram a influência de diversas formulações na longevidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* armazenados em geladeira, freezer e a temperatura ambiente. Foram elaborados 64 formulações pela adição dos seguintes inertes: talco, sílica gel, pirófilita OB-MBY, filito OB-YB, caulin, bentonita, ácido bórico, LE-36SMO e farinha de arroz. As formulações 14 (50% fungo e 50% de filito OB-YD), 18 (50% fungo e 50% farinha de arroz) e 27 (formulação 18 + 0,10g de ácido bórico) apresentaram germinação de conídios próximo a 80% após 270 dias enquanto que o fungo não formulado perdeu totalmente a viabilidade em menos de 210 dias. Na geladeira o fungo perdeu totalmente a viabilidade aos 420 dias enquanto que muitas formulações mantiveram viabilidade próxima a 70% até aos 510 dias. No freezer o fungo puro perdeu viabilidade aos 420 dias, mas 70% de viabilidade foi obtida em algumas formulações até 660 dias. Nos três ambientes ficou claro que algumas formulações podem aumentar significativamente a longevidade de conídios de *M. anisopliae*. ALVES et alii³ mediram a longevidade e a virulência a *Diatraea saccharalis* e *Solenopsis saevissima*, de conídios de *Beauveria bassiana* formulados com diversos

³ ALVES, S.B.; STIMAC, J.L.; PEREIRA, R.M. (ESALQ/USP, Piracicaba, SP). Formulação e armazenamento de *Beauveria bassiana* (Bals.). Vuill. isolado 447. (Em elaboração).

inertes (talco, Syloid R, farinha de arroz e amido de milho), nas proporções fungo/inerte de 1:1 e 4:1, e armazenados em 3 ambientes (ambiente, geladeira e freezer) durante 3 anos. Como testemunha foram utilizados fungo puro e arroz com fungo moído. O fungo puro perdeu totalmente a viabilidade após 30 dias e em syloid (4:1) isto ocorreu em 60 dias, à temperatura ambiente. Nesta mesma condição as demais formulações começaram a perder viabilidade aos 90 dias, se tornando totalmente inviáveis entre 150 e 180 dias. As formulações armazenadas na geladeira ou no freezer apresentaram 100% de viabilidade de confídios após 3 anos. Em relação à virulência a *S. saevíssima* e *D. saccharalis*, o armazenamento do fungo não formulado provocou redução de 30 e 50% (geladeira) e 4 e 18% (freezer), respectivamente, na mortalidade destes insetos, quando comparado com o fungo não armazenado.

2.4. Persistência de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no Solo e no Inseto Morto

O solo constitui um ambiente muito complexo com uma fauna e flora numerosa e variada que, se mantém em um equilíbrio dinâmico. A aplicação de grandes quantidades de fungos entomopatogênicos, como *B. bassiana* e *M. anisopliae*, provoca desequilíbrio temporário, mas com o tempo o ambiente do solo volta a situação de equilíbrio anterior pela eliminação da

maioria das estruturas do fungo aplicado. A eliminação não é total pois estes fungos possuem mecanismos através dos quais conseguem se manter em baixos níveis neste ambiente (LING & DONALDSON, 1981).

O tempo de persistência de *M. anisopliae* e *B. bassiana* no solo pode variar de poucos dias a anos, dependendo da raça e fase de desenvolvimento do fungo e das condições físicas, químicas e bióticas do solo. LATCH & FALLON (1976) mencionaram que esporos de *M. anisopliae* sobreviveram no material de reprodução de *Onyctes rhinoceros*, no mínimo, por 24 meses, sendo pouco afetados pelo tipo de material de reprodução ou por fatores sazonais.

A importância da flora e fauna do solo na persistência de *B. bassiana* e *M. anisopliae* é confirmada pela maior persistência destes fungos em solos esterilizados quando comparados a solos não esterilizados. OLIVEIRA et alii (1981), estudando a sobrevivência de conídios de *M. anisopliae* em diferentes tipos de solo, esterilizados ou não, em condições de casa de vegetação, relataram que os conídios deste fungo têm potencial para sobrevivência de, no mínimo, 90 dias. A redução na população de conídios ocorreu apenas no solo não esterilizado. LING & DONALDSON (1981) comprovaram que a sobrevivência de conídios de *B. bassiana* em solos não esterilizados foi bastante reduzida e a perda completa da capacidade de germinação ocorreu em menos de 22 dias. O solo esterilizado apresentou aumen

to no número de conídios evidenciando que o fungo cresceu neste solo. Estes autores isolaram e comprovaram o efeito fungistático de *Penicillium urticae*, presente no solo não esterilizado, a *B. bassiana*.

A temperatura, umidade, radiação solar, pH e teor de matéria orgânica no solo podem reduzir significativamente a persistência de *B. bassiana* e *M. anisopliae* neste ambiente (LING & DONALDSON, 1981; OLIVEIRA et alii, 1981; FARGUES & ROBERT, 1985 e QUINTELA, 1986).

DAOUST & PEREIRA (1986), estudando a sobrevivência de conídios de *Beauveria bassiana* sobre cadáveres de adultos de *Chalcodermus* sp. expostos a 4 e 27°C sob condições de laboratório, observaram um declínio mais rápido da viabilidade dos conídios a 27 do que a 4°C. Após 12 semanas as porcentagens de conídios viáveis estavam entre 97,6 e 99,3% a 4°C e entre 65 e 83% a 27°C. FERNANDES (1986), estudando a influência da temperatura, umidade relativa (U.R.) e dose de *Beauveria bassiana* na mortalidade e conidiogênese sobre *Ceratomyxa arcuata*, avaliou a sobrevivência deste fungo no interior de *C. arcuata*, mortos sob condições que não permitiram a conidiogênese, durante 60 dias. Após 60 dias nas combinações 24°C e 72% U.R. e 17°C e 72% U.R., mais de 60% dos cadáveres apresentaram crescimento micelial e conidiogênese, quando colocados em câmara úmida por 10 dias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba (SP), no período de março de 1988 a novembro de 1990. Os testes de campo foram realizados no Sítio São João em Piracicaba (SP) na mesma época citada acima.

3.1. Estudos de Laboratório com *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832) e Fungos Entomopatogênicos

3.1.1. Seleção de recipientes e substratos para manutenção de *Cornitermes cumulans* visando a realização de bioensaios com fungos

Vários recipientes como placas de Petri, potes e copos plásticos e substratos como solo do local de coleta dos cupins, fragmentos de ninho de *C. cumulans*, solo mais fragmentos de ninho e papel filtro, foram testados. Foram utilizados operários e soldados de ninhos coletados no campo e mantidos em casa telada. Em cada recipiente/substrato foram colocados 20 operários e soldados. Foram feitas quatro repetições por tratamento e o delineamento experimental foi inteiramente ao

acaso. Contagens do número de indivíduos vivos foram feitas diariamente.

A combinação de recipiente e substrato que proporcionou maior sobrevivência dos cupins passou a ser utilizada nos bioensaios com fungos.

3.1.2. Comparação de métodos de inoculação de *Beauveria bassiana* sobre *Cornitermes cumulans*

Neste bioensaio foi utilizado o fungo *Beauveria bassiana* (isolado nº 760), obtido de cupins mortos nos testes do item anterior, multiplicado em BDA + Y (Batata - 200g; Dextrose - 12g; Agar - 22g e extrato de levedura (Y) - 4g, para 1 litro de meio). Foi utilizada uma suspensão do fungo em água estéril + espalhante adesivo com concentração de $1,8 \times 10^8$ conídios/ml. A parcela experimental foi constituída do recipiente /substrato obtido na etapa anterior com 20 soldados e operários. Foram feitas 5 repetições por tratamento e o delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. Foram utilizados os seguintes métodos de inoculação:

1. **Inseto:** os cupins foram imersos na suspensão fúngica por 1 segundo e então colocados no recipiente.

2. **Papel filtro:** o círculo (diâmetro de 4 cm) de papel filtro foi umedecido com 0,5 ml de suspensão de conídios e em seguida adicionaram-se os cupins. Após 10 minutos acrescentaram-se os

fragmentos de ninho.

3. **Fragmentos de ninho:** os fragmentos de ninho foram imersos na suspensão de conídios, escorridos sobre papel toalha e adicionados aos potes, seguidos dos cupins.

4. **Testemunha:** os cupins foram imersos em água estéril + espalhante adesivo, sem o fungo, como no tratamento 1.

Após os tratamentos os potes foram fechados e mantidos no escuro e à temperatura ambiente. Avaliou-se o número de insetos mortos aos 5, 7 e 9 dias após inoculação. Dados da mortalidade no 7º dia foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%).

3.1.3. Bioensaios para seleção de isolados de fungos virulentos a *Cornitermes cumulans*

Bioensaio 1 - foram testados 5 isolados de *Beauveria bassiana*, 4 isolados de *Metarhizium anisopliae* e 1 isolado de *Aspergillus* presente num tubo com sílica-gel onde o fungo original tinha perdido viabilidade (Tabela 1). Estes isolados foram multiplicados em BDA + Y durante 10 dias a 26°C. As suspensões dos isolados foram padronizadas para $1,2 \times 10^8$ conídios/ml e inoculadas pelo método dos "fragmentos de ninho" descrito no item anterior. Repetiram-se os demais procedimentos

e métodos descritos no item anterior, exceto para as contagens e retiradas dos mortos que foram feitas diariamente a partir do 29 dia. Os isolados foram comparados através da análise da variância e comparação de médias pelo teste de Tukey (5%) dos dados de mortalidade aos 3, 4 e 5 dias após inoculação, transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

Tabela 1. Dados referentes aos isolados de fungos testados sobre *Cornitermes cumulans*. Piracicaba, 1990.

Número do isolado*	Espécie	Hospedeiro original
259	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Anthonomus grandis</i>
867	<i>M. anisopliae</i>	Blattidae
866	<i>M. anisopliae</i>	<i>Atta</i> sp.
865	<i>M. anisopliae</i>	Homoptera
252	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Hypothenemus hampei</i>
447	<i>B. bassiana</i>	<i>Solenopsis invicta</i>
760	<i>B. bassiana</i>	<i>Cornitermes cumulans</i>
868	<i>B. bassiana</i>	<i>Cerotoma</i> sp.
869	<i>B. bassiana</i>	Formicidae
-	<i>Aspergillus</i>	Contaminante

(*) Número de registro do isolado no Banco de Patógenos do Laboratório de Patologia de Insetos da ESALQ/USP.

Bioensaio 2 - Os 5 isolados mais virulentos a *Cornitermes cumulans*, obtidos do bioensaio 1, foram novamente

comparados. Seguiram-se os mesmos procedimentos e métodos do bioensaio 1, exceto para os mortos que foram retirados diariamente e colocados em câmara úmida para observação dos níveis de conidiogênese sobre os cadáveres. As análises estatísticas foram feitas com dados de mortalidade do 3º e 5º dia após inoculação.

3.1.4. Longevidade de conídios de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* armazenados em diferentes formulações e ambientes

Foram utilizados 1 isolado de *M. anisopliae* (865) e 1 isolado de *B. bassiana* (868). Estes fungos foram produzidos em meio de cultura de arroz através do método de bandeja descrito por ALVES (1986c). Este método consiste na inoculação do fungo em arroz dentro de sacos plásticos de polipropileno previamente autoclavados a 120°C durante 20 minutos. Em seguida os sacos com arroz são incubados a 26°C durante 3 dias. Após este tempo o arroz é transferido para bandejas onde ocorre conidição e secagem do fungo.

Os conídios foram separados do arroz por agitação manual através de uma peneira de malha fina dentro de tubo de PVC e formulados (20% de conídios e 80% de inerte) com os seguintes inertes:

- a) Talco bemil - 6% de água (peso/peso);
- b) Caulin roseira - 4% de água (peso/peso);
- c) Leucita - 7% de água (peso/peso);
- d) Arroz moído, peneirado e seco a 150°C durante 30 minutos - 6% água (peso/peso);
- e) Cartão de cupinzeiro moído, peneirado e seco a 150°C durante 30 minutos - 10% de água (peso/peso).

A análise granulométrica dos cinco inertes caracterizou-os como predominantemente textura argila.

Foram colocados 40 g de formulação (12 g de fungo e 32 g de inerte) em potes plásticos opacos (300 ml) e armazenados na geladeira ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e à temperatura ambiente em local fresco, escuro e seco (15 a 30°C), durante 6 meses. Como tratamento controle, utilizou-se o fungo não formulado (12 g/pote). Em cada ambiente foram colocados 2 potes para cada tratamento (formulação). A viabilidade dos conídios foi analisada mensalmente. Para isso os potes eram vigorosamente agitados e em seguida retirava-se uma amostra de 0,2 g (formulado) ou 0,1 g (não formulado) de cada pote. Estas amostras eram suspendidas em 50 ml de H_2O estéril + espalhante e então diluída 10 vezes. A suspensão obtida (cerca de 1×10^7 conídios/ml) era espalhada em placas de Petri com meio (ágar-água) com auxílio de uma alça de bastão de vidro. As placas inoculadas foram mantidas a 26°C durante 20 horas. Em seguida determinou-se a porcentagem de conídios germinados através de 2 contagens por placa de

cerca de 200 conídios cada uma.

3.2. Controle de Colônias de *Cornitermes cumulans* por *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em Condições de Campo

3.2.1. Comparação de isolados dos fungos no controle de colônias de *Cornitermes cumulans*

Os melhores fungos números 865, 868, 259 e 866 foram então reisolados de cupins mortos (bioensaio 2 - item 3.1.3.), purificados e multiplicados em arroz através do processo de bandeja descrito anteriormente. Este e os demais experimentos de campo foram realizados numa chácara em Piracicaba, com pastagem de *Brachiaria* sp. muito infestada com *Cornitermes cumulans*. Foram selecionados e mapeados 25 cupinzeiros de *C. cumulans* com diâmetro ao nível do solo (d.n.s.) de 25 a 45 cm. Utilizando-se uma polvilhadeira manual (polvilhadeira de formicida) aplicaram-se 5 g de conídios de cada isolado, por cupinzeiro, através de um furo central atravessando o centro celulósico. Este furo foi feito com uma barra de ferro com 80 cm de comprimento por 1,5 cm de diâmetro. Na testemunha foi feito o furo atravessando o centro celulósico, mas nada foi aplicado. Foram feitas 5 repetições (cupinzeiros) por tratamento e o delineamento foi inteiramente ao acaso. Após 10 dias da aplicação os cupinzeiros foram arrancados, fragmentados e, utiliza-

do uma escala visual de notas (0,1, 2, ... 10 correspondentes a 0, 10, 20, ... 100% de mortalidade ou conidiogênese sobre os cadáveres, respectivamente), avaliaram-se a mortalidade e conidiogênese sobre os cadáveres em cada cupinzeiro. Os dados, após transformação em $\sqrt{x + 0,5}$, foram submetidos a análise da variância e o teste Tukey (5%) foi utilizado na comparação de médias.

3.2.2. Comparação de doses dos fungos no controle de colônias de *Cornitermes cumulans*

Foram selecionados e mapeados 55 cupinzeiros grandes de *Cornitermes cumulans* (d.n.s. entre 50 e 80 cm). Os melhores isolados de *Beauveria bassiana* (868) e *Metarhizium anisopliae* (865) obtidos no experimento anterior (ítem 3.2.1.) foram utilizados neste e nos demais experimentos desta pesquisa. A produção do fungo e aplicação no cupinzeiro foram idênticos ao experimento anterior (ítem 3.2.1.). Foram aplicados 8 gramas de produto por cupinzeiro nas seguintes proporções de talco bemil (diluyente) e conídios puros (*B. bassiana* e *M. anisopliae*):

- Testemunha: 8 g de talco + 0 g de fungo
- Dose 1 : 7,5 g de talco + 0,5 g de fungo
- Dose 2 : 7,0 g de talco + 1,0 g de fungo
- Dose 3 : 6,0 g de talco + 2,0 g de fungo

Dose 4 : 4,0 g de talco + 4,0 g de fungo

Dose 5 : 0,0 g de talco + 8,0 g de fungo

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com 5 repetições (cupinzeiros) por tratamento. Após 20 dias fragmentou-se parte da "calota" externa de todos cupinzeiros para observação da atividade da colônia e capacidade de reconstrução aos 30 dias. No 30º dia foram novamente fragmentados para observação aos 60 dias. Os cupinzeiros não reparados eram arrancados e avaliados. O experimento foi encerrado aos 90 dias quando todos os cupinzeiros restantes foram arrancados e avaliados. Utilizou-se a mesma escala de notas para mortalidade e conidiogêneses descrita no item 3.2.1. Através da análise de probites foram obtidas as DL_{50} para cada fungo aos 30, 60 e 90 dias.

3.2.3. Comparação de formulações dos fungos no controle de colônias de *Cornitermes cumulans*

Fôram selecionados e mapeados 70 cupinzeiros grandes de *Cornitermes cumulans* (d.n.s. entre 50 e 80 cm). No dia anterior à aplicação dos fungos todos os cupinzeiros tiveram sua calota externa fragmentada até expor o centro celulósico. Cada cupinzeiro foi polvilhado com 2 g de fungo puro (dose selecionada no item 3.2.2. e que passou a ser utilizada nos demais experimentos deste trabalho) ou 10 g das formulações descritas

no item 3.1.4. Todos demais métodos e procedimentos foram idênticos aos descritos no item 3.2.1. Cada inerte foi aplicado sem o fungo nas testemunhas de cada formulação e na testemunha dos fungos não formulados foi feito apenas o canal de aplicação. A partir deste experimento foram feitos furos (até ± 20 cm de altura) na ponta da mangueira, para evitar entupimentos e espalhar melhor o fungo no cupinzeiro. Foram feitas observações da recuperação dos cupinzeiros fragmentados aos 10, 20, 60 e 150 dias, quando os cupinzeiros não reconstruídos eram arrancados e somente a mortalidade foi avaliada. Aos 150 dias todos os cupinzeiros restantes foram avaliados. Os dados obtidos, após transformação em $\sqrt{x + 0,5}$, foram submetidos a análise de variância (3 fatores) e o teste Tukey (5%) foi utilizado na comparação das médias.

3.2.4. Comparação de métodos de aplicação dos fungos no controle de colônias de *Cornitermes cumulans*

Foram selecionados e mapeados 110 cupinzeiros de *Cornitermes cumulans* (d.n.s. de 50 a 90 cm) os quais foram polvilhados com *Beauveria bassiana* ou *Metarhizium anisopliae* através dos seguintes métodos:

- a) 2 g de conídios por cupinzeiro aplicados com polvilhadeira não adaptada;

- b) 2 g de conídios por cupinzeiro aplicados com polvilhadeira adaptada (câmara na mangueira);
- c) Em 2 vezes: 1 g aplicado na base do cupinzeiro e 1 g aplicado na parte superior 20 dias após;
- d) Fungo formulado com cartão (2 g de conídios + 8 g de inerte);
- e) Fungo formulado com leucita (2 g de conídios + 8 g do inerte).

Nos tratamentos c, d e e a aplicação foi feita utilizando a polvilhadeira adaptada. A testemunha consistiu de cupinzeiros nos quais foi feito apenas o canal de aplicação. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com 10 repetições (cupinzeiros) por tratamento. As avaliações das colônias mortas e da conidiogênese foram feitas aos 30, 45, 75 e 140 dias após a aplicação. Os demais procedimentos e métodos foram idênticos ao descrito no item 3.2.1. Os dados foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ e então foi feita a análise da variância e comparação de médias pelo teste de Tukey (5%).

3.2.5. Sobrevivência e ciclo biológico dos fungos no interior dos cupinzeiros

Foram realizados 2 experimentos sendo o primeiro

no verão (janeiro) e o segundo no inverno (junho).

Experimento 1: Iniciado em 26 de janeiro de 1990

Foram selecionados 108 cupinzeiros de *Cornitermes cumulans* (d.n.s. abaixo de 50 cm) sendo que, destes, 48 foram polvilhados com *Beauveria bassiana* (2 g de conídios/ninho), 48 foram polvilhados com *Metarhizium anisopliae* (2 g de conídios/ninho) e 12 foram deixados como testemunha. Após 1, 3, 5, 7, 10, 15, 30, 45 e 90 dias, quatro cupinzeiros para cada fungo foram sorteados e abertos para acompanhamento do desenvolvimento da doença, observações do comportamento das diferentes castas e coleta de fragmentos do ninho (1 amostra/cupinzeiro), no ponto de aplicação, que apresentavam resíduos do fungo originalmente polvilhado. Estes fragmentos foram levados para laboratório, lavados em água estéril + espalhante para obtenção de suspensões dos conídios. Com auxílio de alças de bastão de vidro os conídios destas suspensões foram espalhados em placas de Petri com ágar-água e mantidos a 26°C durante 20 horas, quando então foi determinada a porcentagem de conídios germinados. Aos 30, 45 e 90 dias, além do teste de germinação dos conídios, também foi testada a virulência sobre operários e soldados de *C. cumulans* de ninhos não tratados. Para isso 20 soldados e operários foram adicionados aos fragmentos de ninho de cada amostra coletada. Diariamente foi avaliada a mortalidade dos cupins, sendo que os mortos foram retirados, colocados em câmara úmida para observação da conidiogênese. Os demais proce

dimentos e métodos não descritos foram idênticos ao item 3.2.1. Os dados obtidos nos testes de virulência foram transformados em arco seno $\text{SQ R } (X/100)$, submetidos a análise de variância e as médias de mortalidade (2, 3 e 5 dias) foram comparados pelo teste de Tukey (5%). Os dados de mortalidade das colônias foram submetidos a análise de probites para obtenção dos TL_{50} e os demais resultados foram apresentados na forma de gráficos.

Experimento 2 - Iniciado em 01 de junho de 1990

Foram selecionados e mapeados 100 cupinzeiros sendo 10 considerados como testemunhas, 30 grandes (D.N.S. de 60-80 cm), 30 médios (d.n.s. entre 40 e 60 cm) e 30 pequenos (D.N.S. menor que 40 cm). Em 15 cupinzeiros de cada tamanho foram polvilhados 2 g de conídios/cupinzeiro de *B. bassiana* e *M. anisopliae* (total de 45 cupinzeiros/fungo). Aos 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 30 e 60 dias foram sorteados e abertos 3 cupinzeiros (1 grande, 1 médio e 1 pequeno) para cada fungo. Foram feitas avaliações de mortalidade e conidiogênese e observações do comportamento das diferentes castas na presença do fungo. Neste experimento não foi avaliada a sobrevivência e virulência dos conídios no interior do cupinzeiro. Os demais procedimentos e métodos foram idênticos aos descritos no item 3.2.1. Os dados de mortalidade foram submetidos a análise de probite para obtenção dos TL_{50} para comparação com o experimento 1. Os demais resultados foram apresentados na forma de gráficos.

3.2.6. Comparação dos custos de controle de colônias de *Cornitermes cumulans* utilizando inseticidas químicos e fungos

3.2.6.1. Inseticidas químicos

Segundo MARICONI⁴ os inseticidas químicos mais utilizados para controle de *Cornitermes cumulans* são: Lebaycid 500 CE 50% (fention), Dursban 4E BR 48% (clorpirifos) e isca granulada 0,45% (dodecacloro), que apresentam 90% de eficiência. O custo de controle de *C. cumulans* com inseticidas foi o resultado da soma do preço do produto no mercado de Piracicaba mais o custo da mão-de-obra para a aplicação e custo do transporte. Os concentrados emulsionáveis apresentam um custo adicional de transporte, uma vez que os produtos são diluídos em 100 l de água (1 l de calda/cupinzeiro). Considerou-se este custo como igual ao custo da mão-de-obra (Cr\$ 10,00/cupinzeiro).

A seguir são apresentados os preços destes inseticidas:

- Lebaycid 500 CE 50% = Cr\$ 2.000,00/litro
- Dursban 4E BR 48% = Cr\$ 2.500,00/litro
- Isca granulada Mirex (0,45%) = Cr\$ 100,00 pacote de 500 g

⁴MARICONI, F.A.M. (Departamento de Zoologia - ESALQ/USP, Piracicaba). Comunicação pessoal. 1990.

3.2.6.2. *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

Supondo que uma pessoa física ou jurídica tenha montado um laboratório de produção de fungos para controle de cupins e outros insetos; a produção é feita sob encomenda e o próprio laboratório realiza o transporte, aplicação e avaliação do controle na área infestada.

O custo de controle com os fungos foi calculado pela soma do custo de produção, acrescido de 30% para amortização das instalações, equipamentos e materiais de consumo duráveis, mais o custo de aplicação.

Considerou-se, no cálculo do custo de produção dos fungos, apenas os materiais de consumo como: arroz, sacos plásticos autoclaváveis, energia elétrica, gás e mão-de-obra.

A produção média de conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, utilizando o método da bandeja durante este trabalho foi de cerca de 40 g e 60 g de conídios/kg de arroz seco, respectivamente. Para cada kg de arroz seco há necessidade de 3 sacos plásticos autoclaváveis. Os preços (Cr\$) dos diversos itens são os seguintes:

- Arroz (1 kg) = 80,00
- Sacos plásticos (3) = 9,00
- Gás e energia = 2,00

- Mão-de-obra	= 22,00
(1/5 hora-homem/mês - salário incluído obrigações trabalhistas de 20.000,00)	
- Lucro	= 34,00
Total	=147,00 para 60 g de M. <i>anisopliae</i> e 40 g de B. <i>bassiana</i>

O custo da mão-de-obra de aplicação por cupinzeiro é o mesmo para qualquer método e igual a Cr\$ 10,00 (considerou-se salário mensal de Cr\$ 20.000,00, capacidade de aplicação de 10 cupinzeiros/hora e 180 horas de trabalho mensal).

3.3. Suscetibilidade de Outras Espécies de Cupins a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

Foram realizados bioensaios de laboratório e/ou testes de campo com os isolados 865 (*M. anisopliae*) e 868 (*B. bassiana*), que foram eficientes no controle de *Cornitermes cumulans*, visando avaliar a suscetibilidade de outras espécies de cupins a estes isolados. Os bioensaios e testes de campo foram feitos utilizando-se metodologias idênticas às que foram descritas para *C. cumulans*. As espécies testadas foram:

a) *Cornitermes snyderi* Emerson: foram feitos 2 testes de campo na região de Goiânia (GO);

b) *Syntermes* sp.: foi feito 1 teste de campo

na região de Goiânia (GO);

c) *Cryptotermes* sp.: foram realizados 1 bioensaio de laboratório e 3 testes de controle em móveis infestados em Piracicaba (SP);

d) *Heterotermes* sp.: foi feito 1 bioensaio de laboratório em Piracicaba (SP);

e) *Nasutitermes* sp.: foi feito um teste de campo em Piracicaba (SP);

f) *Coptotermes havilandi* Holmgren: foi realizado bioensaio de laboratório e teste de controle em uma residência infestada em Piracicaba (SP).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudos de Laboratório com *Cornitermes cumulans* e os Fungos Entomopatogênicos

4.1.1. Seleção de recipientes e substratos para manutenção de *Cornitermes cumulans* visando a realização de bioensaios com fungos

Após a realização de diversos testes de sobrevivência de operários e soldados de *C. cumulans* em diferentes recipientes e substratos, obteve-se o recipiente tipo pote plástico transparente (4,5 cm de diâmetro x 7,0 cm de altura) com fundo forrado com papel filtro e com fragmentos de ninho (parte argilosa e cartão) previamente umedecidos e escorridos, como o mais adequado recipiente/substrato. Neste recipiente/substrato mais de 80% dos operários e soldados permaneceram vivos e agéis após 10 dias. A mistura de solo com fragmentos de ninho também foi favorável a sobrevivência de *C. cumulans*, mas dificultaria as avaliações do número de cupins sobreviventes. Os fragmentos de ninho foram retirados facilmente com uma pinça sem estressar os cupins, por ocasião das contagens.

Os 20 exemplares de cupins colocados por reci

piente constituíram-se em uma parcela experimental adequada aos bioensaios com os fungos. O recipiente transparente facilitou a observação da atividade dos cupins. Algumas horas após a colocação dos cupins (operários e soldados) no recipiente com fragmentos, observou-se que os mesmos reagregaram os fragmentos, taparam as entradas de luz e improvisaram câmaras e galerias onde se mantiveram agrupados, formando um ambiente semelhante ao do cupinzeiro no campo. É provável que resíduos de matéria orgânica, presentes nos fragmentos, tenham sido utilizados como fonte de alimento para os cupins. Além disso, através da trofolaxia bucal (alimento estomodeico) ou anal (alimento proctodeico) (NOGUEIRA, 1981), o alimento circula no grupo de cupins, sendo melhor aproveitado e, assim, os insetos conseguem se manter vivos por mais tempo sem a adição de outros alimentos.

4.1.2. Comparação de métodos de inoculação de *Beauveria bassiana* isolado 760 sobre *Cornitermes cumulans*

Os resultados referentes a mortalidade de operários e soldados de *C. cumulans* inoculados com *B. bassiana*, utilizando-se 3 métodos de inoculação, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Mortalidade de *Cornitermes cumulans* inoculados com *Beauveria bassiana*, utilizando diferentes métodos, em laboratório. Piracicaba, 1990.

Tratamentos	Porcentagem de mortalidade após 7 dias
Testemunha	35a
Papel filtro	27a
Inseto	96 b
Fragmentos de ninho	93 b

(*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%). C.V. 20,6

O isolado (760) de *B. bassiana* utilizado foi pa togênico a operários e soldados de *C. cumulans*. A inoculação do fungo através da imersão dos insetos ou dos fragmentos de ni nho nas suspensões de conídios, foram mais eficientes e diferi ram estatisticamente da inoculação utilizando papel filtro. A inoculação do fungo usando o papel filtro não diferiu es tatisticamente da testemunha. A alta mortalidade na testemunha (35%) após 7 dias ocorreu devido a alta sensibilidade dos cu pins ao manuseio e/ou aos possíveis efeitos do espalhante ade sivo adicionado à água estéril. Este fato dificultou a utiliza ção do método de inoculação pela imersão do inseto na suspensão de conídios, pois poderiam ocorrer altas mortalidades na teste munha. Desta forma, o método de inoculação usando os fragmen tos de ninho foi escolhido como o mais adequado e passou a ser utilizado nos demais bioensaios. Este método não apresentou os

problemas do método de imersão dos insetos, pois exige pouco manuseio dos cupins e baixa quantidade de espalhante adesivo atinge o corpo do inseto. Entretanto, é importante ressaltar que este método de inoculação pode não ser eficiente para susensões fúngicas com baixa concentração de conídios devido a diluição do inóculo.

4.1.3. Bioensaios para seleção de isolados de fungos virulentos a *Cornitermes cumulans*

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos no bioensaio 1, relativos a virulência de 10 isolados de fungos a operários e soldados de *C. cumulans*.

De um modo geral, todos os isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram patogênicos a *C. cumulans* diferindo estatisticamente da testemunha. O fungo contaminante *Aspergillus* sp. não diferiu da testemunha. O isolado 867, embora tenha sido patogênico, foi estatisticamente menos virulento do que os demais. Dois isolados de *M. anisopliae* (865 e 866) foram os mais virulentos apresentando 90% de mortalidade já no 2º dia e 100% de mortalidade de *C. cumulans* no 3º dia. Os isolados 447, 760, 259 e 868 foram também muito virulentos a *C. cumulans* e no 3º dia provocaram de 69 a 80% de mortalidade dos cupins, não diferindo estatisticamente dos isolados 865 e 866. Após 4 dias apenas o isolado 867 diferiu estatisticamente dos demais.

Tabela 3. Virulência de 10 isolados de fungos a *Cornitermes cumulans* em laboratório. Piracicaba, 1990.

Espécie do fungo	Número do isolado	Porcentagem de mortalidade acumulada Dias após inoculação		
		2	3	4
<i>Metarhizium anisopliae</i>	865	100a	100a	100a
<i>M. anisopliae</i>	866	90a	100a	100a
<i>Beauveria bassiana</i>	447	36 b	78ab	95a
<i>B. bassiana</i>	760	35 b	80ab	98a
<i>M. anisopliae</i>	259	32 bc	73abc	100a
<i>B. bassiana</i>	868	24 bc	69abc	96a
<i>B. bassiana</i>	252	13 c	47 bcd	97a
<i>B. bassiana</i>	869	22 bc	44 cd	79a
<i>M. anisopliae</i>	867	20 bc	35 d	50 b
<i>Aspergillus</i> sp.	—	0 d	2 e	4 c
Testemunha	—	0 d	0 e	4 c

(*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%). C.V. (dia 2 = 17,4; dia 3 = 13,5; dia 4 = 8,8).

Os melhores isolados foram selecionados de acordo com os resultados do 3º dia. Os 5 isolados selecionados para o bioensaio 2 foram: 865, 866, 259, 868 e 760. O isolado 760 foi obtido de *C. cumulans* mantidos em laboratório para seleção de substratos e recipientes (item 4.1.1.) e provavelmente se tratava do isolado 447 que, nesta ocasião, estava sendo aplicado sobre *Solenopsis* sp. no mesmo laboratório. Devido a esse fato, optou-se

pelo isolado 760 que naturalmente havia contaminado o cupim e descartou-se o isolado 447. A comparação da virulência destes isolados para *C. cumulans*, utilizando tempos letais (análise de probites), não foi possível devido a rápida mortalidade dos cupins inoculados com os isolados 865 e 866 (90% já na primeira observação).

Os 5 isolados selecionados no bioensaio 1, foram novamente comparados no bioensaio 2 (Tabela 4).

Tabela 4. Virulência de 5 isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* a *Cornitermes cumulans* em laboratório. Piracicaba, 1990.

Espécie do fungo	Número do isolado	Porcentagem de mortalidade acumulada Dias após inoculação			Porcentagem de conidiogênese
		2	3	5	
<i>Metarhizium anisopliae</i>	865	81a	100a	100a	100
<i>M. anisopliae</i>	866	91a	100a	100a	100
<i>M. anisopliae</i>	259	15 b	53 b	100a	95
<i>Beauveria bassiana</i>	868	14 b	29 bc	86 b	42
<i>B. bassiana</i>	760	8 b	16 cd	50 c	9
Testemunha	-	5 b	5 d	7 d	0

(*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%). C.V. (dia 2 = 26,0; dia 3 = 20,3; dia 5 = 9,7).

Os isolados 865 e 866 foram virulentos como no bioensaio 1 e já no 2º dia provocaram 81 e 91% de mortalidade, respectivamente e no 3º dia mataram 100% dos insetos. No 2º e 3º dias os isolados 865 e 866 provocaram mortalidades de *C. cumulans* estatisticamente superiores aos demais. Os isolados 259 e 868, embora menos virulentos que os isolados 865 e 866, repetiram a performance obtida no bioensaio 1 e causaram, no 5º dia, mortalidades superiores ao isolado 760. Este isolado apresentou uma baixa virulência a *C. cumulans* quando comparado com o bioensaio 1 e não foi mais utilizado nos outros testes.

Com relação à conidiogênese dos fungos sobre os cadáveres de *C. cumulans*, os 3 isolados de *M. anisopliae* foram superiores aos de *B. bassiana*, apresentando de 95 a 100% dos cadáveres recobertos com conídios, enquanto que o isolado de *B. bassiana* (868) apresentou 42%. Os isolados 865, 866, 259 e 868 foram escolhidos para o 1º teste de controle de colônias de *C. cumulans* em campo. Novamente, não foi possível comparar a virulência dos isolados usando os tempos letais. As possíveis causas deste fenômeno, bem como o comportamento e os sintomas apresentados por *C. cumulans* inoculados com os isolados 865 e 866 serão discutidos a seguir.

O processo de infecção de insetos por fungos entomopatogênicos é dividido em 10 etapas por ROBERTS & HUMBER (1981). Segundo estes autores a morte do inseto, devido a toxinas, ocorre após à penetração e crescimento do fungo na hemo

cele. Entretanto, alguns autores observaram que em espécies de cupins e outros insetos inoculados com certos isolados de fungos como *B. bassiana* (BAO & YENDOL, 1971), *M. anisopliae* (KRAMM & WEST, 1982) e *Entomophthora coronata* (YENDOL & PASCHKE, 1965), a morte do inseto ocorreu antes do crescimento do fungo na he mocele. Nestes trabalhos os insetos morreram em menos de 48 ho ras, e os autores fizeram tentativas de explicação do fenô meno. YENDOL & PASCHKE (1965), estudando o processo de infecção de *E. coronata* em *Reticulitermes flavipes*, afirmaram que a mor talidade de cupins, observada em apenas 12 horas após a inocu lação, durante os primeiros estágios de penetração do fungo, ocorreu possivelmente devido à produção de micotoxinas. KRAMM & WEST (1982) obtiveram 100% de mortalidade de *Reticulitermes* sp., inoculados com 2 isolados de *M. anisopliae*, entre 16 e 24 horas após a inoculação. Estes autores observaram, através de estudos histológicos, que *M. anisopliae* não penetrou a cutícu la antes da morte do inseto e lançaram a hipótese de que os cu pins não foram mortos por ação direta do fungo invadindo seu corpo, mas por outras causas como metabólitos tóxicos, ou uma possível abrasão de cutícula levando o inseto à desidratação. BAO & YENDOL (1971), estudando o processo de infecção de *Reti* culi termes *flavipes* por *B. bassiana*, observaram que os cupins morreram 24 a 36 horas após a inoculação do fungo e afirmaram que a ausência de crescimento micelial antes da morte dos cu pins pode ser devida a ação de micotoxinas.

O isolado de *M. anisopliae* 865 provocou também

altos níveis de mortalidade em menos de 48 horas em outros gêneros de cupins como: *Syntermes*, *Heterotermes*, *Coptotermes* e *Cryptotermes*, além de outra espécie de *Cornitermes*, em bioensaios de laboratório e testes de campo (ítem 4.3.). Nestes estudos e nos trabalhos citados anteriormente, foram utilizadas altas doses dos patógenos. Quando se utilizaram concentrações de 10^7 conídios/ml em testes de laboratório, a mortalidade de operários de *C. cumulans* foi retardada. Desta forma, este fenômeno está associado não só à raça do fungo, mas também às altas doses aplicadas. Em exames microscópicos do tegumento de soldados de *Syntermes* sp., inoculados com o isolado 865, e já moribundos, observou-se muitos conídios penetrando o tegumento. Como os cupins apresentaram sintomas típicos de intoxicação como tremores e paralisia, pode-se afirmar que a morte dos mesmos está associada a alguma enzima ou toxina produzida durante a penetração do fungo. Assim, quanto mais conídios penetram (doses altas) mais toxina ou enzima é liberada e mais rapidamente ocorre a morte do inseto. Entretanto, são necessários estudos mais detalhados para elucidar definitivamente as causas deste fenômeno.

Operários e soldados de *C. cumulans* inoculados com *B. bassiana* e *M. anisopliae* apresentaram alguns sintomas como: agrupamento, tremores de pernas e antenas, perda de coordenação e paralisia, que já haviam sido descritos para outras espécies de cupins (BAO & YENDOL, 1971; HANEL, 1982b). O sintoma da descarga anal citado por BAO & YENDOL (1971) não foi ob

servado para *C. cumulans*.

Durante a realização dos bioensaios observou-se que os operários e soldados de *C. cumulans*, recém mortos ou moribundos, eram levados pelos operários mais ativos e acumulados principalmente na parte inferior do recipiente. Em seguida, inclusive os moribundos, eram cobertos com partículas de argila. Aparentemente este isolamento e "enterrio" dos mortos é uma forma de defesa destes cupins contra os entomopatógenos. Entretanto, estes cupins apresentaram o mesmo comportamento na testemunha, onde cadáveres ou indivíduos danificados mecanicamente, foram também isolados e enterrados. Os térmitas apresentam um "instinto de assepsia" e, da mesma maneira que outros insetos sociais como abelhas e formigas, são capazes de evitar que as doenças atinjam níveis epizooticos (ALVES, 1986a). O "instinto de assepsia" de *C. cumulans*, observado neste trabalho concorda com observações feitas por TORALES (1982-84). Esta autora, examinando colônias de *C. cumulans* mantidas em laboratório e já mortas, relatou que os indivíduos mortos, estavam aglomerados entre si, com grãos de areia e cimento retal ou apareciam em bolas de terra amassada e misturada com alimentos. Apesar do "instinto de assepsia" apresentado pelos cupins e outros insetos sociais, eles não conseguem evitar uma epizootia quando grandes quantidades de patógeno são inoculadas nos seus ninhos, como foi feito através da estratégia da introdução inundativa adotada neste trabalho. y

4.1.4. Longevidade de conídios de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* armazenados em diferentes formulações e ambientes

As porcentagens de viabilidade de conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, armazenados durante 6 meses em diferentes formulações e ambientes, encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Viabilidade média (%) de conídios de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* armazenados em diferentes formulações e ambientes, durante 6 meses. Piracicaba, 1990.

Fungo	Temperatura	Formulações (20% de fungo)	Dias após o armazenamento					
			30	60	90	120	150	180
<i>B. bassiana</i>	Geladeira (4 [±] 2°C)	Média geral	97,2*	97,5	95,0	96,3	95,2	94,8
		Não formulado	99,0	0	0	0	0	0
		Talco	98,0	88,5	36,5	0	0	0
	Ambiente (15-30°C)	Caulim	98,5	84,5	0	0	0	0
		Arroz	96,5	72,5	0	0	0	0
		Cartão	97,0	91,0	80,0	52,5	24,0	0
		Leucita	99,0	93,0	72,0	12,5	0	0
<i>M. anisopliae</i>	Geladeira (4 [±] 2°C)	Média geral	97,2*	96,5	94,0	94,0	93,2	92,8
		Não formulado	97,5	93,5	83,5	0	0	0
		Talco	95,0	94,5	83,5	66,5	31,0	0
	Ambiente (15-30°C)	Caulim	97,0	94,5	81,5	16,5	0	0
		Arroz	93,0	57,0	32,5	9,5	0	0
		Cartão	98,5	86,5	78,5	59,5	38,5	15,5
		Leucita	96,5	95,0	85,5	57,5	50,5	26,5

(*) Viabilidade inicial 100%.

Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* não formulados ou formulados com diferentes inertes apresentaram viabilidades acima de 92% após 180 dias de armazenamento na geladeira. Enquanto que à temperatura ambiente todas formulações apresentou depois de 120 dias, viabilidades inferiores a 80%.

Os resultados referentes ao armazenamento à temperatura ambiente indicam que *B. bassiana* perdeu mais rapidamente a viabilidade do que *M. anisopliae*. Este fungo, não formulado, perdeu totalmente a viabilidade entre 30 e 60 dias, enquanto que os conídios de *M. anisopliae* tornaram-se inviáveis entre 90 e 120 dias. Se for considerado como 80% o limite de germinação mínimo aceitável e se as formulações forem comparadas com os fungos não formulados, observa-se que somente *B. bassiana* apresentou ganho na longevidade dos conídios pela presença dos inertes. Este patógeno, formulado com cartão, apresentou 80% de viabilidade dos conídios aos 90 dias. A formulação de *M. anisopliae* com arroz provocou perda de viabilidade mais rapidamente do que o fungo não formulado. Neste tratamento a viabilidade foi reduzida pela metade (57%), aos 60 dias.

De modo geral, observou-se que apenas os inertes cartão e leucita contribuíram para manter alguma viabilidade de conídios de *B. bassiana* aos 120 dias e de *M. anisopliae* aos 180 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

A longevidade de conídios de *M. anisopliae*, formulados ou não, obtidos no presente trabalho, foi menor do que aquelas obtidas em trabalhos semelhantes feitos por outros autores. DAOUST et alii (1983) obtiveram viabilidades de conídios de *M. anisopliae* próximas a 80%, quando este fungo foi formulado com diversos diluentes em pó (caulinita, talco, montmorilonita, pirofilita etc.) e armazenado a 20°C durante 6 meses. É interessante observar que no trabalho citado, as formulações não diferiram dos conídios não formulados que apresentaram 82% de viabilidade, mostrando com isso, que estes diluentes não proporcionaram ganho na longevidade dos conídios nesta temperatura. ALVES et alii (1987) compararam a longevidade de conídios de *M. anisopliae* armazenados em 64 formulações elaboradas com diluantes pós, à temperatura ambiente e em câmara frigorífica. À temperatura ambiente os autores obtiveram 80% de viabilidade de conídios armazenados em formulações à base de farinha de arroz ou filito, após 270 dias. Os conídios não formulados apresentaram 90% de viabilidade após 180 dias. A menor longevidade de conídios de *M. anisopliae* obtida no presente trabalho, quando comparada com os dois trabalhos citados, pode ser devida às diferenças de metodologia (umidade, temperatura, produção do fungo, avaliação da germinação etc.) e também devida a utilização de diferentes raças do fungo.

Os resultados obtidos por CLERK & MADELIN (1965) foram opostos aos obtidos no presente trabalho, em relação a

longevidade de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Estes autores, estudando os efeitos da luz, temperatura e umidade relativa (UR) na longevidade dos conídios não formulados, observaram que, nas combinações das condições: escuro, 18 ou 25°C e 0 ou 33% de UR (condições mais semelhantes à condição ambiente do presente trabalho), *B. bassiana* chegou a manter viabilidades de 83% aos 140 dias, enquanto que *M. anisopliae* manteve este nível de viabilidade apenas por 56 dias.

ALVES et alii (no prelo)¹, estudando a longevidade e virulência de conídios de *B. bassiana* armazenados em diferentes formulações e ambientes, obtiveram longevidades de conídios em formulações mantidas à temperatura ambiente, maiores do que foi obtido no presente trabalho. As formulações talco (4:1), Syloid (1:1) e o fungo em meio de arroz, mantiveram 100% de viabilidade durante 90, 150 e 120 dias, respectivamente. Entretanto o fungo não formulado perdeu completamente a viabilidade em 60 dias, resultado semelhante ao obtido no presente trabalho.

Os resultados já obtidos nos trabalhos de pesquisa com formulação e armazenamento de fungos entomopatogênicos ainda estão distantes do ideal sugerido por COUCH & IGNOFFO (1981) para produtos microbianos. Segundo estes autores, uma formulação comercial de entomopatógeno deve se man

¹ ALVES, S.B.; STIMAC, J.L.; PEREIRA, R.M. (ESALQ/USP, Piracicaba, SP). Formulações e armazenamento de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolado 447 (em elaboração).

ter viável em prateleiras, no mínimo, por um período de 18 meses.

Para que se alcance esta meta, torna-se necessário conhecer melhor a influência de fatores como: temperatura, umidade relativa e presença de CO₂ e/ou outros gases ou ausência de O₂, meio de cultura e outros, no metabolismo dos conídios durante o armazenamento. As prováveis alterações metabólicas nos conídios e que os levam a perder viabilidade e virulência durante o armazenamento, podem ser melhor entendidas através de analogias com a fisiologia de sementes. Assim, aquilo que os fisiologistas de sementes chamam de germinação e vigor parece ser muito semelhante ao que os entomopatologistas de nominam de viabilidade e virulência, respectivamente.

4.2. Controle de Colônias de *Cornitermes cumulans* por *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em Condições de Campo

4.2.1. Comparação de isolados dos fungos no controle de colônias de *Cornitermes cumulans*

Os resultados do teste de controle de colônias de *Cornitermes cumulans* com 4 isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* são encontrados na Tabela 6.

Tabela 6. Mortalidade e conidiogênese sobre *Cornitermes cumu*
lans no interior dos cupinzeiros polvilhados com
diferentes isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhi*
zium anisopliae. Piracicaba, 1990.

Espécie do fungo	Número do isolado	Mortalidade e conidiogênese após 10 dias de aplicação ¹	
		Mortalidade (%)	Conidiogênese (%)
<i>M. anisopliae</i>	865	100a	54a
<i>M. anisopliae</i>	866	96a	58a
<i>M. anisopliae</i>	259	98a	54a
<i>B. bassiana</i>	868	100a	98b
Testemunha	-	0	0

(*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%). C.V. (mortalidade = 2,7; conidiogênese = 11,4).

(1) 5 cupinzeiros de 25 a 45 cm de diâmetro ao nível do solo por tratamento (isolado).

Os isolados de *M. anisopliae* (865, 866 e 259) e o isolado de *B. bassiana* (868) foram altamente eficientes no controle das colônias de *C. cumu*lans, alcançando quase 100% de mortalidade, em apenas 10 dias da aplicação, não diferindo estatisticamente entre si. Em relação aos níveis de conidiogênese sobre os cupins mortos no interior dos cupinzeiros, o fungo *B. bassiana* foi estatisticamente superior a *M. aniso*pliae, atingindo quase 100% de conidiogênese sobre os cadâveres, enquanto que *M. anisopliae* não atingiu 60%. Os isolados de *M. anisopliae* não diferiram estatisticamente entre si

em relação aos níveis de conidiogênese sobre os cadáveres.

A ação dos fungos sobre os cupins no interior do cupinzeiro foi rápida, pois haviam cadáveres espalhados por todo o ninho, indicando que a maioria da população foi atingida pelos fungos e não houve tempo para que operários ativos acumulassem todos cadáveres no fundo do ninho ("instinto de as sepsia"). Na maioria dos cupinzeiros tratados com os fungos o furo de aplicação não foi tapado, ao contrário do que foi observado na testemunha, evidenciando ainda mais a rapidez de ação dos fungos e sua capacidade de desorganização das colô nias. Em apenas um cupinzeiro foi encontrada a rainha que se encontrava morta e com sinais externos (conidiogênese) do fungo (isolado 259). Pelo furo de aplicação não reparado, houve, em alguns cupinzeiros, penetração de água de chuva e de mos cas cujas larvas se alimentaram dos cadáveres pútridos dos cupins.

Selecionaram-se os isolados 868 de *B. bassiana* (nível de conidiogênese sobre os cadáveres superior aos de mais) e o isolado 865 de *M. anisopliae*, que passaram a ser utilizados nos demais experimentos deste trabalho. O isolado 865 foi selecionado por apresentar eficiência de controle igual aos demais e por ter sido superior aos demais, de acor do com observações em relação à produtividade e facilidade de sepração do meio de arroz durante o processo de produção (Tabela 7).

Tabela 7. Produção de conídios por diferentes isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pelo método da bandeja. Piracicaba, 1990.

Fungo	Nº do iso lado	Nº de coní dios/g de fungo	Produção por kg de arroz seco (g)	Produção total (Nº de conídios) kg de arroz seco
<i>B. bassiana</i>	868	$8,06 \times 10^{10}$	40,9	$3,30 \times 10^{12}$
<i>M. anisopliae</i>	865	$4,76 \times 10^{10}$	67,9	$3,23 \times 10^{12}$
<i>M. anisopliae</i>	866	$3,86 \times 10^{10}$	60,9	$2,35 \times 10^{12}$
<i>M. anisopliae</i>	259	$3,91 \times 10^{10}$	62,7	$2,45 \times 10^{12}$

A quantidade de conídios/g de *B. bassiana* foi 70% superior a *M. anisopliae* (865) devido ao menor tamanho do conídio do primeiro. É óbvio que na dose de 2 g de fungo/cupinzeiro a quantidade de conídios de *B. bassiana* foi maior do que de *M. anisopliae*. Optou-se pela padronização da dose em biomassa dos dois fungos, pois a padronização pelo número de conídios implicaria em um peso (e volume) de *B. bassiana* muito pequeno (1,2 g/cupinzeiro) em relação a *M. anisopliae* (2,0 g/cupinzeiro) e isto afetaria a eficiência de aplicação. A diluição de *B. bassiana* com algum inerte impossibilitaria a comparação dos fungos não formulados.

4.2.2. Comparação de doses dos fungos no controle de colônias de *Cornitermes cumulans*

Os resultados expressos em porcentagem de morta

lidade e conidiogênese no interior dos cupinzeiros de *Cornitermes cumulans* tratados com diversas doses de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* são apresentados na Tabela 8, enquanto que as doses letais (DL_{50}) aos 30, 60 e 90 dias após a aplicação dos fungos são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 8. Mortalidade e conidiogênese sobre *Cornitermes cumulans* no interior de cupinzeiros polvilhados com diversas doses de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Piracicaba, 1990.

Fungo	Dose (g de conídios por cupinzeiro) ¹	Mortalidade acumulada (%) após (dias)			Conidiogênese nas colônias mortas (%)
		30	60	90	
<i>B. bassiana</i>	0,0	0	0	0	0
	0,5	20	20	20	0
	1,0	36	40	40	40
	2,0	98	100	100	32
	4,0	56	80	100	22
	8,0	100	100	100	58
<i>M. anisopliae</i>	0,0	0	0	0	0
	0,5	16	30	40	20
	1,0	0	40	40	20
	2,0	42	50	80	44
	4,0	60	60	80	22
	8,0	80	100	100	22

(1) 5 cupinzeiros de 50 a 80 cm de diâmetro ao nível do solo por tratamento.

De acordo com os resultados (Tabela 8), observava-se que houve aumento na eficiência de controle de colônias de *C. cumulans* à medida que se aumentou a dose dos fungos por cupinzeiro. Entretanto, para *B. bassiana*, praticamente não houve acréscimo nos níveis de mortalidade no interior dos cupinzeiros a partir da dose de 2,0 g/cupinzeiro, evidenciando ser esta uma dose suficiente para controle de *C. cumulans*. Além disso, *B. bassiana* já apresentava, nas 3 doses maiores, uma eficiência de controle das colônias próxima a 100% entre 30 e 60 dias, enquanto que *M. anisopliae* só aproximou destes níveis aos 90 dias.

Os níveis de conidiogênese no interior dos cupinzeiros foi baixo para os dois patógenos, não sendo influenciados pelas doses dos fungos. Isto ocorreu devido à época das avaliações, pois em 30 dias o interior dos cupinzeiros já se encontrava muito seco e os cadáveres com ou sem conidiogênese haviam sido destruídos por formigas, acaros, moscas e outros artrópodos que invadiram o mesmo. Entretanto, observou-se que as maiores porcentagens de conidiogênese ocorreram sobre indivíduos das colônias que apresentavam grande número de formas aladas. As formas aladas constituem um substrato maior e aparentemente mais adequado ao crescimento dos fungos. Além disso, estas formas circulam por todo o cupinzeiro e certamente favoreceram a disseminação desses patógenos.

A maior rapidez no controle das colônias pelo

fungo *B. bassiana*, quando comparado com *M. anisopliae*, é ratificada pelas doses letais (Tabela 9).

Tabela 9. Doses letais de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para controle de colônias de *Cornitermes cumulans*. Piracicaba, 1990.

Fungo	Tempo após aplicação (dias)	DL ₅₀ (g de conídios/cupinzeiro)	Intervalo de confiança (5%)	Equação da reta
<i>B. bas</i> <i>siana</i>	30	1,2276	(0,2533 a 5,9485)	$y = 4,83255 + 1,88019 \log x$
	60	1,0287	(0,3877 a 2,7299)	$y = 4,96931 + 2,49691 \log x$
	90	0,9070	(0,5986 a 1,3743)	$y = 5,18946 + 4,47019 \log x$
<i>M. ani</i> <i>sopli</i> <i>ae</i>	30	2,4411	(1,5571 a 3,8268)	$y = 4,31125 + 1,77706 \log x$
	60	1,4933	(0,5752 a 3,8763)	$y = 4,73157 + 1,54153 \log x$
	90	0,9109	(0,3998 a 2,0759)	$y = 5,07269 + 1,79463 \log x$

Para ambos os fungos as doses letais (DL₅₀) foram reduzidas à medida que se retardou a época de avaliação, isto é, para controlar mais rapidamente as colônias de *C. cumulans*, doses maiores foram necessárias. Mas esta redução foi maior para *M. anisopliae* que, para aumentar a rapidez de controle de 50% das colônias de 90 para 30 dias, foi necessário aumentar a dose em 168% (de 0,91 para 2,44 g de conídios/cupinzeiro) enquanto que para *B. bassiana* este aumento foi de 35% (de 0,90 para 1,22 g de conídios/cupinzeiro). Esta maior rapidez da ação de *B. bassiana* é ainda reforçada pelos coeficientes angulares das retas, que foram sempre maiores para este fungo.

A ação mais lenta de *M. anisopliae* sobre as colônias de *C. cumulans* pode ser explicada pelas falhas na aplicação do fungo. Por ocasião das avaliações observou-se que grande parte dos conídios (principalmente de *M. anisopliae*) se encontrava acumulada no ponto de aplicação no interior do cupinzeiro. Além disso, foram observados constantes entupimentos da abertura da mangueira da polvilhadeira no ato de introdução da mesma pelo furo de aplicação.

Os resultados ainda mostram claramente, que quando a avaliação é feita aos 90 dias, os dois fungos apresentam a mesma DL_{50} , próxima aos 0,90 g de conídios/cupinzeiro (Tabela 9) e a eficiência de controle das colônias se aproxima dos 100% para doses a partir de 2,0 g de conídios/cupinzeiro (Tabela 8). A dose de 2,0 g de conídios/cupinzeiro foi considerada como eficiente e passou a ser utilizada nos experimentos seguintes.

4.2.3. Comparação de formulações dos fungos no controle de colônias de *Cornitermes cumulans*

Os níveis de mortalidade de *Cornitermes cumulans* no interior dos cupinzeiros polvilhados com *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* não formulados ou formulados com diferentes inertes são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Mortalidade de *Cornitermes cumulans* no interior de cupinzeiros^{**} polvilhados com diversas formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Piracicaba, 1990.

Fungo	Formulação (20% de fungo)	Mortalidade acumulada (%) após (dias)		
		20	60	150
<i>B. bassiana</i>	Arroz	20	70	80a
	Talco	10	40	60a
	Cartão	50	90	100a
	Caulim	30	50	60a
	Leucita	10	50	100a
	Não formulado	30	50	60a
Média	-	25,0A	58,3 B	76,6 B
<i>M. anisopliae</i>	Arroz	30	40	40a
	Talco	0	90	100a
	Cartão	30	70	80a
	Caulim	60	60	60a
	Leucita	30	50	80a
	Não formulado	20	50	100a
Média	-	26,6A	60,0 B	76,6 B
Testemunhas	-	0	0	0

(*) Médias na linha ou na coluna seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%). C.V. 51,5

(**) 5 cupinzeiros de 50 a 80 cm de diâmetro ao nível do solo por tratamento.

Os inertes utilizados nas formulações não afetaram as colônias de *C. cumulans* quando polvilhados, sem os fungos, no interior dos cupinzeiros (testemunhas). As médias de mortalidade nos cupinzeiros provocados pelos fungos *B. bassiana*

e *M. anisopliae* não diferiram estatisticamente entre si nas três épocas de avaliação e o mesmo ocorreu para o incremento na eficiência de controle em função do tempo. Os dois fungos provocaram aproximadamente 25% de mortalidade nos cupinzeiros aos 20 dias, 60% aos 60 dias e 76% aos 150 dias. Estatisticamente os resultados médios obtidos nas avaliações após 60 ou 150 dias não diferiram entre si, mas foram superiores a avaliação aos 20 dias.

O coeficiente de variação dos dados deste experimento (51,5%) foi muito alto devido ao método de avaliação utilizado, pois neste experimento cada cupinzeiro polvilhado foi acompanhado por vários meses e, somente quando não foi observado qualquer atividade durante as fragmentações superficiais, o mesmo foi arrancado e avaliado (nota 10 para mortalidade). Durante as fragmentações superficiais atribui-se nota 0 (cupinzeiro com atividade normal) ou 5 (cupinzeiro com pouca atividade). Desta forma os dados apresentaram grande variabilidade (notas 0, 5 ou 10) que aliada a análise estatística conjunta dos três fatores envolvidos (tempo, fungo e inerte) dificultou na obtenção de contrastes significativos. Assim, os resultados das análises estatísticas não refletem fielmente o fato biológico e os inertes cartão e leucita (90% de eficiência) não podem ser iguais a arroz e caulim (60% de eficiência). Neste caso a diferença não é de algumas dezenas de insetos mortos, mas sim de algumas centenas de milhares de soldados, operários, ninfas e ovos de *C. cumulans* mortos.

Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* não formulados apresentaram eficiência de controle estatisticamente igual as formulações na avaliação final aos 150 dias. Esperava-se que a diluição dos fungos nas formulações aumentasse a eficiência de aplicação e a distribuição do produto no interior do cupinzeiro e, com isso atingisse rapidamente uma mortalidade de 100% dos cupins. Entretanto, observou-se que os formulados se acumularam mais no interior dos cupinzeiros, do que os confídios não formulados.

O problema de entupimento da mangueira da polvilhadeira durante a aplicação dos fungos, observado no experimento anterior, foi solucionado neste experimento pela utilização de uma mangueira com diversos furos laterais em cerca de 20 cm da sua extremidade. Neste experimento ficou claro que seria possível aumentar a eficiência de controle das colônias de *C. cumulans*, melhorando os equipamentos e métodos de aplicação dos patógenos.

Durante as avaliações aos 150 dias, observou-se que várias colônias que estavam mortas, haviam sido consideradas vivas nas observações aos 60 dias, pois apresentaram, nesta época, grande atividade dos operários e tinham reconstruído o cupinzeiro, fragmentado aos 20 dias. Este fato evidencia que os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* podem se manter enzooticamente no interior do cupinzeiro e/ou sobreviver nos cadáveres, até que ocorram condições para o desencadea

mento de uma nova epizootia. Além disso, colônias debilitadas pelos fungos são mais facilmente destruídas por predadores como formigas, moscas etc.

4.2.4. Comparação de métodos de aplicação dos fungos no controle de colônias de *Cornitermes cumulans*

Os níveis de mortalidade e conidiogênese no interior de cupinzeiros de *Cornitermes cumulans* polvilhados com *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* utilizando diferentes métodos são apresentados na Tabela 11 e Figuras 1 e 2.

Durante a última avaliação aos 140 dias alguns tratamentos atingiram 100% de controle (*M. anisopliae* - com câmara, cartão e leucita; *B. bassiana* - com câmara). O tratamento *B. bassiana* - cartão alcançou 70% e *M. anisopliae* aplicado 2 vezes atingiu 90% de mortalidade das colônias.

A análise da variância conjunta dos efeitos dos fatores: tempo, fungo e método na mortalidade das colônias de *C. cumulans* e as comparações de médias através de Tukey (5%) mostraram (Tabela 11) que houve efeito significativo do fator fungo apenas aos 30 dias. O fungo *M. anisopliae* foi superior apresentando uma média de 74% de mortalidade das colônias contra 54% de *B. bassiana*. Entretanto, para as avaliações aos 45 e 75 dias e na média final estes fungos não diferiram en

Tabela 11. Mortalidade e conidiogênese sobre *Cornitermes cumu*
lans no interior de cupinzeiros** polvilhados com
Beauveria bassiana e *Metarhizium anisopliae* utili
zando diferentes métodos. Piracicaba, 1990.

Tempo após aplicação (dias)	Fungo	Mortalidade acumulada (%) Métodos de aplicação					Média
		sem câmara	com câmara	2 vezes cartão Leucita			
30	<i>B. bassiana</i>	30	80	50	50	60	54A
	<i>M. anisopliae</i>	70	80	70	90	60	74 B
	Testemunha	-	-	-	-	-	0
	Média	50a	80a	60a	70a	60a	64A
45	<i>B. bassiana</i>	50	80	90	50	80	70AB
	<i>M. anisopliae</i>	70	80	80	90	60	76AB
	Testemunha	-	-	-	-	-	0
	Média	60ab	80a	85a	70a	70a	73AB
75	<i>B. bassiana</i>	100	90	100	60	100	90 B
	<i>M. anisopliae</i>	90	90	80	90	80	84 B
	Testemunha	-	-	-	-	-	0
	Média	90b	90ab	90ab	75ab	90ab	87 B
Médias de conidiogênese nos cupinzeiros (%)	<i>B. bassiana</i>	37	29	23	22	28	28a
	<i>M. anisopliae</i>	8	22	11	13	9	13 b

(*) Médias na linha e na coluna seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%). C.V. 44,76.

(**) 10 cupinzeiros de 50 a 90 cm de diâmetro ao nível do solo por trata
mento.

tre si. Na avaliação final aos 140 dias *M. anisopliae* propor
cionou uma média de 96% e *B. bassiana* de 92% de mortalidade

das colônias. Houve efeito do fator tempo apenas para *B. bassiana*, cuja média de colônias mortas aos 75 dias (90%) foi significativamente maior da observada aos 30 dias (54%). Este efeito do tempo ocorreu para a média dos dois fungos (87% foi significativamente maior que 64% de colônias mortas). Houve efeito do fator tempo apenas para o método "sem câmara" cuja média de colônias mortas aos 75 dias (90%) foi significativamente superior aos observado aos 30 dias (50%). Este resultado mostrou que a utilização de uma câmara na mangueira da polvilhadeira aumentou a eficiência da aplicação, proporcionando uma melhor distribuição dos fungos no interior dos cupinzeiros, exterminando mais rapidamente as colônias. Os métodos de aplicação dos fungos não diferiram significativamente entre si.

Embora os níveis de conidiogênese dos fungos sobre *C. cumulans*, no interior dos cupinzeiros, tenham sido baixos (menor que 40%), em média *B. bassiana* (28%) foi significativamente superior a *M. anisopliae* (13%). As causas destes baixos níveis de conidiogênese já foram discutidas no item 4.2.2.

Neste experimento o coeficiente de variação (44,76%) foi menor do que no experimento do item 4.2.4. (51,50%), provavelmente devido ao aumento no número de repetições por tratamento que passou de 5 para 10 cupinzeiros. Entretanto, os aspectos discutidos naquele item (4.2.4.), em relação ao alto

coeficiente de variação, são também válidos para este experimento.

Figura 1. Mortalidade de colônias de *Cornitermes cumulans* polvilhadas com *Metarhizium anisopliae* utilizando diferentes métodos de aplicação. Piracicaba, 1990.

Figura 2. Mortalidade de colônias de *Cornitermes cumulans* polvilhadas com *Beauveria bassiana* utilizando diferentes métodos de aplicação. Piracicaba, 1990.

De acordo com os resultados (Figuras 1 e 2), pode-se inferir que de um modo geral, o fungo *M. anisopliae* apresentou uma ação inicial mais rápida do que *B. bassiana* no controle das colônias de *C. cumulans* nas avaliações até 45 dias. Aos 75 e 140 dias a ação dos fungos nivelou, sendo que ambos provocaram quase 100% de mortalidade das mesmas. Os 5 métodos de aplicação utilizados foram igualmente eficientes especialmente na avaliação final aos 140 dias. Ficou evidente, principalmente para *B. bassiana*, que a adaptação de uma câmara na mangueira da polvilhadeira aumentou a eficiência de

aplicação e a rapidez na mortalidade das colônias. A diluição dos fungos com cartão ou leucita não proporcionam ganho na eficiência de controle e portanto só deve ser utilizada em casos especiais quando se deseja aplicar doses muito baixas. A aplicação em 2 vezes foi eficiente e deve ser utilizada para cupinzeiros grandes (diâmetro ao nível do solo (dns) superior a 70 cm). Para a maioria dos cupinzeiros (dns < 70 cm) pode-se utilizar os fungos não formulados empregando-se uma polvilhadeira manual adaptada, com uma ou até duas câmaras e furos (5 mm no mínimo) nos 20 cm da extremidade da mangueira.

4.2.5. Sobrevivência e ciclo biológico dos fungos no interior dos cupinzeiros de *Cornitermes cumulans*

4.2.5.1. Longevidade dos conídios dos fungos no interior dos cupinzeiros

A longevidade de conídios de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no interior de cupinzeiros de *Cornitermes cumulans* é apresentada na Figura 3.

Figura 3. Longevidade de conídios de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no interior de cupinzeiros de *Cornitermes cumulans* em Piracicaba - SP. Piracicaba, 1990.

Os conídios de *M. anisopliae* mantiveram viabilidade superior a 90% por 90 dias, enquanto que *B. bassiana* apresentou redução na viabilidade a partir do 3º dia e decorridos 15 dias apresentou 84,2% de conídios viáveis. Após 30 dias os conídios de *B. bassiana*, originalmente polvilhados, haviam desaparecido e não foi possível continuar a avaliação. Isto ocorreu devido a invasão dos cupinzeiros por acários, moscas, *Anoplotermes* sp., colêmbolos, bactérias e fungos saprófitas (*Penicillium* e outros de coloração esbranquiçada). Observando a tendência de queda na viabilidade dos conídios de *B. bassiana* até 15 dias e os níveis de mortalidade de *C. cumu*

lans expostos aos fragmentos dos cupinzeiros coletados aos 30 e 45 dias (Tabela 12), pode-se afirmar que os conídios deste fungo não sobreviveram dentro do cupinzeiro por mais de 45 dias. A pequena elevação na viabilidade dos conídios de *B. bassiana* aos 10 dias pode ter ocorrido devido a contaminação dos fragmentos do ninho por conídios produzidos sobre os cadáveres.

A longevidade de conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* no interior de cupinzeiros de *C. cumulans* foi muito semelhante ao que ocorreu no item 4.1.4., quando estes fungos, não formulados, foram armazenados em condições ambiente do laboratório.

A avaliação da viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* após 90 dias não foi possível devido à invasão dos cupinzeiros por raízes de pastagem e desintegração do centro celulósico.

A virulência de conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* após 30, 45 e 90 dias no interior dos cupinzeiros é mostrada na Tabela 12.

Tabela 12. Virulência de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* a *Cornitermes cumulans*, em laboratório, após 30, 45 e 90 dias no interior de cupinzeiros no campo. Piracicaba, 1990.

Tempo no cupinzeiro (dias)	Tratamento	Mortalidade acumulada (%) após (dias)			Conidogênese (%)
		2	3	5	
30	Testemunha	3,7 bc	5,0 c	8,7 c	0
	<i>B. bassiana</i>	11,2 bc	31,2 bc	75,0ab	8,7
	<i>M. anisopliae</i>	88,7a	100,0a	100,0a	27,5
45	Testemunha	0 c	6,2 c	30,0 bc	0
	<i>B. bassiana</i>	10,0 bc	41,2 b	65,0 b	10,0
	<i>M. anisopliae</i>	100,0a	100,0a	100,0a	21,2
90	Testemunha	25,0 b	30,0 bc	-	0
	<i>B. bassiana</i>	-	-	-	-
	<i>M. anisopliae</i>	100,0a	100,0a	-	19,0

(*) Médias na coluna seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%). C.V. (dias 2 e 3 = 26,6; dia 5 = 26,9).

Os conídios de *M. anisopliae* se mantiveram viáveis e virulentos a *C. cumulans* após 30, 45 e 90 dias no interior dos cupinzeiros. Este fungo provocou 100% de mortalidade de *C. cumulans* entre 2 e 3 dias, quando expostos aos fragmentos contaminados com conídios, retirados dos cupinzeiros após 30, 45 e 90 dias do polvilhamento. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos nos bioensaios iniciais deste trabalho (Tabelas 3 e 4), para este mesmo isolado de *M. anisopliae* (865).

De acordo com a Tabela 12 observa-se que o fungo *B. bassiana*, após a permanência de 30 dias no cupinzeiro, provocou 75% de mortalidade de *C. cumulans*, em laboratório, enquanto que após 45 dias este nível foi reduzido para 65%, não diferindo da testemunha. Os altos coeficientes de variação foram devidos ao tratamento *B. bassiana*. Em algumas amostras de fragmentos de ninho (repetições) ocorreu 100% de mortalidade de *C. cumulans* em 4 dias, enquanto que em outros este nível foi atingido em 10 dias (igual à testemunha), evidenciando que os conídios de *B. bassiana* tornaram-se em, alguns cupinzeiros, completamente inativados aos 30 dias.

Os baixos níveis de conidiogênese sobre os cadáveres de *C. cumulans* nestes bioensaios, ocorreram provavelmente devido a presença de muitos contaminantes (âcaros, fungos e bactérias etc.) presentes no cupinzeiro no campo e levados, juntamente com os fragmentos de ninho, para laboratório.

4.2.5.2. Ciclo biológico dos fungos no interior dos cupinzeiros

a) Comportamento das colônias de *Cornitermes cumulans* e desenvolvimento dos fungos no interior dos cupinzeiros tratados

O comportamento de *Cornitermes cumulans* e desenvolvimento de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no interior dos cupinzeiros tratados foram muito semelhantes nos

experimentos iniciados em janeiro (verão) e em junho (inverno) e serão abordados conjuntamente ao longo do tempo.

1º dia: Colônias vivas e com aspecto normal; grande número de operários, soldados, ninfas de diversos estágios e acúmulo de ovos. População concentrada nas partes do cupinzeiro abaixo do nível do solo. Foram encontradas 3 rainhas (1 em cupinzeiro tratado com *B. bassiana* e 2 em cupinzeiros com *M. anisopliae*), vivas e ágeis. Todas rainhas morreram após 2 a 3 dias no laboratório, mas apenas uma delas foi colonizada por *M. anisopliae*; as outras duas foram invadidas por bactérias. Formas pré-aladas ausentes (verão) ou presentes (inverno).

2º dia: Colônias com mortalidade acima de 30%; mortos e moribundos de todas castas acumulados no fundo do ninho (centro celulósico e parte argilosa), sob o ninho e nos canais de saída inferiores. Presença de formas pré-aladas esbranquiçadas (inverno) ativas e circulando nos ninhos maiores. Foram encontradas duas rainhas mortas (cupinzeiros menores - inverno), 1 casal real (rainha e rei) e mais 2 rainhas vivas. As rainhas vivas morreram em laboratório após 2 a 3 dias e todas foram invadidas por bactérias. Uma das rainhas encontradas mortas nos cupinzeiros apresentava furos pelo corpo, indicando canibalismo ou tentativa dos operários sádios de carregá-la para o fundo do ninho.

3º dia: mortalidade nas colônias variando de 40

a 100%. Grande acúmulo de cadáveres de operários, soldados, ninfas e ovos, mortos e moribundos distribuído no ninho abaixo do nível do solo. Em acúmulos esbranquiçados de ninfas e ovos mortos, nas partes periféricas do fundo do ninho, já se evidenciam sinais de crescimento micelial de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Foram encontradas 7 rainhas (1 viva e ágil, 3 moribundas e 3 mortas). Uma das rainhas mortas se encontrava sem cabeça e pernas. Em um único cupinzeiro foram encontradas 2 rainhas moribundas que após a morte, em laboratório, apresentaram sinais de conidiogênese (*M. anisopliae*). As demais rainhas mortas ou vivas (após a morte) foram invadidas por bactérias. Algumas formas pré-aladas (inverno) mortas e com aspecto mumificado. Observou-se um cupinzeiro sendo invadido por *Anoplotermes* sp.

4º dia: mortalidade nas colônias variando de 50 a 100%. Aparecem os primeiros sinais de conidiogênese sobre os cadáveres, principalmente nos acúmulos de ninfas e ovos. Foram encontrados um casal real, e duas rainhas vivas, e uma rainha morta. Todos foram invadidos por bactérias após a morte. Observou-se também, cupinzeiro invadido por *Anoplotermes* sp.

5º dia: mortalidade nas colônias variando de 70 a 100%, baixos níveis de conidiogênese sobre cadáveres (< 10%). Muitas formas pré-aladas ainda vivas (inverno). Cadáveres acumulados no fundo do ninho (verão) com aspecto de "sopa" escura e exalando mal cheiro, e com grande número de lar

vas de moscas, ácaros (Acaridae) e outros artropodos, além de minhocas (anelídeo). Foram encontradas 1 rainha viva e 2 mortas, mas todas foram colonizadas por bactérias após a morte.

7º dia: mortalidade nas colônias variando de 80 a 100%; níveis de conidiogênese superior a 10%, principalmente nos acúmulos de ovos e ninfas. Em alguns ninhos tratados com *B. bassiana* (inverno) haviam cadáveres com conidiogênese por quase todo ninho. Nos ninhos grandes (inverno) presença de muitas formas pré-aladas mortas por todo ninho. Rainhas não foram encontradas. Colônias mortas invadidas por larvas de moscas, colembolos, ácaros, bactérias, nematóides e por fungos brancos (*Penicillium* sp e outros). Estes fungos invadiram completamente a parte mais úmida do centro celulósico. A parte inferior dos cupinzeiros tornou-se inabitável devido a presença de cadáveres com conidiogênese ou não, que obstruíram as câmaras e galerias de saída inferiores. Observou-se que, em alguns cupinzeiros, os operários e soldados vivos passaram a habitar a parte superior e lateral do mesmo. Nestes casos havia a presença de ovos, sugerindo que os sobreviventes tentavam recuperar a colônia. Observou-se um cupinzeiro invadido por *Anoplotermes*.

10º dia: A maioria dos cupinzeiros com 100% de mortalidade das colônias. Níveis de conidiogênese (inverno) mais altos para *B. bassiana* (40 a 80%) do que *M. anisopliae*

(20%). Um único cupinzeiro tratado com *M. anisopliae* apresentou 100% de conidiogênese sobre os cadáveres e neste cupinzeiro a rainha encontrava-se completamente coberta pelo fungo (única rainha encontrada com conidiogênese dentro do cupinzeiro). Na maioria dos cupinzeiros a parte inferior ("sopa de cadáveres") se encontrava ressecada (verão). A presença de cupins vivos, moribundos e recém mortos indicava que a epizootia prosseguia nos cupinzeiros grandes (inverno). Presença de ácaros em grande número.

15º dia: Em apenas 1 cupinzeiro grande (inverno) havia cupins vivos, moribundos e mortos com conidiogênese ou não, por todo ninho. Os níveis de conidiogênese semelhantes aos observados no 10º dia. Um grande número de colônias estavam mortas e secas (verão). Dois ninhos foram invadidos por *Anoplotermes*.

30º dia: 100% das colônias encontravam-se mortas e com baixos níveis de conidiogênese sobre cadáveres (secos). Cinco cupinzeiros foram invadidos por *Anoplotermes*. Todos os cupinzeiros invadidos por raízes da pastagem (*Brachiaria*), sugerindo que a invasão não ocorre enquanto a colônia de *C. cumulans* está viva, porque estes cupins comem as raízes. Esta invasão pelas raízes da pastagem foi muito mais acentuada nas observações aos 45 dias.

Colônias de *Anoplotermes* sp. ocorrem frequentemente cohabitando cupinzeiros de *C. cumulans* e grande parte

dos cupinzeiros após a morte das colônias pelos fungos, foram invadidos por este cupim. Em cupinzeiros com altos níveis de conidiogênese, principalmente de *B. bassiana*, as diversas castas de *Anoplotermes* circulavam livremente, evidenciando que provavelmente este cupim não seja suscetível a estes fungos.

O "instinto de assepsia" de *C. cumulans* observado sob condições de laboratório e discutido anteriormente (ítem 4.1.3.) parece ser o único mecanismo de defesa das colônias contra a ação dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* nos cupinzeiros no campo. A mortalidade nos cupinzeiros polvilhados com estes fungos se inicia pelos indivíduos, principalmente ovos e ninfas no centro celulósico, contaminados durante a aplicação. Os operários mais ativos vão acumulando os mortos nas câmaras mais periféricas do fundo do ninho e após alguns dias toda parte subterrânea do cupinzeiro está completamente cheia de cadáveres. Se a quantidade de fungo for baixa ou mal aplicada, de modo que apenas uma pequena parte da colônia seja contaminada e morta inicialmente, é provável que, através do "instinto de assepsia", os operários ativos consigam reduzir gradativamente o potencial de inóculo do fungo no cupinzeiro, e a colônia se recupere após alguns meses.

Este "instinto de assepsia" comum nos cupins e em outros insetos sociais, dificulta o controle dos mesmos pela introdução de pequenas quantidades de patógenos nas colô

nias (indução de epizootia ou introdução inoculativa), como foi tentado por HANEL & WATSON (1983) com *Nasutitermes exitiosus*. Estes autores introduziram pequenas quantidades de *M. anisopliae* nos cupinzeiros no campo e observaram que o fungo persistiu nas colônias por até 15 semanas. Entretanto, as colônias se recuperaram e os autores não conseguiram explicar o fato. É evidente que o "instinto de assepsia" nas colônias de *N. exitiosus* foi a principal barreira para o fungo *M. anisopliae*.

Das 23 rainhas e 2 reis encontrados nos dois experimentos (verão e inverno), apenas 2 foram colonizados por fungo (*M. anisopliae*) e apresentaram conidiogênese sobre o cadáver, as demais foram invadidas por bactérias. Foram encontradas 4 rainhas moribundas e 11 vivas (que morreram em laboratório) além de 8 já mortas. Provavelmente o baixo nível de rainhas com conidiogênese foi devido a pequena dose de fungo que chegou até elas, principalmente através de operários contaminados. Em rainhas de cupinzeiros não tratados e inoculadas com altas doses de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em laboratório, ambos fungos apresentaram conidiogênese sobre os cadáveres. Desta forma, as rainhas no campo são mortas por estes fungos, mas imediatamente após a sua morte, seu corpo é invadido por bactérias presentes no tubo digestivo ou contaminantes sobre seu abdome.

b) Mortalidade e conidiogênese sobre *Cornitermes cumulans* no

interior dos cupinzeiros em duas épocas

Os tempos letais para mortalidade de 50% (TL_{50}) da população dos cupinzeiros de *Cornitermes cumulans* polvilhada com *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Tempos letais de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para controle de colônias de *Cornitermes cumulans* em duas épocas. Piracicaba, 1990.

Fungo	Época	TL_{50} (dias)	Intervalo de confiança (5%)	Equação da reta
<i>B. bassiana</i>	Verão	3,7215	(2,8332;4,8884)	$Y=2,82041 + 3,81901\log x$
	Inverno	1,7940	(0,7947;4,0500)	$Y=4,54128 + 1,80719\log x$
<i>M. anisopliae</i>	Verão	2,1615	(1,7349;2,6929)	$Y=3,7599 + 3,70451\log x$
	Inverno	2,2844	(1,6196;3,222)	$Y=4,03995 + 2,67597\log x$

De acordo com a Tabela 13, observa-se que a época de aplicação influenciou mais a mortalidade de colônias de *C. cumulans* por *B. bassiana* do que por *M. anisopliae*. *M. anisopliae* apresentou tempos letais (TL_{50}) semelhantes no verão e inverno (2,16 e 2,28 dias, respectivamente) enquanto que para *B. bassiana* o tempo letal (TL_{50}) no verão foi aproximadamente o dobro do inverno (1,79 dias). No verão o fungo *M. anisopliae* apresentou uma ação mais rápida (TL_{50} menor) do que *B. bassiana*, enquanto que no inverno ocorreu o contrário.

A comparação do desenvolvimento do fungo (mortalidade e conidiogênese) no interior dos cupinzeiros polvilhados é apresentada na Figura 4.

Figura 4. Mortalidade e conidiogênese sobre *Cornitermes* cumulans no interior de cupinzeiros polvilhados com *Beauveria bassiana* (Bb) e *Metarhizium anisopliae* (Ma) em duas épocas. Piracicaba, 1990.

Observou-se pela Figura 4, que os níveis de mortalidade e conidiogênese nos cupinzeiros polvilhados com os dois fungos foram superiores no inverno em relação ao verão. Entretanto, de uma maneira geral para os dois períodos, as curvas de mortalidade apresentaram um grande incremento inicial até o 5º dia, aproximando-se dos 80% de mortalidade das

colônias. Para atingir os 100% o tempo variou de 7 dias (Bb e Ma no inverno) até 30 dias (Bb verão).

No verão os níveis de conidiogênese sobre os cadáveres foram muito baixos, mas Ma foi superior a Bb apresentando 22% contra 12% de Bb aos 10 dias. Provavelmente a maior presença de contaminantes no cupinzeiro morto (ácaros, fungos, bactérias etc.) no verão em relação ao inverno, juntamente com temperaturas mais altas, foram os fatores responsáveis pela baixa porcentagem de conidiogênese sobre os cadáveres.

No inverno os níveis de conidiogênese sobre os cadáveres de *C. cumulans*, foram mais altos para Bb do que para Ma. O pico de conidiogênese ocorreu no 10º dia quando Bb atingiu 60% contra 46% de Ma. Os 100% de conidiogênese de Bb observado aos 60 dias foi devido ao grande crescimento saprofítico deste fungo sobre os cadáveres e sobre o cartão do centro celulósico, favorecido pelo alto índice pluviométrico durante o mês de julho de 1990 em Piracicaba.

De acordo com os resultados deste experimento pode-se recomendar, para cupinzeiros com diâmetro ao nível do solo menor que 60 cm, que a avaliação da mortalidade e conidiogênese no interior de cupinzeiros de *C. cumulans* polvilhados com Bb e Ma, seja feita entre 10 e 15 dias após a aplicação.

c) Mortalidade das colônias de *Cornitermes cumulans* de cupin

zeiros de diferentes tamanhos.

Os tempos letais (TL_{50}) de *Beauveria bassiana* ou *Metarhizium anisopliae* polvilhados em cupinzeiros de *Cornitermes cumulans* de diferentes tamanhos são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Tempos letais de *Beauveria bassiana* ou *Metarhizium anisopliae* para controle de colônias de *Cornitermes cumulans* em cupinzeiros de diferentes tamanhos. Piracicaba, 1990.

Tamanho do cupinzeiro	Diâmetro ao nível do solo (cm)	TL_{50} (dias)	Intervalo de confiança (5%)	Equação da reta
Pequeno	menor que 45	1,3649	(0,6037; 3,0860)	$Y=4,43072 + 4,21392\log x$
Médio	45 - 60	1,9869	(0,8949; 4,4115)	$Y=4,05696 + 3,16271\log x$
Grande	60 - 90	4,6972	(3,7702; 5,8520)	$Y=3,28142 + 2,55804\log x$

De acordo com os tempos letais (TL_{50}) apresentados na Tabela 14, observa-se que existe uma grande influência do tamanho do cupinzeiro de *C. cumulans* no tempo necessário para que *B. bassiana* ou *M. anisopliae* provoquem 50% de mortalidade das colônias. Para cupinzeiros com diâmetro ao nível do solo (DNS) menor que 60 cm, os TL_{50} destes fungos são menores que 2 dias, enquanto que para cupinzeiros grandes (DNS: 60-90 cm) este tempo chega a quase 5 dias.

Os efeitos do tamanho do cupinzeiro são ainda mais evidentes para o tempo necessário para que *B. bassiana*

ou *M. anisopliae* provoquem 100% de mortalidade das colônias de *C. cumulans* (Figura 5). Enquanto as colônias de cupinzeiros médios e pequenos foram completamente exterminadas em apenas 7 dias, para alguns dos cupinzeiros grandes isto ocorreu depois de 30 dias. Entretanto aos 7 dias cerca de 60% das colônias dos cupinzeiros grandes estavam completamente exterminadas, evidenciando que nem sempre um cupinzeiro grande é habitado por uma colônia de *C. cumulans* forte e populosa.

Figura 5. Mortalidade de colônias de *Cornitermes cumulans* em cupinzeiros de diferentes tamanhos, polvilhados com *Beauveria bassiana* ou *Metarhizium anisopliae*. Piracicaba, 1990.

A eficiência de controle de colônias de grandes cupinzeiros de *C. cumulans* é influenciada pelas condições bio

lógicas da colônia no momento da aplicação (capacidade de postura da rainha, população de operários e formas pré-aladas ou aladas, etc.), e principalmente pela dose e eficiência de aplicação dos fungos. Se o fungo for mal distribuído no interior do cupinzeiro, o impacto de sua ação sobre a colônia de *C. cumulans* pode ser insignificante de modo a facilitar a recuperação da mesma. As colônias de cupinzeiros médios e pequenos são mortas rapidamente por *B. bassiana* e *M. anisopliae* porque, durante a aplicação, estes fungos atingem grande parte da colônia inclusive a rainha.

Os resultados apresentados na Tabela 14 e Figura 5, evidenciaram que a dose de 2 g de conídios/cupinzeiro deve ser melhor ajustada ao tamanho do cupinzeiro de modo a reduzir o custo de controle. Para cupinzeiros pequenos e médios esta dose pode ser reduzida para 0,5 a 1,00 g de conídios/cupinzeiro, sem perda na eficiência de controle.

4.2.6. Comparação de custos de controle das colônias de *Cornitermes cumulans* utilizando inseticidas químicos e fungos

Os diversos itens que compõem os custos de controle das colônias de *Cornitermes cumulans* utilizando inseticidas químicos e os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Custos de controle de colônias de *Coniitesmes cumulans* utilizando inseticidas químicos e fungos**. Piracicaba, 1990.

Produto comercial ou fungo	Preço do produto* em Cr\$/g de ingrediente ativo (ia)	g de i.a. por cupinzeiro	Custo de aplicação Cr\$/cupinzeiro		Custo total/Cupinzeiro	
			Mão-de-obra	Transporte	Cr\$	BTNF US\$
Lebaycid 500 CE 50%	4,00	1,25	10,00	10,00	25,00	0,35 0,23
Dursban 4EBR 48%	5,55	1,57	10,00	10,00	28,70	0,40 0,26
Isca granulada (Mirex-0,45%)	44,4	0,18	10,00	5,00	23,00	0,32 0,21
<i>B. bassiana</i>	3,67	2,00	10,00	5,00	22,35	0,31 0,20
<i>M. anisopliae</i>	2,45	2,00	10,00	5,00	19,90	0,28 0,18

(*) Preço dos inseticidas químicos no mercado de Piracicaba; custo de produção dos fungos.

(**) Considerou-se a eficiência de controle igual 90% para inseticidas químicos e fungos.

De acordo com a Tabela 15, pode-se inferir que os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* apresentaram os menores custos de controle para as colônias de *C. cumulans*. Os concentrados emulsionáveis (Lebaycid e Dursban) apresentaram os maiores custos, e além disso, a forma de aplicação destes inseticidas exige uma grande quantidade de água, tornando impraticável sua utilização em grandes áreas. A isca granulada (Mirex) não apresenta este inconveniente e o custo de controle é bem próximo ao dos fungos. Entretanto, este produto apresenta eficiência de controle muito inconstante e além disso o seu ingrediente ativo é um clorado muito persistente no ambiente, tóxico aos animais, carcinogênico para o homem.

Além do menor custo de controle, os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* não apresentam os inconvenientes citados acima para os inseticidas e, por outro lado, apresentam outras vantagens como: especificidade para os cupins, atóxicos ao homem e outros animais e multiplicam-se sobre os cadáveres dos cupins (conidiogênese). Os altos níveis de conidiogênese sobre os cadáveres de *C. cumulans* especialmente no inverno, evidenciam que o fungo produzido num cupinzeiro pode ser utilizado para controle de outros e com isso reduzir ainda mais o custo de controle. Futuras pesquisas deverão ser desenvolvidas para estudo deste aspecto.

A principal desvantagem dos fungos esta relação

nada a sua baixa estabilidade no armazenamento sob condições ambiente limitando sua utilização à produção sob encomenda, e exigindo acompanhamento de um técnico especializado desde a produção até a aplicação no campo. Esta desvantagem não inviabiliza a utilização de *B. bassiana* e *M. anisopliae* para controle de *C. cumulans* e outras espécies de cupins, pois para estes insetos existe uma maior flexibilidade no tempo para controle. Assim, a produção do fungo pode ser planejada em alguns meses e a aplicação pode ser feita numa época mais adequada aos fungos.

4.3. Suscetibilidade de Outras Espécies de Cupins a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

Em bioensaios de laboratório e/ou teste de controle no campo, os fungos *Beauveria bassiana* (isolado 868) e *Metarhizium anisopliae* (isolado 865) foram altamente patogênicos a todas espécies de cupins avaliados (Tabela 16).

Tabela 16. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* a diversas espécies de cupins em Piracicaba (SP) e Goiânia (GO). Piracicaba, 1990.

Espécie de cupim	Local do teste	Tipo de teste	Espécie de fungo	Controle das colônias no campo (%)	Mortalidade no bioensaio após 3 dias (%)
<i>Cornitermes snijderi</i>	Goiânia	Campo	<i>B.bassiana</i>	100	-
			<i>M.anisopliae</i>	100	-
<i>Syntermes</i> sp.	Goiânia	Campo	<i>B.bassiana</i>	100	-
			<i>M.anisopliae</i>	100	-
<i>Cryptotermes</i> sp.	Piracicaba	Campo	<i>B. bassiana</i>	100	100
		Laboratório	<i>M.anisopliae</i>	100	100
<i>Heterotermes</i> sp.	Piracicaba	Laboratório	<i>B.bassiana</i>	-	100
			<i>M.anisopliae</i>	-	100
<i>Nasutitermes</i> sp.	Piracicaba	Campo	<i>B.bassiana</i>	100	-
			<i>M.anisopliae</i>	100	-
<i>Coptotermes havilandi</i>	Piracicaba	Campo e	<i>B. bassiana</i>	?	100
		Laboratório	<i>M.anisopliae</i>	?	100

Os gêneros das espécies avaliadas pertencem a 3 famílias: Termitidae (*Syntermes*, *Cornitermes*, *Nasutitermes*), Rhinotermitidae (*Coptotermes* e *Heterotermes*) e Kalotermitidae (*Cryptotermes*) e estão entre os cupins que causam maiores prejuízos no mundo. Este largo espectro de ação de *B. bassiana* e *M. anisopliae* dentro da ordem Isoptera, mostra que estes fungos podem ser patogênicos à maioria das espécies de cupins que causam algum tipo de prejuízo ao homem e, portanto, apresen

tam grande potencial para controle das mesmas. Os patógenos, principalmente os fungos, podem atingir (pela contaminação de operários e soldados diretamente ou nos locais de alimentação, nas trilhas, túneis, etc.) colônias de cupins como: *Heterotermes*, *Coptotermes*, *Syntermes*, *Cryptotermes* e outros, que habitam locais impossíveis de serem atingidos pelos inseticidas químicos. Além disso os patógenos são muito mais seguros para o homem do que os inseticidas químicos para controle, por exemplo, de cupins que infestam residências, móveis etc.

Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* podem se tornar alternativas eficientes e viáveis, ecológica e economicamente, para controle de cupins que causam prejuízos ao homem, desde que pesquisas profundas sejam desenvolvidas visando elucidar melhor os aspectos biológicos, ecológicos e comportamentais destes insetos, bem como selecionar isolados eficientes destes fungos e utilizar métodos adequados de aplicação.

5. CONCLUSÕES

- Os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* são patogênicos às espécies *Cornitermes cumulans*, *C. snyderi*, *Cryptotermes* sp., *Coptotermes havilandi*, *Syntermes* sp., *Nasutitermes* sp. e *Heterotermes* sp..

- A formulação em pó de *B. bassiana* e *M. anisopliae* com diversos inertes, não aumenta a longevidade dos conídios sob condição ambiente em laboratório, nem a eficiência de controle de colônias de *C. cumulans* no campo.

- A dosagem de 2 g de conídios/cupinzeiro, de *B. bassiana* ou de *M. anisopliae*, aplicada com uma polvilhadeira manual adaptada, é eficiente no controle de colônias de *C. cumulans* no campo.

- O fungo *M. anisopliae* é mais eficiente no controle de colônias de *C. cumulans* no verão e *B. bassiana* no inverno.

- O fungo *M. anisopliae* sobrevive por mais tempo

po que *B. bassiana* no interior de cupinzeiros de *C. cumulans* no campo.

- A defesa das colônias de *C. cumulans* contra os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* é feita pelos operários que isolam e enterram os cadáveres, devido ao seu desenvolvimento "instinto de assepsia".

- Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* podem ser utilizados como alternativa biológica no controle de colônias de *C. cumulans*, apresentando vantagens do ponto de vista ecológico e econômico sobre os inseticidas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.B. Epizootiologia. In: _____, coord. Controle mi
crobiano de insetos. São Paulo, Manole, 1986a. p.28-64.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: _____, coord. Contr
ole microbiano de insetos. São Paulo, Manole, 1986b. p.
73-126.

ALVES, S.B. Produção de fungos entomopatogênicos. In: _____,
coord. Controle microbiano de insetos. São Paulo, Manole,
1986c. p.311-23.

ALVES, S.B.; SILVEIRA NETO, S.; PEREIRA, R.M.; MACEDO, N. Es
tudo de formulações do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) so
rok. em diferentes condições de armazenamento. Ecossistema,
Espírito Santo do Pinhal, 12: 78-87, 1987.

AMANTE, E. Ensaio de campo para controlar o cupim de montículo
Cornitermes cumulans (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitil
dae). Divulgação Agronômica, Rio de Janeiro, 9: 30-3, 1963.

ARAUJO, R.L. Os cupins. O Biológico, São Paulo, 6: 185-8,
1940.

- ARAUJO, R.L. Termites of the Neotropical Region. In: Krishna & Weesner (ed.). Biology of termites. New York and London, Academic Press, 1970. vol. 2. cap. 12, p.527-76.
- BANDEIRA, A.G. Ecologia de cupins (Insecta: Isoptera) da Amazonia Central: efeitos do desmatamento sobre as populações. Acta Amazônica, **9**(3): 481-99, 1979.
- BAO, L.L. & YENDOL, W.G. Infection of the eastern subterranean termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar) with the fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. Entomophaga, Paris, **16**: 343-52, 1971.
- CANCELLO, E.M. Revisão de *Cornitermes* Wasmann (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). São Paulo, 1989. 136p. (Doutorado - Instituto de Biociências/USP).
- CLERK, T.C. & MADELIN, M.F. The longevity of three insect-parasiting hyphomycetes. Transactions British Mycological Society, Cambridge, **48**(2): 193-209, 1965.
- COLLINS, M.S. Water relations in termites. In: Krishna & Weesner (ed.). Biology of termites. New York and London, Academic Press, 1969. vol. 1, cap. 14, p.433-58.
- COUCH, T.L. & IGNOFFO, C.M. Formulation of insect pathogen. In: Burges, H.D., ed. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. New York, Academic Press, 1981. p.621-34.

CUNHA, O.R. A luta contra o cupim; III. O campo, Rio de Janeiro, 6: 30-32, 1935.

CUNHA, O.R. Mundo estranho (a vida dos cupins). Rio de Janeiro, Irmãos DONGETTI, ed., 1961. 201p.

DAOUST, R.A.; WARD, M.G.; ROBERTS, D.W. Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. Journal of Invertebrate Pathology. New York, 40: 228-36, 1982.

DAOUST, R.A.; WARD, M.G.; ROBERTS, D.W. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 41: 151-160, 1983.

DAOUST, R.A. & ROBERTS, D.W. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology. New York, 41: 143-150, 1983a.

DAOUST, R.A. & ROBERTS, D.W. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of growth substrate on conidia survival and virulence against mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 41: 161-170, 1983b.

DAOUST, R.A. & PEREIRA, R.M. Survival of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliales) conidia on cadavers of cowpea pests stored outdoors and in the laboratory in Brazil. Environmental Entomology, College Park, **15**: 642-47, 1986.

FARGUES, J. & ROBERT, P.H. Persistence des conidiospores des hyphomycetes entomopathogenes *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., *Nomuraea rileyi* (F.) Sanson et *Paecilomyces fumosoroseus* Wize dans le sol, en conditions controle'es. Agronomie. **5**(1): 73-80, 1985.

FERNANDES, P.M. Influência da temperatura, umidade relativa do ar e dose na eficiência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre *Cerotoma arcuata* Oliv. (Col.: Chrysomelidae). Piracicaba, 1986. 68p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

FONSECA, J.P. Medidas contra os cupins que constroem ninhos expostos. O Biológico, São Paulo, **10**: 221, 1944.

FONSECA, J.P. Destruição de ninhos de cupins. O Biológico, São Paulo, **11**: 173, 1945.

FURQUIM, M.R.; KAMIZONO, Y.; ANDRADE, S.C.; TOLEDO, W.A.; MARI CONI, F.A.M. Combate experimental ao cupim *Cornitermes cumulans* (Kollar). O Solo, Piracicaba, **60**: 57-62, 1968.

- GRASSÉ, P.P. Sur le nid et la biologie de *Cornitermes cumulans* (Kollar) termite brésilien. Insectes Sociaux, Paris, 5: 189-200, 1958.
- HANEL, H. A bioassay for measuring the virulence of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (fungi imperfecti) against the termite *Nasutitermes exitiosus* (Hill.) (Isoptera, Termitidae). Zeitschrift für Angewandte Entomologie, Berlin, 92: 9-18, 1981.
- HANEL, H. Selection of a fungus species suitable for the biological control of the termite *Nasutitermes exitiosus* (Hill.) Zeitschrift für Angewandte Entomologie, Berlin, 94: 236-45, 1982a.
- HANEL, H. The life cycle of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the termite *Nasutitermes exitiosus*. Mycopathologia, Den Haag, 80: 137-45, 1982b.
- HANEL, H. & WATSON, J.A.L. Preliminary field tests on the use of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Nasutitermes exitiosus* (Hill.) (Isoptera - Termitidae). Bulletin of Entomological Research, London, 73: 305-13, 1983.
- KO, W.H.; FUJII, J.K.; KANEGAWA, K.M. The nature of soil pernicious to *Coptotermes formosanus*. Journal of Invertebrate Pathology. New York, 39: 38-40, 1982.

- KRAMM, K.R. & WEST, D.F. Termite pathogens: effects of ingested *Metarhizium*, *Beauveria* and *Gliocladium* conidia on worker termites (*Reticulitermes* sp.). *Journal of Invertebrate Pathology*. New York, **40**: 7-11, 1982.
- KRAMM, K.R.; WEST, D.F.; ROCKENBACH, P.G. Termite pathogens: transfer of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* between *Reticulitermes* sp. termites. *Journal of Invertebrate Pathology*. New York, **40**: 1-6, 1982.
- LAI, P.V.; TAMASHIRO, M.; FUJII, J.K. Pathogenicity of six strains of entomogenous fungi to *Coptotermes formosanus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. New York, **39**: 1-5, 1982.
- LATCH, G.C.M. & FALLON, R.E. Studies on the use of *Metarhizium anisopliae* to control *Oryctes rhinoceros*. *Entomophaga*. Paris, **21**(1): 39-48, 1976.
- LING, A.J. & DONALDSON, M.D. Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. *Journal of Invertebrate Pathology*. New York, **38**: 191-200, 1981.
- LUND, A.E. Microbial control of termites. In: Burges & Hussey (eds.). *Microbial Control of Insects and Mites*. London, Academic Press, 1971. p.385-6.

MARICONI, F.A.M.; CORREIA, L.S.; ANDRADE, M.E.R.; CARVALHO FI
LHO, H.C. Combate ao cupim de monte *Cornitermes cumulans*
(Kollar, 1832) com inseticidas e diferentes métodos. O So
lo. Piracicaba, **63**: 21-31, 1971a.

MARICONI, F.A.M.; BARBIN, D.; MURAI, N.T.; YOSHIKAWA, M.; MACEU
DO, N. Novos resultados de combate químico ao cupim de monu
te *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832). O Biológico, São
Paulo, **37**: 317-22, 1971b.

MARICONI, F.A.M.; FRANCO, J.F.; PULZ, F.S. Combate químico exu
perimental ao cupim de monte *Cornitermes cumulans* (Kollar,
1832). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. Itabuna,
5: 205-8, 1976.

MARICONI, F.A.M.; FRANCO, J.F.; PALMA, V. de; DIONISIO, A.;
TARDIVO, J.C. Combate aos cupinzeiros de *Cornitermes cumu*
lans (Kollar, 1832) com granulados. Anais da Sociedade En
tomológica do Brasil. Itabuna, **6**: 113-16, 1977.

MARICONI, F.A.M.; MOTA, R.; SUGAHARA, C.A.; RAIZER, A.J.; ARA
SHIRO, F.V.; SILVA, J.M. Combate ao "cupim de monte" em
pastagem. Universitário de Agronomia. São Paulo, **1**: 8-9,
1989.

MONTE, O. Os cupins dos campos. O Biológico. São Paulo, **7**:
200-201, 1941.

- NAKANO, O. & PROSPERO, A.O. Efeito comparativo de diversos inseticidas no controle do cupim de montículo *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832). Revista de Agricultura. Piracicaba, **44**: 98-102, 1969.
- NOGUEIRA, S.B.; LIMA, J.O.G.; FREIRE, J.A.H.; CONDE, A.R. Iscas granuladas no controle ao cupim de montículo *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832). Seiva. Viçosa, **31**: 303-8, 1971.
- NOGUEIRA, S.B. Os cupins. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1981. 27p. (Informe Técnico, 114).
- NOIROT, C.H. The nests of termites. In: Krishna & Weesner (ed.). Biology of termites. New York and London, Academic Press, 1970. Vol. 2, Cap. 3, p.73-125.
- OLIVEIRA, D.P. de; CHAVES, G.M.; LOURES, E.G. Estudo comparativo da sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em diferentes tipos de solo. Revista Theobroma. Ilhéus, **11**(4): 233-39, 1981.
- PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; VILA NOVA, N.A.; SILVEIRA NETO, S.; AMARAL, E. Determinação de temperatura e umidade relativa no interior de colônias de insetos sociais para estudos bioecológicos. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. Itabuna, **3**: 20-33, 1974.

PERES FILHO, O.; SALVADORI, J.R.; SANCHES, G.; NAKANO, O.; TE
RAN, F.O. Componentes do material utilizado na construção
do termiteiro do cupim-de-montículo. (Isoptera: Termitidae).
Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília, 25(2): 167-171,
1990.

QUINTELA, E.D. Estabilidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vu
illemin (Hyphomycetes) no solo e sua patogenicidade ao *Chal*
codermus aeneus Boheman (Coleoptera: Curculionidae), praga
do caupi. Piracicaba, 1986. 108p. (Mestrado - Escola Su
perior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

REDFORD, K.H. The termitaria of *Cornitermes cumulans* (Isopte
ra, Termitidae) and their role in determining a potential
keystone species. Biotropica. 16(2): 112-119, 1984.

ROBERTS, D.W. & CAMPBELL, A.S. Stability of entomopathogenic
fungi. Miscellaneous Publications of the Entomological So
ciety of America. College Park, 10(3): 19-76, 1977.

ROBERTS, D.W. & HUMBER, R.A. Entomogenous fungi. In: Cole &
Kendrick (eds.). The biology of conidial fungi. New York,
Academic Press, 1981. Vol. 2, cap. 21, p. 201-236.

ROBERTS, D.W. & YENDOL, W.G. Use of fungi for microbial con
trol of insects. In: Burges, H.D. (ed.). Microbial control
of insects and mites. New York, Academic Press, 1971. p.125-149.

- SANNASI, A. Studies of an insect mycosis. I. Histopathology of the integument of the infected queen of the mound-building termite *Odontotermes obesus*. Journal of Invertebrate Pathology. New York, **13**: 4-10, 1969a.
- SANNASI, A. Studies of an insect mycosis. II. Biochemical changes in the blood of the queen of the mound-building termite *Odontotermes obesus* accompanying fungal infection. Journal of Invertebrate Pathology. New York, **13**: 11-14, 1969b.
- TORALES, G.J. Contribucion al conocimiento de las termitas de Argentina (Pcia. de Corrientes) *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae). Facena. Corrientes, **5**: 97-133, 1982-84.
- VANETTI, F. Combate ao cupim de montículo *Cornitermes cumulans* (Kollar). Revista Ceres. Viçosa, **10**: 437-43, 1959.
- YENDOL, W.G. & PASCHKE, J.D. Pathology of an *Entomophthora* infection in the eastern subterranean termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar). Journal of Invertebrate Pathology. New York, **7**: 414-22, 1965.
- WALSTAD, J.D.; ANDERSON, R.F.; TAMBAUCH, W.J.S. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). Journal of Invertebrate Pathology. New York, **16**: 221-26, 1970.

WOOD, T. The effects of clearing and grazing on the termite fauna (Isoptera) of tropical savannas and woodlands. In: Vaner, J. Progress in soil zoology. Prague, Academia, 1975. p.409-418.