CONTROLE ASSOCIADO DE *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832) (ISOPTERA: TERMITIDAE) COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E O INSETICIDA IMIDACLOPRID

PEDRO MANUEL OLIVEIRA JANEIRO NEVES

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **SÉRGIO BATISTA ALVES**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Entomologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Janeiro - 1998

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Neves, Pedro Manuel Oliveira Janeiro

Controle associado de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) com fungos entomopatogênicos e o inseticida imidacloprid / Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves. - - Piracicaba, 1998.

111 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.
Bibliografia.

1. Controle biológico 2. Cupim 3. Fungo entomopatogênico 4. Inseticida 5.
Pastagem I. Título

CDD 632.736

CONTROLE ASSOCIADO DE *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832) (ISOPTERA: TERMITIDAE) COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E O INSETICIDA IMIDACLOPRID

PEDRO MANUEL OLIVEIRA JANEIRO NEVES

Aprovada em: 04.03. 98

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Sérgio Batista Alves	ESALQ/USP
Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes	ESALQ/USP
Prof. Dr. José Djair Vendramim	ESALQ/USP
Dr. Bonifácio Peixoto Magalhães	CENARGEM/EMBRAPA
Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken	FCA/UNESP

Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES
Orientador

DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Domingues e Maria Gabriela.

À minha esposa Carmen e meus filhos Francisco e Mariana.

Agradecimentos

A Deus, por ter me dado saúde e paz durante a realização deste curso.

Ao professor Dr. Sérgio Batista Alves, pela orientação, apoio e amizade durante o curso de pós-graduação.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela acolhida e apoio.

À Universidade Estadual de Londrina, pela liberação para realizar o curso de pós-graduação.

À CAPES/ PICD, pela concessão de bolsa de estudo durante o curso.

Ao Departamento de Entomologia da ESALQ, pelo apoio e por ter colocado à minha disposição funcionários, equipamentos e instalações.

Aos professores do Departamento de Entomologia da ESALQ, pelos ensinamentos, colaboração e amizade.

À bióloga Solange Aparecida Vieira, Técnica do Laboratório de Patologia de Insetos, pela amizade e auxílio incansável nos trabalhos de laboratório.

Aos colegas Alcides Moino Jr., José Eduardo M. de Almeida, Luiz F. A. Alves, Rogério B. Lopes, Marco A. Tamai e ao aluno de graduação em agronomia Alexandre R. C. Manzini, pelo incentivo, amizade e auxílio na instalação e avaliação dos experimentos de campo.

Ao professor Dr. Elliot W. Kitajima e à técnica Silvania Machado, pelos ensinamentos, apoio e auxílio nos estudos de microscopia eletrônica.

Ao professor Dr. Roberto M. Pereira, pela revisão e correção do “summary”.

À professora Dr. Marineia L. Hadad, pelo auxílio nas análises estatísticas.

A todos os colegas da pós-graduação.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia da ESALQ.

Aos funcionários da Biblioteca da ESALQ em especial à Katia, Eliane, Silvania e Fátima.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se realizasse,

o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Considerações gerais sobre <i>Cornitermes cumulans</i>	4
2.1.1 Aspectos bioecológicos de <i>Cornitermes cumulans</i>	4
2.1.2 Danos de <i>Cornitermes cumulans</i>	5
2.1.3 Controle de <i>Cornitermes cumulans</i>	6
A. Controle químico de <i>Cornitermes cumulans</i>	7
2.2 Controle microbiano de cupins.....	8
2.2.1 Fungos associados.....	8
2.2.2 Fungos entomopatogênicos.....	9
A. Mecanismos de ação dos fungos entomopatogênicos.....	13
B. Utilização da microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.) nos estudos com fungos entomopatogênicos.....	15
2.2.3 Outros entomopatógenos.....	17
2.3. Estudo da inibição da capacidade de limpeza de cupins sob a ação de um estressor.....	18
3 SELEÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> PARA O CONTROLE DE <i>Cornitermes cumulans</i>	20
3.1 Introdução.....	20
3.2 Material e Métodos.....	21
3.2.1 Seleção dos melhores isolados - primeira fase.....	21
A. Bioensaios.....	21
3.2.2 Seleção dos melhores isolados - segunda fase.....	25
A. Bioensaios.....	25
B. Produção de conídios em bandejas.....	25
3.3 Resultados e Discussão.....	26

	Página
3.3.1 Seleção de isolados - primeira fase.....	26
3.3.2 Seleção de isolados - segunda fase.....	37
3.3.3 Testes de produção dos isolados selecionados na segunda fase.....	43
3.4 Conclusões.....	44
4 EFEITO DO IMIDACLOPRID NA INIBIÇÃO DA CAPACIDADE DE LIMPEZA DE <i>Cornitermes cumulans</i> INOCULADOS COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....	45
4.1 Introdução.....	45
4.2 Material e Métodos.....	46
4.2.1 Ciclo de <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> em <i>C. cumulans</i> e comparação de métodos de fixação.....	46
4.2.2 Estudo da inibição da capacidade de limpeza de <i>C. cumulans</i> sob a ação de um estressor.....	47
A. Determinação da concentração subletal.....	47
B. Inibição da capacidade de limpeza de <i>C. cumulans</i>	48
B.1 Inoculação de <i>Metarhizium anisopliae</i> e imidacloprid.....	48
B.2 Inoculação de <i>Beauveria bassiana</i> e imidacloprid.....	49
4.3 Resultados e discussão.....	50
4.3.1 Ciclo de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> em <i>C. cumulans</i> e comparação de métodos de fixação.....	50
A. Ciclo de <i>M. anisopliae</i>	50
B. Ciclo de <i>B. bassiana</i>	55
C. Comparação dos métodos de fixação.....	61
4.3.2 Inibição da capacidade de limpeza de <i>C. cumulans</i> sob a ação de um estressor.....	62
A. Determinação de concentrações subletais de imidacloprid.....	62
B. Inibição da capacidade de limpeza de <i>C. cumulans</i>	66
4.4 Conclusões.....	73

	Página
5 CONTROLE ASSOCIADO DE COLÔNIAS DE <i>Cornitermes cumulans</i> UTILIZANDO <i>Beauveria bassiana</i>, <i>Metarhizium anisopliae</i> E ESTRESSORES.....	75
5.1 Introdução.....	75
5.2 Material e métodos.....	76
5.2.1 Experimentos de controle associado.....	77
5.3 Resultados e discussão.....	81
5.3.1 Experimentos de controle associado.....	81
5.3.2 Comparação de custos dos diferentes produtos utilizados no controle.....	93
5.4 Conclusões.....	94
6 CONCLUSÕES GERAIS.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

CONTROLE ASSOCIADO DE *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832) (ISOPTERA: TERMITIDAE) COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E O INSETICIDA IMIDACLOPRID

Autor: PEDRO MANUEL OLIVEIRA JANEIRO NEVES

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

RESUMO

Esta pesquisa foi realizada com o objetivo de estudar o controle associado de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) com os fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e o inseticida imidacloprid. Na seleção de isolados, de 50 isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* que foram aplicados sobre *Cornitermes cumulans*, foram selecionados os 5 melhores. Na seleção entre estes a maior média de mortalidade confirmada (63,7%) e total (94,6%), ao nono dia, foi do isolado 1037 *M. anisopliae*, seguido do 447 *B. bassiana*, com uma mortalidade confirmada média de 50,5% e total de 93,5%. Com relação à produção de conídios, somente um isolado foi significativamente menos produtivo. Assim, os isolados 1037 e 447 foram escolhidos para os testes posteriores. Em seguida estudou-se o ciclo de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre *C. cumulans*, o mecanismo de limpeza superficial dos cupins e a inibição deste

comportamento pela ação de um estressor. Tanto para *M. anisopliae* como para *B. bassiana* a adesão dos conídios iniciou-se entre 0 e 6 horas, a germinação entre 6 e 12 horas, a penetração entre 12 e 24 horas, a colonização a partir das 24 horas e a extrusão a partir das 72 horas. A única diferença observada foi o início da conidiogênese, que ocorreu a partir das 96 horas para *M. anisopliae* e das 72 horas após a aplicação, para *B. bassiana*. Os operários têm um eficiente mecanismo de limpeza superficial retirando, nas primeiras horas após a aplicação, praticamente todos os conídios da superfície dos soldados e de outros operários. O inseticida imidacloprid, quando utilizado em concentrações subletais, inibiu este comportamento, possibilitando que um maior número de conídios germine e penetre o tegumento dos insetos. Testes de campo, realizados em ninhos grandes, indicaram que, no controle associado utilizando *M. anisopliae*, foi possível diminuir, pela ação sinérgica, a concentração de conídios em até 4 vezes (500 mg) e a de inseticida imidacloprid em até 157 vezes (1,9 mg) em relação às concentrações usualmente recomendadas. Estas concentrações possibilitaram níveis de controle de 100% das colônias grandes com benefícios econômicos e ecológicos.

ASSOCIATED CONTROL OF *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832) (ISOPTERA: TERMITIDAE) WITH ENTOMOPATHOGENIC FUNGI AND THE INSECTICIDE IMIDACLOPRID

Author: PEDRO MANUEL OLIVEIRA JANEIRO NEVES

Adviser: Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

SUMMARY

The objective of this research was to study the associated control of de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) with the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and the insecticide imidacloprid. In the isolate selection, from 50 isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae* applied to *C. cumulans*, only 5 were selected. Among the selected isolates, *M. anisopliae* isolate 1037 had the highest mean confirmed (63.7%) and total mortality (94.6%) nine days after application. This isolate was followed by *B. bassiana* isolate 447, with 50.5% mean confirmed and 93.5% total mortality. Among the selected isolates, only one had significantly lower conidial yield than others. Isolates 1037 and 447 were selected for the subsequent tests. Studies were also conducted on the cycle of

M. anisopliae and *B. bassiana* in *C. cumulans*, the grooming mechanism by the termites, and the inhibition of this behavior by the action of a stressor. For both *M. anisopliae* and *B. bassiana*, conidial adhesion initiated between 0 and 6 hours, fungal germination between 6 and 12 hours, penetration between 12 and 24 hours, colonization after 24 hours, and the fungal emergence from cadavers after 72 hours after application. The initiation of the conidiogenesis was the only difference between the cycle of *M. anisopliae* and *B. bassiana*. The termite workers showed an efficient grooming mechanism which allowed removal, in the first hours after fungal application, of practically all the conidia from the cuticle of soldiers and other workers. The insecticide imidacloprid, when used in sublethal concentrations, inhibited this behavior, and allowed a larger number of conidia to germinate and penetrate the insect cuticle. Field tests conducted against large termite nests demonstrated a synergistic effect between *M. anisopliae* and imidacloprid. When the fungus and the chemical stressor were combined, it was possible to reduce the conidial concentration 4 times (to 500 mg) and the concentration of imidacloprid 157 times (to 1.9 mg) in relation to the concentrations usually recommended per nest for these agents. Using these concentrations, it was possible to obtain 100% control of the large termite colonies with both economic and environmental benefits.

1 INTRODUÇÃO

Os agroecossistemas e ambientes urbanos, ao contrário dos ecossistemas naturais, caracterizam-se pela baixa biodiversidade. Deste modo, os insetos que se adaptam a esses ambientes têm, na maioria das vezes, elevada disponibilidade de alimento e baixos níveis de inimigos naturais e competidores. Assim, atingem facilmente níveis populacionais elevados que causam danos econômicos, assumindo o “status” de praga.

Dentre os insetos que ocorrem como pragas das culturas ou em ambientes urbanos encontram-se os cupins ou térmitas, insetos sociais pertencentes à Ordem Isoptera, que congrega 7 famílias e 14 subfamílias.

O número de espécies de cupins já conhecidas é de aproximadamente 2200, as quais acham-se distribuídas nas regiões quentes e temperadas. No Brasil foram assinaladas 200 espécies, abrangendo mais de 50 gêneros, pertencentes a 4 famílias (Pizano, 1990).

Nos ecossistemas naturais, florestais e agrícolas, os cupins podem atuar como insetos benéficos e danosos, sendo estes últimos mais importantes nos agroecossistemas. Os aspectos benéficos estão relacionados com a ciclagem de nutrientes, como consumidores primários e decompositores (Pizano, 1990; Berti Filho et al., 1993). Também, além de sua importância na aeração do solo, é comum observarem-se sinais de enriquecimento do solo em volta de grandes cupinzeiros (Wardell, 1987). A importância dos cupins como biomassa é ressaltada por diferentes autores. Assim, Bandeira & Torres (1985), citados por Pizano (1990), observaram que em floresta primária da Amazônia Oriental os cupins apresentaram maior biomassa que qualquer outro grupo, concentrando-se principalmente dentro de troncos em decomposição.

Deste modo, os cupins podem ser considerados ecologicamente importantes nos ecossistemas. Entretanto, nas atividades de exploração agrícola ou florestal estes insetos provocam danos nas plantas com reflexos na produtividade das culturas.

Alguns autores atribuem parte do aumento da concentração de metano na atmosfera aos cupins pelo aumento populacional destes insetos com a destruição das florestas tropicais e sua substituição por agroecossistemas (Zimmerman et al., 1982; Rasmussen & Khalil, 1983; Zimmerman & Greenberg, 1983; Khalil & Rasmussen, 1983;

Collins & Wood, 1984; Zimmerman et al., 1984). Entretanto, os autores não chegam a uma conclusão sobre a real participação dos cupins no aumento da concentração de metano.

No Brasil, ocorrem diferentes espécies de cupins em pastagens. Além de *C. cumulans* são citadas *C. ovatus* que ocorre mais na região norte e parte do nordeste, *C. snyderi* que tem sua maior distribuição nos estados de Minas Gerais, Goiás Tocantins e Mato Grosso e *C. bequaerti* que se caracteriza por construir ninhos com aberturas do tipo chaminés ocorrendo no estado do Mato Grosso (Cancello, 1989; Valério, 1995; Fernandes et al. 1997). Além deste gênero, *Syntermes* é também citado como ocorrendo em pastagens onde a porção epígea dos ninhos é mais espalhada (Valério, 1995). Entretanto, o cupim de montículo, *Cornitermes cumulans*, é um dos mais comuns. Esta espécie também provoca danos em diversas culturas, embora esses danos sejam pouco estudados. Seus ninhos diminuem a área útil das pastagens causando dificuldade de se proceder aos tratos culturais mecanizados. Também, a ocorrência de cupins de montículo tem sido associada com uma maior degradação das pastagens (Valério, 1995).

A arquitetura dos ninhos desses cupins possibilitou o desenvolvimento de uma estratégia de controle microbiano com fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Fernandes & Alves, 1991; Fernandes & Alves, 1992b; Alves et al., 1995). Esta baseia-se na elevada quantidade de insetos em um local (ninho) onde a temperatura e a umidade são pouco variáveis e adequadas à ação dos fungos, principalmente quando aplicados em concentrações elevadas de forma inundativa.

Entretanto, os resultados do controle microbiano destes insetos mostram-se bastante variáveis, principalmente para os ninhos grandes, onde a eficiência é reduzida devido à elevada capacidade de limpeza dos operários, através do “lambimento”, e também à dificuldade de distribuição do patógeno dentro do ninho.

Observações de campo onde o inseticida imidacloprid foi utilizado no controle de *Reticulitermes flavipes* mostraram a ocorrência natural de entomopatógenos sobre estes cupins (Zeck, 1992). Este autor constatou que o controle associado, utilizando imidacloprid e *M. anisopliae*, possibilitou a redução das concentrações do patógeno e do

inseticida em relação às utilizadas quando os componentes foram aplicados separadamente. Estudos posteriores constataram que o inseticida imidacloprid, em concentrações subletais, atuando como um estressor, inibia o comportamento de limpeza de *R. flavipes* (Boucias et al., 1996). Assim, a possibilidade de utilização dos patógenos em associação com um estressor para o controle de *C. cumulans* apresenta-se como uma alternativa a ser investigada.

Deste modo, como um processo dinâmico, o desenvolvimento do uso de fungos entomopatogênicos no controle de *C. cumulans* exige aprimoramentos de tecnologia, bem como estudos básicos que possam contribuir para o aumento da eficiência de controle.

Assim, este trabalho teve os seguintes objetivos:

- a - selecionar isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* para o controle de *C. cumulans*.
- b - estudar o processo de infecção, desenvolvimento e reprodução de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em *C. cumulans*.
- c - testar a ação de um estressor no comportamento de limpeza de *C. cumulans*
- d - testar a utilização de um estressor, em formulação com o fungo, de modo a tornar o controle mais eficiente e econômico a nível de campo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre *Cornitermes cumulans*

2.1.1 Aspectos bioecológicos de *Cornitermes cumulans*

O gênero neotropical *Cornitermes* ocorre desde a Costa Rica (9° 56' N) até o Rio Grande do Sul (30° S). As espécies de *Cornitermes* são adaptadas a diferentes condições ambientais que variam das florestas tropicais úmidas às savanas ou cerrados (Araújo, 1970). *Cornitermes cumulans* é, provavelmente, a espécie mais comum e muito adaptada às pastagens, terras cultivadas, cerrados e savanas das regiões centrais e do sul do Brasil, bem como no Paraguai e Argentina. Os ninhos desta espécie podem atingir até 4 m de altura por igual diâmetro na região basal ao nível do solo (Araújo, 1970). Entretanto, a maioria dos ninhos observados, principalmente em pastagens, têm altura de até 1 m. Durante o crescimento e desenvolvimento dos ninhos são reconhecidas três fases: 1 - fase hipógea (totalmente subterrânea) de forma oval, sendo o ninho constituído por uma parede externa e um núcleo central; 2 - fase hipógea com um montículo externo e 3 - fase hipógeo-epígea (sob e sobre o solo) na qual o ninho, atinge seu aspecto definitivo (Grassé, 1958).

Estudando a estrutura e o sistema de aeração dos ninhos, Sanchez et al. (1989) observaram que a parte epígea é constituída por uma camada mais externa de terra, provavelmente cimentada com saliva, originando uma estrutura bastante rígida, seguida por uma região com galerias finas, e pelo núcleo ou região cartonada, de constituição celulósica formada de terra, matéria orgânica e saliva. Esta área central é facilmente quebrada e apresenta-se formada por galerias irregulares com paredes foliadas. Não se observa uma câmara real definida. Todo o interior do ninho é coberto por uma substância escura secretada pelos cupins. Na região hipógea são encontradas as paredes externas, mais finas e com galerias grandes, que circundam a região basal e comunicam-se com o meio externo, provavelmente para que ocorra aeração do ninho. Estes autores observaram ainda vários canais aprofundando-se no solo, a partir da base do cupinzeiro.

Quando se injetou fumaça no ninho, esta saiu pelos canais entre 0,1 e 0,3 m de distância da base. Nas colônias estudadas, a rainha foi encontrada na parte inferior do cupinzeiro.

Os ninhos apresentam condições microclimáticas controladas e de pouca variação. De um modo geral, estas são diferentes do ambiente externo. Com relação aos ninhos de *C. cumulans*, a temperatura no seu interior varia de 21,42°C às 3 h a 19,17°C às 17 h, sendo a média de 20,22°C (Parra et al., 1974). Com relação à umidade relativa, estes autores observaram uma variação de 100% a 98,67% respectivamente para a umidade máxima e mínima, com uma amplitude de 1,33% e uma média de 99,34%. As elevadas umidades relativas estão provavelmente associadas à baixa capacidade de retenção de água pelos insetos, por terem uma cutícula pouco quitinizada. Este aspecto é de extrema importância na estratégia de controle, onde os fungos utilizados requerem condições de elevada umidade para que infectem os insetos e para que ocorra a conidiogênese após a morte dos mesmos.

2.1.2 Danos de *Cornitermes cumulans*

Os danos provocados por estes cupins são pouco estudados, apesar de espécies de *Cornitermes* serem citadas nos levantamentos de pragas em diversas culturas. Em pastagens os principais danos destes insetos estão relacionados com a dificuldade de se proceder aos tratos culturais mecanizados. A maior degradação dos pastos está também associada com uma maior ocorrência de montículos (Valério, 1995). Segundo Canello (1989), *C. cumulans* ataca plantações de cana-de-açúcar, milho, arroz, café, amendoim e eucalipto. Em cana-de-açúcar ataca as plantas em todo o seu ciclo (Araújo, 1977; Novaretti et al., 1988). No laboratório, quando oferecidos diferentes alimentos a *C. cumulans*, os preferidos foram: toletes de cana-de-açúcar, sementes de *Brachiaria* sp., sementes de milho germinadas e secas e folhas de gramíneas secas (Fernandes & Alves, 1992a). Estes autores observaram ainda que esta espécie provocou cerca de 50% de redução no peso de plântulas de milho. Danos de *Cornitermes* sp. foram quantificados em mudas de *Eucalyptus grandis* (Wilcken, 1992). Este autor constatou falhas no

“stand” da ordem de 17,92%. Foi também observado atacando raízes de arroz, apesar da pouca importância (Czepak et al. 1993).

2.1.3 Controle de *Cornitermes cumulans*

No controle desta espécie de cupim podem ser empregados métodos químicos, mecânicos ou biológicos. Os primeiros são os mais utilizados e estudados e serão abordados posteriormente. As técnicas de controle mecânico baseiam-se na destruição dos ninhos e aração do solo. Ávila & Goulart (1992) estudaram a utilização da "broca cupinzeira" acoplada ao diferencial de um perfurador de solo que destrói os ninhos. Estes autores informaram que, baseando-se no critério de presença ou ausência do cupim após a destruição do montículo, a eficiência de controle variou de 37% a 84,6%. Com relação ao rendimento operacional deste método, Ávila & Rumiatto (1995a) observaram a destruição de aproximadamente 107, 113 e 108 montículos/hora/trator em três diferentes áreas. Em outro estudo, constatou-se que foram necessárias várias perfurações num mesmo cupinzeiro além de um indivíduo apoiado sobre a broca para uma completa perfuração do ninho (Valério et al., 1995). O controle foi de 100 e 50% em dois diferentes locais. Um outro método de controle mecânico utilizou um implemento semelhante a uma enxada rotativa, o “demolidor de cupinzeiros” com eficiência de controle variando de 98 a 100% nas avaliações feitas entre os 138 e 148 dias após o tratamento (Ávila & Rumiatto, 1995b).

O controle biológico pode ser feito por diferentes organismos, especializados ou não. Abrangem uma grande variedade de espécies como escorpiões, sapos, aranhas, pássaros, lagartos e insetos, entre eles as formigas, vespas, coleópteros, mantídeos, etc. As formigas são citadas como os mais importantes predadores de cupins (Mill, 1982). Segundo Disney (1986), *Diplonevra mortimeri* e *D. watsoni* (Diptera: Phoridae) foram encontradas parasitando operários em colônia de *Nasutitermitinae*. O controle microbiano é também importante como regulador das populações destes insetos. Entretanto, poucas observações da ocorrência natural destes agentes, causando níveis significativos de mortalidade, têm sido relatadas.

A. Controle químico de *Cornitermes cumulans*

O controle de *C. cumulans* vem sendo feito praticamente pelo uso de inseticidas químicos. Assim, com o advento dos inseticidas organo-sintéticos, principalmente os clorados, passou-se a utilizar produtos como aldrin, dieldrin e endrin, entre outros (Vanetti, 1959; Amante, 1963). Entretanto, os produtos organoclorados foram proibidos, através da Portaria 329 (MARA) de 2 de Setembro de 1985, pelo seu poder acumulativo e difícil degradação no ambiente.

Produtos organofosforados e organocarbamatos foram então testados, em substituição aos organoclorados, para o controle de *C. cumulans*. Entre estes, diazinon e carbaril, que não foram eficientes (Furquim et al. 1968) e etion, metidation, fosalone e arprocarbe controlando respectivamente 55, 85, 55 e 50% das colônias (Mariconi, et al. 1971). Outros inseticidas químicos como fention (1,0 g de i.a./ninho) e abamectin (0,1 g de i.a./ninho) mostraram uma eficiência de controle de 100% e 90%, respectivamente (Biondo et al. 1988). Bons resultados foram obtidos por Mariconi et al. (1989) utilizando fention (1,0 e 1,25 g i.a./ninho) e cloropirifós (1,2; 2,4; 3,6 e 4,2 g i.a./ninho) sendo que, na formulação concentrado emulsionável, todas as concentrações controlaram 100% dos ninhos. O inseticida piretróide deltametrina, na concentração de 1 e 2 g de i.a./ninho, controlou 100% dos cupins quando aplicado na forma líquida (Mariconi et al. 1990). Um outro piretróide, teflutrina, nas concentrações de 220, 110 e 55 ml/cova foi eficiente no controle de *C. cumulans*, prevenindo o ataque a mudas de eucalipto, sendo comparável ao controle propiciado pelo organoclorado aldrin (Wilcken, 1992). Utilizando o ingrediente ativo imidacloprid nas concentrações de 150 e 300 mg/litro/ninho, do produto comercial a 70%, Mariconi et. al. (1994) controlaram 80 e 100% dos ninhos de *C. cumulans*, respectivamente.

Devido à dificuldade de disponibilidade e transporte de água em áreas muito infestadas por ninhos de *C. cumulans*, a utilização de granulados foi também testada no controle deste cupim. Assim, Nogueira et al. (1971) comparando quatro iscas formicidas à base de heptacloro, monocloro, aldrim e dodecacloro, obtiveram níveis de controle de

90% para dodecacloro. Posteriormente, Mariconi et al. (1977) testaram fonofos, granulado a 5% e dodecacloro, isca granulada a 0,45%, aplicando diferentes quantidades do produto comercial por ninho. Os autores constataram mortalidades de 90% para isca granulada (30 a 50 g/ninho) como o melhor resultado. Entretanto, Fernandes (1991) cita que em pastagens no Estado de Goiás estas iscas têm mostrado resultados variáveis. Para o inseticida fipronil, produto granulado a 2%, utilizado na concentração de 10 g por ninho, o controle foi de 100% dos ninhos (Mariconi et. al., 1994).

A fumigação através de fosfina mostrou-se também eficiente no combate dos ninhos, quando se aplicaram 4 pastilhas em cada cupinzeiro (Perez Filho et al. 1987). Com relação à utilização de pastilhas de fosfina, Melo Filho (1996) constatou, em lavouras de cana-de-açúcar em Pernambuco e no Rio Grande do Norte, que o controle de *Nasutitermes* sp. foi mais eficiente quando as aplicações foram feitas na região basal dos ninhos.

2.2 Controle microbiano de cupins

2.2.1 Fungos associados

Os cupins de solo estão em constante associação com uma grande variedade de fungos, como resultado de suas atividades de forrageamento no solo. Vários autores estudaram a diversidade das espécies de fungos que vivem sobre os insetos tentando, em alguns casos, testar a sua patogenicidade. Assim, Smythe & Coppel (1968) reproduziram “in vitro” os fungos que ocorrem externamente na cutícula e testaram a sua patogenicidade em *Reticulitermes flavipes*. Entre os diferentes fungos os autores constataram maior mortalidade quando os insetos foram isolados do que quando foram agrupados, com exceção de *Penicillium*, onde ocorreu o contrário. O hábito de limpeza destes insetos pode explicar a maior mortalidade nos indivíduos isolados. Entretanto, em condições naturais, estes fungos não são patogênicos, provavelmente por entrarem em contato com os insetos em baixas concentrações de conídios, em relação às utilizadas no laboratório e por não estarem os insetos em condições de estresse. Ainda em associação

com *R. flavipes*, Kimbrough & Morales (1972) descreveram e ilustraram *Dimeromyces isopterus*, da ordem Laboulbeniales. Khan & Aldrich (1975) investigaram a infecção de *Reticulitermes* spp. pelo haustório de *Termitaria snyderi*, sugerindo que a ação enzimática, durante a penetração, foi bastante evidente, por não ocorrer distorção da cutícula do inseto, nem contato direto entre o protoplasma das células do inseto e o haustório. Um estudo da ultraestrutura de *Laboulbeniopsis termitarius*, desenvolvido por Blackwell & Kimbrough (1976), revelou que este fungo desenvolve-se sobre a cutícula sem provocar danos detectáveis nos insetos, o que torna difícil determinar qual a sua fonte de nutrientes. Blackwell & Kimbrough (1978) descreveram uma outra espécie de fungo identificado como *Hormiscioideus filamentosus*, infestando externamente cupins de diferentes castas de *Armitermes neotenicus* coletados no Estado do Mato Grosso, no Brasil.

Blackwell (1980) coletou *R. flavipes* em diferentes localidades observando que o fungo *L. termitarius* foi mais comum do que outras 3 espécies isoladas (*T. snyderi*, *Coreomycetopsis oedipus* e *Antennopsis gallica*). Apesar de não se constatar uma relação patogênica, este autor citou que um grande número de indivíduos encontrava-se infestado, sendo que alguns indivíduos tinham mais que 30 talos de *L. termitarius* os quais, provavelmente, limitavam a mobilidade dos insetos, apesar de não haver evidências de sua penetração na cavidade do corpo.

Estudos da histopatologia da cutícula de rainhas de *Odontotermes obesus* inoculadas com *Aspergillus flavus* mostraram que a epicutícula foi levantada e a endocutícula empurrada para baixo na região de penetração do fungo, caracterizando uma ação mecânica (Sannasi, 1969). Este autor observou a formação de melanina nos locais de penetração do fungo, em especial nas regiões intersegmentares.

2.2.2 Fungos entomopatogênicos

A patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* a *Nasutitermes exitiosus* foi estudada por Hanel (1981), com o objetivo de utilizar este fungo no controle biológico do cupim. O autor observou que a mortalidade ocorreu entre o oitavo e o décimo-

primeiro dia após a inoculação, sendo que um conídio foi suficiente para matar um operário de cupim. Posteriormente Hanel (1982a) testou 22 isolados dos fungos *Entomophthora virulenta*, *E. destruens*, *Conidiobolus obscurus* (= *E. thaxteriana*), *M. anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* e *Absidia coerulea* para o controle de *N. exitiosus*. Somente o fungo *M. anisopliae* foi selecionado com base nos seguintes critérios: a - infectividade sobre operários, ninfas e soldados; b - crescimento e esporulação dos fungos nas faixas de temperatura de 25 a 27°C e 30 a 31°C e (c) viabilidade das estruturas infectivas.

Em teste para o controle de *Coptotermes formosanus* Lai et al. (1982) utilizaram *B. bassiana* (1 isolado), *Beauveria* sp. (2 isolados) e *M. anisopliae* (3 isolados), aplicados topicamente sobre operários, e constataram que um isolado de *M. anisopliae* foi o mais patogênico. Neste estudo os autores determinaram o TL₅₀ (tempo letal médio) e a DL₅₀ (dose letal média) para os isolados testados.

Em trabalhos desenvolvidos no Brasil testaram-se, em laboratório, 134 isolados de *B. bassiana*, oito de *B. brongniartii* e dois de *M. anisopliae* para o controle de *Heterotermes tenuis*. O isolado de *B. bassiana* selecionado causou 90 % de mortalidade e boa esporulação sobre os insetos e em diferentes meios de cultura. Selecionou-se uma armadilha de papelão corrugado (Termitrap) para atração dos cupins e inoculação com o patógeno. Também observou-se que o inseticida imidacloprid, quando misturado a conídios puros, pasta de arroz e micélio seco, mostrou-se eficiente para utilização nas iscas de papelão (Almeida, 1994 ; Almeida & Alves, 1996).

Em outro trabalho, o fungo *M. anisopliae*, isolado de *R. flavipes* e multiplicado em meio de cultura, foi aplicado sobre esta espécie de cupim. Os bioensaios mostraram que os indivíduos contaminados pelo fungo podem disseminar a doença entre os cupins sadios, causando elevada mortalidade (Zoberi, 1995). O autor citou que, deste modo, o fungo pode ser utilizado para o controle em iscas contaminadas. Entretanto, em condições naturais, o isolamento e a repelência dos cupins infectados podem diminuir a eficiência do método em relação aos resultados obtidos no laboratório.

O potencial de utilização de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foi avaliado no Quênia

para o controle de *Macrotermes michaelseni* (Gitonga et al., 1996). Alguns isolados de *M. anisopliae* mostraram-se altamente patogênicos, causando mortalidades de 100% nos operários. O isolado de *M. anisopliae* mais virulento mostrou CL_{50} (concentração letal média) e TL_{50} de $1,8 \times 10^4$ conídios/ml e 2,2 dias, respectivamente, e o mais virulento de *B. bassiana* $3,1 \times 10^5$ conídios/ml e 3,2 dias, respectivamente para a CL_{50} e o TL_{50} . Na aplicação de *M. anisopliae* em montículos de *M. michaelseni* os autores observaram mortalidades de 80, 60 e 58%, respectivamente, para as concentrações de 7 g de conídios secos, 10g de fragmentos de micélio em isca de serragem e 20 g de isca de arroz.

No estudo da susceptibilidade de *Coptotermes acinaciformes* e *Nasutitermes exitiosus*, a duas formulações comerciais de *M. anisopliae*, constatou-se mortalidade de 100% dos cupins no quarto dia após a aplicação (Rath & Tidbury, 1996). Ainda neste estudo os esporos não formulados foram altamente repelentes para os cupins sendo esta repelência anulada pela formulação com argila de atapulgita (47%) e surfactante (3%).

Os primeiros estudos para o controle de *C. cumulans* através de fungos foram realizados por Fernandes (1991). Este autor utilizou, para a manutenção dos insetos, recipientes de plástico transparentes de 4,5 cm de diâmetro por 7,0 cm de altura com o fundo forrado com papel de filtro e fragmentos de ninho umedecidos. Na comparação de diferentes métodos de inoculação, a imersão dos fragmentos de ninho, em suspensão do fungo, foi a escolhida. Foram testados cinco isolados de *B. bassiana* e quatro de *M. anisopliae*. Os isolados selecionados foram o 868 de *B. bassiana* e o 865 de *M. anisopliae*. Nos testes de armazenamento, a temperatura de geladeira mostrou-se mais adequada em relação ao ambiente, preservando a viabilidade dos conídios por um tempo maior. Entretanto, *B. bassiana* perdeu a viabilidade mais rapidamente que *M. anisopliae*. Nos trabalhos de campo o autor constatou que a dose de 2 g de conídios de *B. bassiana* por cupinzeiro foi a mais eficiente, com mortalidades de 98% e 100%, respectivamente, aos 30 e 60 dias após a aplicação. Para o isolado de *M. anisopliae*, as mortalidades foram de 80 e 100%, respectivamente aos 30 e 60 dias, para a concentração de 8 g de conídios. Com relação ao melhor equipamento para aplicação do fungo nos ninhos, a polvilhadeira, com a adaptação de uma câmara na mangueira, mostrou-se mais eficiente para *B. bassiana*. Finalmente, o autor concluiu que a concentração de 2 g de conídios/cupinzeiro

de *B. bassiana* ou *M. anisopliae*, aplicados com polvilhadeira manual adaptada, são suficientes para o controle de colônias de *C. cumulans* a campo e que *B. bassiana* foi mais eficiente no inverno e *M. anisopliae* no verão.

Por outro lado, Fernandes & Alves (1991) citaram que, em condições de campo, quando aplicadas 5 g de conídios de dois isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* por cupinzeiro, ocorreu mortalidade de 100% dos ninhos, 10 dias após a aplicação, com esporulação do fungo sobre os insetos. Os ninhos selecionados tinham uma altura externa de 15 a 24 cm e um diâmetro ao nível do solo entre 24 e 46 cm. Os autores atribuíram o sucesso do controle à elevada dose aplicada e às condições favoráveis de temperatura e umidade no interior dos ninhos. Em outro estudo, Fernandes & Alves (1992b) selecionaram, em laboratório, um isolado de *B. bassiana* e três de *M. anisopliae*. Observaram maior virulência e maior mortalidade confirmada dos isolados de *M. anisopliae* em relação aos de *B. bassiana*. Posteriormente, os isolados foram aplicados em ninhos de 25 a 45 cm de diâmetro ao nível do solo, através de uma polvilhadeira manual. A dose foi de 5 g de conídios por ninho, aplicados através de canal central atravessando o centro celulosico. O controle foi de 100, 96, 98 e 100%, respectivamente para os isolados 865, 866, 259 (*M. anisopliae*) e 868 (*B. bassiana*).

Os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram novamente estudados no controle de *C. cumulans* por Alves et al. (1995). Os autores constataram que os ninhos pequenos (30 a 40 cm de diâmetro) tratados com 3 g de conídios puros de *B. bassiana* foram eficientemente controlados com 100% de mortalidade. Já para os ninhos tratados com *M. anisopliae* o controle foi de 98,5%. Num segundo teste, onde foram tratados ninhos grandes (50 a 150 cm de diâmetro) com diferentes misturas de arroz (resultante do processo de produção) e fungo, foi constatada mortalidade que variou de 0 a 100%. Para o tratamento conídios puros, no segundo experimento, o controle foi de apenas 50%. Segundo os autores, esta variação no controle está associada à distribuição dos conídios dentro dos ninhos e às baixas concentrações de conídios em alguns tratamentos. Desse modo, é importante que seja desenvolvida uma tecnologia de aplicação que possa aumentar a eficiência de controle, principalmente para os ninhos grandes.

A. Mecanismos de ação dos fungos entomopatogênicos

Os aspectos relacionados com a penetração, colonização e reprodução dos fungos entomopatogênicos nos cupins são pouco estudados. Entretanto, para os insetos de um modo geral, as fases de desenvolvimento do fungo são: adesão, germinação, penetração, invasão da hemocele, tecidos e órgãos com produção de toxinas, crescimento externo do fungo e produção de esporos ou conídios. O tempo de cada uma destas etapas é variável com a espécie de fungo, com o inseto e com as condições ambientais. Além disso, o tempo necessário para que ocorra a morte do inseto varia com a quantidade de esporos aplicados e com a virulência do isolado. Assim, Alves (1986) observou que, de um modo geral, a morte dos insetos ocorre 4 a 5 dias após a inoculação. Para os cupins, Altson (1947) citou que um fungo, provavelmente *Conidiobulus*, matou 100% dos operários de *Coptotermes curvignathus* em 48 h. Um teste de patogenicidade de *Entomophthora coronata* provocou 97% de mortalidade em *R. flavipes* 84 h após a inoculação (Yendol & Paschke, 1965). Entretanto, estes autores constataram que *E. virulenta* não foi patogênico nas mesmas condições. Observações histológicas mostraram que a penetração não ficou restrita ao tegumento do inseto e que conídios de *E. coronata* foram localizados germinando na parede do esôfago, mas não no mesêntero e no proctodéu. Ainda, segundo este estudo, a penetração deu-se 12 h após a inoculação, com a ocorrência de mortalidade, sendo os corpos gordurosos e a musculatura colonizados inicialmente e o restante dos tecidos destruídos, no mínimo, 32 h após a inoculação. Para o fungo *B. bassiana*, inoculado em *R. flavipes*, entre as 5 e 10 h ocorreu uma tendência dos insetos tornarem-se inativos e agrupados (Bao & Yendol, 1971). Estes autores observaram insetos com tremores, paralisia, falta de coordenação e aumento de defecação após 15 h. A morte ocorreu principalmente entre as 24 e 36 h. A elevada virulência de *B. bassiana*, segundo estes autores, pode estar associada à produção de micotoxinas e às variações no tempo decorrido da inoculação à morte (virulência do isolado), à quantidade de inóculo e às condições do hospedeiro. Ao morrerem, os insetos mudaram a coloração de creme para marrom claro, ficando mumificados dois dias após a morte. Observou-se que os conídios de *B. bassiana* acumularam-se nas regiões

intersegmentares, formando tubo germinativo e penetrando o corpo do inseto, no mínimo 16 h após a inoculação. A penetração ocorreu, inicialmente, na região ventral dos dois segmentos abdominais posteriores. Próximo à morte do inseto, não se observou crescimento intenso do micélio, sugerindo que as micotoxinas têm um papel importante na morte do cupim. Entretanto, após a morte, o fungo espalhou-se rapidamente, destruindo os corpos gordurosos, células sanguíneas, músculos, gânglios, glândulas salivares e tubos de Malphigi, aproximadamente 64 h após a inoculação. Quando a penetração ocorreu na cabeça, o fungo invadiu as antenas, lábio, palpos, maxilas e palpos maxilares. Os conídios observados no intestino perderam a sua integridade. Contudo, em poucos indivíduos, os conídios foram encontrados germinando e penetrando o epitélio. Finalmente, os autores citam que, eventualmente, o micélio do fungo atravessou o tegumento do inseto, envolvendo todo o seu corpo, entre 88 e 96 h após a inoculação.

Ainda estudando o ciclo de *M. anisopliae* em *N. exitiosus*, Hanel (1982b) observou que os conídios penetraram a cutícula do inseto com a formação, não obrigatória, de um ou mais apressórios, sendo o tempo médio necessário para a penetração de 48 h, variando de 18 a 66 h. A penetração ocorre em qualquer lugar do corpo do inseto, formando uma placa ou um corpo hifal entre as camadas da cutícula. Esta seria a base para a invasão da cavidade do corpo, distribuindo para a hemolinfa os corpos hifais, responsáveis pela produção de toxinas que matam os insetos. Insetos recém-mortos mostraram poucos corpos hifais que se concentraram principalmente na cabeça e no tórax. Diferentes tipos de corpos hifais foram identificados, sendo os blastósporos os primeiros a ocorrer e por último, o micélio do fungo. Este autor observou que não ocorreu melanização ou qualquer outra reação de defesa dos insetos. Finalmente, a estratégia do fungo no parasitismo de *N. exitiosus*, após a penetração, pode ser resumida como: (1) distribuição máxima de corpos hifais com o inseto ainda vivo; (2) morte das bactérias do intestino através de toxinas; (3) eliminação do conteúdo intestinal reduzindo a possibilidade de contaminação secundária por bactérias; (4) utilização dos tecidos do hospedeiro para a conidiogênese; (5) no caso de colonização por outro microrganismo (*Mucor* spp.; *Aspergillus* spp.) formação de estágios de resistência.

O efeito da ingestão de conídios de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Gliocladium*

virens em *Reticulitermes* sp. foi estudado por Kramm & West (1982). Estes autores constataram que a penetração de *M. anisopliae* ocorre exclusivamente através do tegumento, cerca de 24 h antes da morte do inseto. Por outro lado, *B. bassiana* invadiu inicialmente o inseto através do trato digestivo aproximadamente 12 h antes da morte do inseto. Os conídios mantiveram-se viáveis após a passagem pelo trato digestivo, o que é um importante aspecto na epizootiologia destes patógenos nas colônias de *Reticulitermes* spp. Um outro aspecto importante na disseminação de doenças está relacionado com a transferência de estruturas infectivas entre insetos contaminados e sadios, conforme observado por Kramm et al. (1982), onde *Reticulitermes* sp. expostos a *M. anisopliae* por 4, 8, 12 e 48 h transferiram os conídios para insetos sadios através do “lambimento”. Por outro lado, os cupins mortos foram evitados pelos sadios.

A observação da transmissão de *M. anisopliae* entre indivíduos de *N. exitiosus*, sadios e contaminados, mostrou que os cupins infectados, tanto ativos como moribundos, são aceitos pelos seus pares e que os conídios que se desenvolvem sobre eles podem transmitir a doença para o restante do grupo (Hanel & Watson, 1983). Os autores observaram que conídios do fungo aplicados nos ninhos e nos locais de alimentação do cupim, iniciaram uma epizootia, mas não eliminaram por completo as colônias tratadas. Provavelmente, este controle parcial esteja associado às concentrações utilizadas e à característica de descontaminação, por diferentes processos, feita pelos cupins.

No estudo da infecção e conidiogênese de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em *Heterotermes tenuis*, Lopes et al. (1996) constataram que, para *B. bassiana*, a germinação dos conídios iniciou-se entre 12 e 24 h após a aplicação, com a formação do tubo germinativo, penetração após 48 h e morte às 72 h. Para *M. anisopliae*, a germinação e penetração ocorreu entre 24 e 48 h. A conidiogênese ocorreu aos 4 e 5 dias, respectivamente, para *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

B. Utilização da microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.) nos estudos com fungos entomopatogênicos

No emprego da M.E.V. para estudos de adesão, penetração e reprodução de

fungos entomopatogênicos têm sido utilizadas diferentes técnicas de preparo do material sendo que na maioria dos estudos os espécimes foram fixados em glutaraldeído com tampão cacodilato 0,2 M a pH 7,3, desidratação em série de etanol, secagem ao ponto crítico com CO₂ e posterior cobertura de ouro. Com esta técnica, Champlin et al. (1981) estudaram a virulência de *B. bassiana* em larvas do besouro, *Curculio caryae* e Lecuona et al. (1991) observaram a infecção de *Ostrinia nubilalis* e *Melolontha melolontha* por *B. bassiana* e *B. brongniartii*, respectivamente. Boucias & Pendland (1982) utilizaram técnica semelhante no estudo da penetração de *Nomuraea rileyi* em *Anticarsia gemmatilis*, acrescentando uma fixação em vapor de OsO₄, bem como Gunnarsson (1988), no estudo da infecção de *Schistocerca gregaria* por *M. anisopliae*. Por outro lado, Hunt et al. (1984), estudando a germinação de *B. bassiana* no tegumento do escolitídeo *Dendroctonus ponderosae*, não utilizaram qualquer técnica de fixação ou desidratação antes da cobertura com ouro para observação ao M.E.V. Bidochka & Khachaturians (1992), após a fixação e desidratação, deixaram os insetos secarem ao ar por 24 h quando estudaram o crescimento de *B. bassiana* nos componentes da cutícula de *Melanoplus sanguinipes*. Contudo, a utilização de fixadores, onde o espécime tem que ser imerso, pode alterar e até deslocar as estruturas do patógeno, levando a observações incorretas. Com o objetivo de evitar a imersão dos insetos e de testar diferentes técnicas de preparo de *Beauveria* sp., Quattlebaum & Carner (1980) concluíram que, entre as diferentes técnicas testadas, a fixação com OsO₄ por 96 h, seguida de secagem ao ar por 3 a 4 dias, foi a que produziu menor distorção nas estruturas de *Beauveria* sp. Esta técnica foi utilizada por Neves et al. (1996) para estudos de infecção de *Eutinobothrus brasiliensis* por *B. bassiana*. Também Lopes et al. (1996) utilizaram a mesma metodologia no estudo da infecção e conidiogênese de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em *Heterotermes tenuis*.

A técnica utilizada na fixação dos insetos e do fungo vai depender do tipo de estudo que se deseja realizar. Para estudos quantitativos onde o objetivo é constatar a presença do patógeno no inseto, como os locais de maior adesão, a capacidade de limpeza após a aplicação e até o ciclo das relações do fungo com o seu hospedeiro, podem ser utilizadas técnicas mais simples e mais rápidas de fixação como em vapor de

OsO₄ por 48 a 96 h seguida por secagem em dessecador por no mínimo 72 h. Deste modo, evita-se também uma possível perda de estruturas causada pela imersão dos insetos em fixadores ou nos líquidos utilizados para a secagem no ponto crítico. Por outro lado, quando o objetivo é documentar as diferentes estruturas do fungo, é primordial que estas estejam preservadas sem deformações. Para alguns grupos de insetos, com a cutícula menos rígida, como os cupins de montículo *C. cumulans*, a fixação mais aprimorada e a secagem em ponto crítico preservam as estruturas do fungo e do inseto de maneira mais adequada possibilitando observações detalhadas.

2.2.3 Outros entomopatógenos

Além dos fungos outros microrganismos podem ser patogênicos para os cupins. Mortalidades de 90% em *R. flavipes*, *R. virginicus*, *R. hespereus* e *Zootermopsis angusticollis* foram constatadas por Smythe & Coppel (1965) quando se aplicou toxina e esporos de *Bacillus thuringiensis*. Um iridovírus de *Scapteriscus borelli* provocou alta mortalidade quando inoculado em *Cryptotermes* (Fowler, 1989). Levin et al. (1993) infectaram *R. flavipes* com entomopoxvírus de *Melanoplus sanguinipes*. Um vírus que causa paralisia, isolado de colônias de *N. exitiosus*, *Coptotermes lacteus* e *Porotermes adamsoni* foi citado como o único de ocorrência natural relatado em cupins (Hall, 1994). Com relação aos nematóides, Laumond et al. (1979) observaram mortalidade de 100% em *Nasutitermes exitiosus* inoculados com *Steinernema carpocapsae*. A infecção de *Glyptotermes dilatatus* por *Heterorhabditis* sp., aplicado no campo na concentração de 4000 a 8000 larvas/ml provocaram o completo controle desta importante praga de chá no Sri Lanka (Dantharanavana & Vitarana, 1987). Um nematóide Rhabditidae, isolado originalmente de cupins, foi patogênico a *R. flavipes*, *R. virginicus* e *C. formosanus* mostrando potencial como um agente supressor de cupins (Coppel & Liang 1987). A raça “Breton” de *Steinernema feltiae* foi testada em laboratório e campo no controle do cupim subterrâneo *Reticulitermes tibialis* (Epsky & Capinera, 1988). Os autores concluíram que foi necessária uma elevada dose de nematóides para causar a morte das operárias (DL₅₀ 1,5 x 10⁷ nematóides/cupim). Utilizando *S. feltiae*, *Steinernema bibionis*

e *Heterorhabditis heliothidis*, no controle de *R. flavipes*, Mauldin & Beal (1989) observaram que após 9,5 semanas não ocorreu diferença significativa nas taxas de sobrevivência dos cupins tratados e não tratados, no laboratório. A campo os nematóides também não eliminaram ou controlaram os cupins. Uma nova espécie de nematóide, identificada como *Neosteinerema longicurvicauda*, foi isolada de *R. flavipes* (Nguyen & Smart Jr., 1994). O nematóide *Steinernema carpocapsae* foi testado visando o controle de *H. temuis* obtendo-se para a dosagem de 2000 nem./ml, TL_{50} de 1,6 dias e DL_{50} de 645,00 (Faggin & Alves, 1996).

2.3 Estudo da inibição da capacidade de limpeza de cupins sob a ação de um estressor

Nos insetos sociais o comportamento de limpeza é extremamente importante, servindo para manter os indivíduos livres de patógenos ou parasitos, evitando epizootias nas colônias. Quando as colônias ocorrem em ambientes altamente contaminados como o solo, este comportamento é essencial para o seu estabelecimento e manutenção. Os cupins e as formigas que vivem no solo evoluíram no sentido de selecionar comportamentos bastante eficientes de limpeza, minimizando a ação dos entomopatógenos que, no caso dos fungos, agem principalmente por contato, necessitando permanecer sobre a cutícula dos insetos por determinado período até que ocorra a penetração. No caso do controle microbiano utilizando fungos, a exposição dos conídios possibilita que estes sejam retirados do hospedeiro, diminuindo as chances de infecção e consequentemente a eficiência de controle. Assim, somente elevadas concentrações do patógeno podem causar reduções significativas nas populações de campo, tornando o controle economicamente inviável.

Deste modo, a utilização de alguma substância que atue como um estressor tendo uma ação sinérgica com o patógeno (fungo), mesmo que de forma indireta, agindo no comportamento da colônia, pode tornar a utilização de um patógeno eficiente e economicamente competitiva em condições de campo.

O inseticida imidacloprid, do grupo das nitroguanidinas, atua no sistema nervoso

dos insetos, ligando-se aos receptores nicotínicos da acetilcolina nas sinapses das células nervosas (Abbink, 1991). Ensaio conduzidos com este inseticida têm mostrado uma ocorrência espontânea de patógenos, especialmente nos insetos de solo como os cupins. Assim, em avaliações de laboratório onde se aplicou imidacloprid no solo e em iscas, ocorreu um sinergismo com entomopatógenos matando rapidamente operários de *Reticulitermes flavipes* (Zeck, 1992). Este autor observou que a utilização de *M. anisopliae* em associação com imidacloprid possibilitou o emprego de concentrações de conídios e de imidacloprid bastante inferiores às utilizadas quando cada componente foi empregado sozinho, com resultados de eficiência de controle semelhantes. Observou ainda que o imidacloprid atua como um estressor para os cupins em concentrações subletais, afetando os seus mecanismos de defesa, de modo que os entomopatógenos presentes de forma endêmica no habitat, possam colonizar e matar os insetos. Posteriormente, Boucias et al. (1996) estudaram os efeitos de imidacloprid em *R. flavipes* e suas interações com *B. bassiana*, concluindo que o mecanismo de defesa deste inseto é basicamente realizado pelo comportamento de limpeza entre os indivíduos, trofalaxia e pelo instinto de construção de galerias no solo que o protege da ação dos patógenos. Observaram ainda que a aplicação de concentrações subletais de imidacloprid não provocaram alterações na cutícula nem no sistema imunológico dos insetos e sim no seu comportamento de limpeza diminuindo a capacidade de lambimento (grooming) entre os indivíduos possibilitando que um maior número de conídios germine e penetre nos insetos causando a sua morte rapidamente. Os autores mencionaram que o inseticida não influenciou a germinação e o crescimento vegetativo de *B. bassiana*. A compatibilidade de imidacloprid com *M. anisopliae* e *B. bassiana* foi também constatada com relação ao crescimento vegetativo e produção de conídios (A. Moino Jr., comunicação pessoal). Deste modo, o sinergismo obtido na utilização de fungo e imidacloprid está associado a uma alteração no comportamento de limpeza superficial dos indivíduos.

3 SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* PARA O CONTROLE DE *Cornitermes cumulans*

3.1 Introdução

A escolha de isolados em programas de controle microbiano é de extrema importância, por possibilitar a determinação daqueles que apresentam as melhores características com relação à virulência, produção, susceptibilidade à radiação ultra violeta, entre outras. Com estes parâmetros pode-se produzir e utilizar o patógeno de forma mais eficiente e competitiva.

Nos estudos de seleção de isolados de fungos entomopatogênicos, várias metodologias têm sido adotadas, levando em consideração a biologia e o comportamento dos insetos hospedeiros. Para os cupins, por serem insetos sociais, os bioensaios têm características próprias. Os métodos de inoculação são basicamente por caminhamento sobre as estruturas infectivas do patógeno (Yendol & Paschke, 1965; Bao & Yendol, 1971; Yendol & Rosario, 1972; Kramm et al., 1982; Kramm & West, 1982), polvilhamento (Yendol & Rosario, 1972), pulverização (Hanel, 1981; Hanel & Watson, 1983; Almeida, 1994; Rath & Tidbury, 1996) e aplicação tópica (Lai et al., 1982) dos propágulos infectivos.

Na inoculação de *Beauveria bassiana* em *Cornitermes cumulans*, Fernandes (1991) comparou três métodos. No primeiro, os insetos foram imersos, por 1 segundo, em suspensão fúngica. No segundo, um círculo de papel de filtro foi umedecido com 0,5 ml de suspensão de conídios, onde os insetos foram colocados para caminhar. No terceiro, fragmentos de ninho foram imersos em suspensão de conídios, secos sobre papel de filtro e, em seguida, colocados nos recipientes, onde foram liberados os cupins. O autor observou que o método de inoculação por caminhamento nos fragmentos de ninho foi o mais eficiente, sendo adotado nos bioensaios.

Os recipientes utilizados nos bioensaios são importantes pois devem reproduzir as condições mais adequadas para os insetos, principalmente com relação à umidade, temperatura e fotoperíodo. Assim, Fernandes (1991) testou recipientes contendo

diferentes substratos para a manutenção de *C. cumulans*, na condução dos bioensaios. Selecionaram-se os recipientes de plástico transparentes de 4,5 cm de diâmetro por 7,0 cm de altura com o fundo forrado com papel de filtro e com os fragmentos de ninho umedecidos.

Um outro fator relevante na seleção de isolados é que estes apresentem elevadas produções de conídios, que possibilitem a sua utilização a custos competitivos. Entretanto, nem todos os estudos de seleção consideram este aspecto.

O objetivo deste trabalho foi o de selecionar isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* para controle de colônias de *C. cumulans* a campo considerando-se a sua virulência e produção de conídios em meio de arroz.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Seleção dos melhores isolados - primeira fase

A. Bioensaios

Os isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* utilizados nos bioensaios, hospedeiros e locais de coleta encontram-se na Tabela 3.1. Todos os isolados estão armazenados no banco de patógenos do Laboratório de Patologia dos Insetos do Departamento de Entomologia, ESALQ/USP.

Para a realização dos bioensaios os conídios foram produzidos em placas de Petri contendo meio completo (MC) com a seguinte constituição:

fosfato de potássio	0,36g
fosfato de sódio	1,05g
sulfato de magnésio	0,6g
cloreto de potássio	1g
glucose	10g
nitrato de sódio	1,58g
extrato de levedura	5g

ágar 20g
 H₂O destilada (q.s.p.) 1000ml

Tabela 3.1 - Isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, utilizados nos bioensaios com *Cornitermes cumulans*.

ISOLADOS	FUNGO	HOSPEDEIRO	LOCAL
412	<i>M. anisopliae</i>	<i>Epilampra</i> sp. (Blattodea)	Iguape - SP
476	<i>B. bassiana</i>	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Piracicaba - SP
447	<i>B. bassiana</i>	<i>Solenopsis invicta</i>	Cuiabá - MT
494	<i>B. bassiana</i>	<i>Dorcadocerus barbatus</i>	Piracicaba - SP
498	<i>B. bassiana</i>	<i>Cycloneda sanguinea</i>	S. Mig. Tucuman - Arg.
499	<i>B. bassiana</i>	<i>Diabrotica speciosa</i>	Blanco Pouso- Argentina
512	<i>B. bassiana</i>	<i>Solenopsis invicta</i>	Cuiabá - MT
520	<i>B. bassiana</i>	<i>Solenopsis invicta</i>	Cuiabá - MT
521	<i>B. bassiana</i>	<i>Solenopsis invicta</i>	Cuiabá - MT
522	<i>B. bassiana</i>	<i>Solenopsis invicta</i>	Cuiabá - MT
523	<i>B. bassiana</i>	<i>Solenopsis invicta</i>	Cuiabá - MT
524	<i>B. bassiana</i>	<i>Solenopsis invicta</i>	Cuiabá - MT
526	<i>B. bassiana</i>	<i>Solenopsis invicta</i>	Cuiabá - MT
529	<i>B. bassiana</i>	<i>Solenopsis invicta</i>	Cuiabá - MT
531	<i>B. bassiana</i>	<i>Solenopsis invicta</i>	Cuiabá - MT
532	<i>B. bassiana</i>	<i>Solenopsis</i> sp.	Cuiabá - MT
548	<i>B. bassiana</i>	<i>Solenopsis</i> sp.	Cuiabá - MT
551	<i>B. bassiana</i>	<i>Solenopsis</i> sp.	Cuiabá - MT
584	<i>B. bassiana</i>	<i>Solenopsis invicta</i>	Cuiabá - MT
750	<i>B. bassiana</i>	<i>Solenopsis</i> sp.	Sul do Brasil
756	<i>B. bassiana</i>	<i>Solenopsis</i> sp.	Sul do Brasil
760	<i>B. bassiana</i>	<i>Cornitermes cumulans</i>	Piracicaba - SP
816	<i>M. anisopliae</i>	Solo	Piracicaba - SP

Tabela 3.1 - (cont.) Isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, utilizados nos bioensaios com *Cornitermes cumulans*.

ISOLADOS	FUNGO	HOSPEDEIRO	LOCAL
818	<i>M. anisopliae</i>	Solo	Piracicaba - SP
860	<i>M. anisopliae</i>	<i>Macropis zincta</i>	Piracicaba - SP
866	<i>M. anisopliae</i>	<i>Atta</i> sp.	Goiânia - GO
900	<i>B. bassiana</i>	<i>Solenopsis</i> sp.	RS
935	<i>M. anisopliae</i>	<i>Diatraea saccharalis</i>	Itabuna - BA
987	<i>B. bassiana</i>	<i>Heterotermes</i> sp.	Rio das Pedras - SP
988	<i>B. bassiana</i>	<i>Nasutitermes</i> sp.	Piracicaba - SP
1022	<i>M. anisopliae</i>	Tiphiidae (Hymenoptera)	Piracicaba - SP
1037	<i>M. anisopliae</i>	<i>Solenopsis</i> sp.	Porto Alegre - RS
1076	<i>M. anisopliae</i>	Solo	Arapongas - PR
1079	<i>B. bassiana</i>	Solo	Arapongas - PR
1097	<i>M. anisopliae</i>	Solo	Lavras - MG
1104	<i>M. anisopliae</i>	Solo	S. João do Piauí - PI
1113	<i>M. anisopliae</i>	<i>Colaspis</i> sp.	Piracicaba - SP
1116	<i>M. anisopliae</i>	Scarabaeidae	Piracicaba - SP
1172	<i>M. anisopliae</i>	Solo	Córrego Rico - SP
1175	<i>M. anisopliae</i>	Solo	Córrego Rico - SP
1184	<i>M. anisopliae</i>	Solo	Corumbá - MS
1189	<i>M. anisopliae</i>	Solo	Corumbá - MS
CB47	<i>M. anisopliae</i>	Indeterminado	Campinas - SP
E6	<i>M. anisopliae</i>	<i>Diatraea saccharalis</i>	PE
E9	<i>M. anisopliae</i>	<i>Deois flavopicta</i>	Vitória -ES
PL 43	<i>M. anisopliae</i>	<i>Mahanarva posticata</i>	Fleixeiras - AL
PL 47	<i>M. anisopliae</i>	<i>Mahanarva posticata</i>	Campos - RJ
PL 63	<i>B. bassiana</i>	Içá de <i>Atta</i> sp.	Piracicaba - SP
RJC	<i>M. anisopliae</i>	Indeterminado	Indeterminado
RJD	<i>M. anisopliae</i>	Indeterminado	Indeterminado

Em cada bioensaio utilizaram-se de 8 a 12 isolados mais uma testemunha. Foram testados no total 50 isolados. Os insetos foram coletados em colônias (ninhos), separados em placas de Petri (120 indivíduos/placa) e pulverizados com 0,5 ml de uma suspensão de 1×10^8 conídios/ml em água estéril mais Tween 80 (1 ml/l). Nas pulverizações, feitas dentro da câmara de fluxo laminar, utilizou-se um pulverizador Airbrusch “PAASCHE” com pressão de 15 libras/pol². Para as quantificações utilizou-se câmara de Neubauer. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento (isolado) e 20 insetos, operários (pelo menos um soldado) de *C. cumulans* por repetição (total de 100 insetos/tratamento). A testemunha foi pulverizada com água estéril mais espalhante. Após a pulverização, os insetos foram transferidos para recipientes plásticos (20 por recipiente), translúcidos, de 4,5 cm de diâmetro por 6 cm de altura, contendo um pedaço da parte cartonada do ninho e uma tira de papel de filtro, presa à tampa, umedecida diariamente para manter a umidade próxima à saturação. Após a inoculação, os recipientes foram colocados numa bandeja, cobertos com um saco plástico preto, e transferidos para estufa incubadora (B.O.D.) à temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

A avaliação foi feita diariamente, do 2º ao 7º dia após a inoculação, anotando-se a mortalidade em cada repetição, sendo os insetos mortos lavados em álcool 70% por 30 segundos e água destilada por igual período, para descontaminação superficial. Em seguida foram transferidos para câmara úmida para confirmação da morte provocada pelo patógeno. Em todos os bioensaios foram repostos os insetos que morreram no 1º dia, eliminando a mortalidade provocada pelo manuseio durante a instalação do experimento.

Para a seleção dos melhores isolados (primeira fase) considerou-se a mortalidade confirmada no 3º, 4º e 5º dias. Foram selecionados os isolados que mostraram mortalidade confirmada e acumulada superior a 50%, até o 5º dia após a inoculação.

A mortalidade total representa o número de indivíduos mortos independente da causa. A mortalidade confirmada representa o número de insetos onde o fungo esporulou e a mortalidade corrigida foi calculada subtraindo-se da mortalidade total a mortalidade na testemunha.

3.2.2 Seleção dos melhores isolados - segunda fase

Na segunda fase de seleção dos melhores isolados foram feitos bioensaios e testes de produção.

A. Bioensaios

Utilizando a mesma metodologia descrita no item 3.2.1.A realizaram-se dois bioensaios para comparar a virulência dos isolados selecionados. Os critérios de seleção foram baseados na mortalidade confirmada acumulada do 2º ao 9º dia após a aplicação. Com os dados obtidos procedeu-se à análise da variância e à comparação das médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

B. Produção de conídios em bandejas

Com os isolados selecionados foi realizado um teste de produção de conídios em bandejas, utilizando a metodologia proposta por Alves (1986) e Alves & Pereira (1989). O meio utilizado foi arroz pré-cozido, acondicionado em sacos plásticos de polipropileno e esterilizado em autoclave. Posteriormente, foram inoculados 5 ml de uma suspensão de conídios com a concentração de 5×10^8 conídios/ml inoculados em 200g de arroz/saco. Após a inoculação os sacos foram mantidos em estufa incubadora (B.O.D.), à temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 h, por aproximadamente 4 dias, possibilitando o desenvolvimento micelial do fungo. Para a produção de conídios, o arroz miceliado foi distribuído em bandejas plásticas, uma para cada saco, colocadas umas sobre as outras em sala asséptica à temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 5\%$ e fotofase de 24 h. Decorridos aproximadamente 3 a 4 dias, cruzaram-se as bandejas para favorecer a conidiogênese e a secagem dos conídios. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições, um saco com 200 gramas de arroz por repetição, para cada

um dos tratamentos (isolados). Após a plena esporulação do fungo, procedeu-se à avaliação da produção. Retirou-se de cada bandeja (repetição) uma grama de arroz mais fungo, de local de plena esporulação, adicionando-se 20 ml de água estéril mais espalhante. Nas quantificações foram feitas duas contagens por repetição, utilizando-se a câmara de Neubauer. Os dados obtidos foram transformados em $\log (x + 0,5)$ procedendo-se a análise da variância e à comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Com os resultados de virulência e produção de conídios em bandejas foi escolhido o melhor isolado para utilização nos testes de campo.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Seleção de isolados - primeira fase

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit. Entretanto, não se adequaram ao modelo, por ter ocorrido, para a grande maioria dos isolados, um χ^2 altamente significativo e elevada heterogeneidade. Assim, optou-se pela análise gráfica utilizando-se a mortalidade confirmada.

Para a mortalidade total acumulada, de todos os isolados, 24 (48%) apresentaram níveis de mortalidade superiores a 90%, até ao quinto dia após a aplicação (Figura 3.1 e 3.2). Por outro lado, para a mortalidade confirmada acumulada, no quinto dia, observou-se que 38 isolados (76%) provocaram mortalidades na faixa de 0 a 30% e somente 5 isolados (10%) causaram mortalidades acima de 50% (Figura 3.1).

A utilização da mortalidade confirmada como parâmetro para a seleção dos melhores isolados foi determinada em função de: mortalidade total igual ou superior a 90%, no quinto dia para 23 dos isolados, impossibilitando a diferenciação dos mesmos; não ocorrência de mortalidade confirmada na testemunha dos bioensaios; após o quinto dia, mortalidade confirmada relativamente baixa e média da mortalidade na testemunha superior a 15%.

Figura 3.1. Frequência da distribuição dos isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em relação à mortalidade total e confirmada de *Cornitermes cumulans*, no quinto dia após a inoculação, na primeira fase da seleção.

A mortalidade total representa o somatório da mortalidade causada diretamente (mortalidade confirmada) e indiretamente pelo patógeno, além da mortalidade causada por outros fatores como o estresse e manuseio. Considerando que nos insetos mortos, onde o fungo não esporulou, ocorreu uma septicemia pelo seu aspecto de podridão, várias hipóteses podem ser consideradas para explicar esta mortalidade não confirmada ou indireta como: o fungo possibilita a entrada de outros microrganismos, como bactérias, através dos orifícios feitos na cutícula, quando de sua penetração; quando ingeridos, os conídios provocam o rompimento do epitélio intestinal, pela germinação/penetração ou pela liberação de toxinas que desestruturam a parede intestinal, possibilitando a contaminação da hemolinfa por bactérias. Esta contaminação da hemolinfa, principalmente pelos orifícios na cutícula, está intimamente relacionada com a contaminação externa dos cupins que por sua vez pode ser maior quando estes são manipulados na instalação dos bioensaios. Assim, a mortalidade indireta pode ser causada por diferentes fatores, que podem ou não ocorrer, tornando-a bastante variável. Por outro lado, a mortalidade direta ou confirmada representa o número de insetos nos quais

o fungo esporulou evidenciando a capacidade do isolado completar todo o seu ciclo dentro do hospedeiro.

As médias das porcentagens de mortalidade total acumulada na testemunha para os 6 bioensaios da primeira etapa foram de 4,43; 7,88; 11,07; 14,7; 16,57 e 19,55% respectivamente para os 2, 3, 4, 5, 6, e 7 dias após a aplicação. Estes níveis de mortalidade são considerados normais para *Cornitermes cumulans* por ser o inseto bastante frágil e de comportamento social, dificultando a sua manutenção em condições de bioensaio.

A mortalidade confirmada representa a capacidade de colonização do patógeno superando todos os agentes microbianos competidores presentes no inseto. Assim, a mortalidade confirmada, além de revelar a real capacidade antagônica do fungo mostra o nível de conidiogênese do isolado, o que é um fator determinante na disseminação do patógeno não só dentro do ninho como no ambiente.

Os resultados referentes à mortalidade confirmada, no 3º, 4º e 5º dias após a inoculação estão representados graficamente nas Figuras 3.3 (isolados de *B. bassiana*) e 3.4 (isolados de *M. anisopliae*). Na Tabela 3.2 encontram-se os dados de mortalidade total, corrigida e confirmada no 3º, 4º e 5º dia para todos os isolados.

O critério utilizado para a seleção dos melhores isolados foi a mortalidade confirmada igual ou superior a 50% até o 5º dia após a inoculação. A mortalidade até o 5º dia foi utilizada por ressaltar as diferenças na competitividade durante a colonização do cadáver em relação aos outros microrganismos presentes.

Dessa forma, apesar de terem causado mortalidade total acima de 80% após o terceiro dia, os isolados PL43, 816, 1175 de *M. anisopliae* e 522 de *B. bassiana* não foram selecionados pela impossibilidade de determinar os mecanismos envolvidos, no processo de mortalidade provocada por estes isolados, optou-se pela não seleção dos mesmos, reconhecendo-se o seu grande potencial para trabalhos futuros de controle microbiano de *C. cumulans*.

Os isolados que causaram mortalidades confirmadas iguais ou superiores a 50% até o 5º dia foram, para o fungo *B. bassiana* 447 (63,4%) e 760 (74,8%) e para *M.*

anisopliae 1037 (55,7%), 1097 (75%) e E9 (84,4) (Tabela 3.3). Estes isolados foram selecionados para a próxima etapa do estudo, visando a escolha dos melhores isolados.

Figura 3.2 - Mortalidade total acumulada (%) de *Cornitermes cumulans* aos 3, 4 e 5 dias após a inoculação com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

Figura 3.3 - Mortalidade confirmada acumulada (%) de *Cornitermes cumulans* aos 3, 4 e 5 dias após a inoculação com os isolados de *Beauveria bassiana*.

Tabela 3.2 - Mortalidade (acumulada) (%), total, corrigida e confirmada, de *Cornitermes cumulans* aos 3, 4 e 5 dias após a inoculação com diferentes isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

Isolado	Mortalidade (%)								
	Terceiro dia			Quarto dia			Quinto dia		
	Total	Corr.	Confir.	Total	Corr.	Confir.	Total	Corr.	Confir.
412	27,7	20,3	0,0	44,7	32,4	0,0	57,4	33,9	0,0
447	50,5	42,3	31,7	78,2	69,0	55,4	86,1	75,9	63,4
476	42,6	39,4	0,0	62,4	57,0	0,0	81,2	75,8	0,0
494	32,7	29,5	0,0	72,4	67,0	8,2	86,7	81,3	8,2
498	39,0	35,8	0,0	59,0	53,6	4,0	76,0	70,6	8,0
499	37,0	33,8	0,0	56,0	50,6	6,0	83,5	67,6	13,0
512	29,1	25,9	0,0	65,0	59,6	3,9	83,5	78,1	5,8
520	12,1	12,1	1,9	40,2	40,2	15,9	68,2	68,2	18,7
521	16,4	16,4	5,5	54,5	54,5	19,1	75,5	75,5	33,6
522	88,1	83,4	0,0	99,0	90,8	6,9	100,0	84,7	6,9
523	24,0	24,0	0,0	70,2	70,2	30,8	95,2	95,2	30,8
524	23,0	23,0	0,0	54,0	54,0	0,0	73,0	73,0	14,0
526	22,4	22,4	0,0	38,3	38,3	0,0	62,6	62,6	19,6
529	22,3	22,3	0,0	56,3	56,3	1,9	92,2	92,2	28,2
531	10,7	10,7	0,0	38,8	38,8	0,0	61,2	61,2	13,6
532	10,9	10,9	2,0	41,6	41,6	11,9	67,3	67,3	33,7
548	71,3	66,6	0,0	91,1	82,9	3,0	99,0	83,7	4,0
551	46,9	42,2	0,0	74,0	65,8	7,3	85,4	70,1	7,3
584	51,0	47,8	0,0	82,0	76,6	17,0	97,0	91,6	24,0
750	39,4	36,2	0,0	63,5	58,1	1,9	80,8	75,4	1,9
756	32,4	24,2	5,7	57,1	47,9	18,1	79,0	68,8	33,3
760	48,5	40,3	35,0	75,7	66,5	60,2	91,3	81,1	74,8
816	93,0	85,6	23,0	99,0	86,7	29,0	99,0	75,5	29,0
818	58,0	50,6	0,0	78,0	65,7	0,0	86,0	62,5	0,0
860	74,8	51,0	7,8	97,1	65,8	16,5	100,0	66,2	18,4
866	67,3	43,5	3,8	89,4	58,1	16,3	99,0	65,2	22,1

Tabela 3.2 - (cont.) Mortalidade (acumulada) (%), total, corrigida e confirmada, de *Cornitermes cumulans* aos 3, 4 e 5 dias após a inoculação com diferentes isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

Isolado	Mortalidade (%)								
	Terceiro dia			Quarto dia			Quinto dia		
	Total	Corr.	Confir.	Total	Corr.	Confir.	Total	Corr.	Confir.
900	31,3	23,1	0,0	53,1	43,9	12,5	77,1	66,9	24,0
935	59,4	54,7	0,0	77,1	68,9	0,0	88,5	73,2	0,0
987	36,7	28,5	0,0	69,4	60,2	0,0	85,7	75,5	3,1
988	26,4	23,2	0,0	56,6	51,2	6,6	76,4	71,0	11,3
1022	77,6	72,9	0,0	88,8	80,6	7,1	90,8	75,5	9,2
1037	80,2	56,4	39,6	97,2	65,9	53,8	99,0	65,3	55,7
1076	76,5	68,3	0,0	97,6	88,4	0,0	100,0	89,8	0,0
1079	63,6	56,2	14,0	86,0	73,7	27,1	97,2	73,7	36,4
1097	49,0	40,8	34,0	82,0	72,8	64,0	94,0	83,8	75,0
1104	80,4	75,7	0,0	94,8	86,6	8,2	96,9	81,6	9,3
1113	12,0	4,6	0,0	19,3	7,0	0,0	36,1	12,6	0,0
1116	30,9	26,2	0,0	40,2	32,0	0,0	52,6	37,3	0,0
1172	64,0	40,2	7,0	91,0	59,7	15,0	98,0	64,2	20,0
1175	99,0	91,6	19,6	100	87,7	20,6	100,0	76,5	20,6
1184	23,1	23,1	14,4	72,1	72,1	29,8	94,2	94,2	48,1
1189	59,0	35,2	0,0	79,0	47,7	3,0	91,0	57,2	11,0
CB47	17,7	17,7	0,0	43,8	43,8	0,0	71,9	71,9	22,9
E6	59,6	35,8	0,0	81,8	50,5	1,0	90,9	57,1	1,0
E9	53,1	44,9	43,8	81,3	72,1	69,8	96,9	86,7	84,4
PL 43	87,2	79,8	30,9	95,7	83,4	38,3	97,9	74,4	40,4
PL 47	62,1	38,3	0,0	92,2	60,9	7,8	100,0	66,2	11,7
PL 63	18,6	15,4	0,0	34,0	28,6	0,0	55,7	50,3	4,1
RJC	47,6	23,8	0,0	74,8	43,5	6,8	89,3	55,5	18,4
RJD	61,4	37,6	11,9	91,1	59,8	20,8	94,0	60,3	22,8
Média	46,95	39,08	6,63	70,73	59,78	14,51	84,57	70,48	20,83

Tabela 3.3 - Mortalidade (acumulada) (%), total, corrigida e confirmada, de *Cornitermes cumulans* aos 3, 4 e 5 dias após a inoculação com os melhores isolados de *Beauveria bassiana* (447 e 760) e *Metarhizium anisopliae* (E9, 1097 e 1037).

Isolado	Mortalidade (%)								
	Terceiro dia			Quarto dia			Quinto dia		
	Total	Corr.	Confir.	Total	Corr.	Confir.	Total	Corr.	Confir.
447	50,5	42,3	31,7	78,2	69,0	55,4	86,1	75,9	63,4
760	48,5	40,3	35,0	75,7	66,5	60,2	91,3	81,1	74,8
E9	53,1	44,9	43,8	81,3	72,1	69,8	96,9	86,7	84,4
1097	49,0	40,8	34,0	82,0	72,8	64,0	94,0	83,8	75,0
1037	80,2	56,4	39,6	97,2	65,9	53,8	99,0	65,3	55,7

Figura 3.4 - Mortalidade confirmada acumulada (%) de *Cornitermes cumulans* aos 3, 4 e 5 dias após a inoculação com os isolados de *Metarhizium anisopliae*.

Comparando os dados de virulência de todos os isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* observou-se que *M. anisopliae* foi, na média, sempre superior a *B. bassiana* (Tabela 3.4 e Figura 3.5). As diferenças médias da porcentagem de mortalidade confirmada e total entre os dois fungos foram mais acentuadas no 3º dia após a inoculação, apesar de não ter ocorrido diferença significativa para a mortalidade confirmada. Para a mortalidade total, esta foi significativamente superior para o 3º e 4º dias não mostrando diferença significativa para o 5º dia (Tabela 3.4).

Observa-se uma tendência de maior virulência de *M. anisopliae* em relação a *B. bassiana* no controle de *C. cumulans* manifestada pelos níveis de mortalidade nos primeiros dias após a aplicação.

Tabela 3.4 - Mortalidade (acumulada) média (%), confirmada e total de *Cornitermes cumulans* aos 3, 4 e 5 dias para os 50 isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

Dias	Mortalidade média (%)			
	Confirmada		Total	
	<i>B.bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	<i>B.bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>
3	3,68 a ¹	9,82 a	35,65 a	59,19 b
4	12,22 a	16,99 a	62,63 a	79,50b
5	20,06 a	21,67 a	81,01 a	88,47 a

¹Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade dentro de um mesmo dia.

Figura 3.5 - Mortalidade (acumulada) média (%), confirmada e total de *Cornitermes cumulans* aos 3, 4 e 5 dias para os 50 isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

Na comparação destes dados com os obtidos por Fernandes (1991) e Fernandes e Alves (1992b), constata-se que estes autores observaram porcentagens de mortalidade total bastante elevadas já no 2º dia após a inoculação sendo que, dos 9 isolados testados, a mortalidade total acumulada variou de 20 a 100 %. Já no 4º dia a mortalidade total variou de 50 a 100 % apresentando, a maioria dos isolados, mortalidades superiores a 90 %. Nesse estudo, os isolados de *M. anisopliae* também se mostraram, na média, mais virulentos que os de *B. bassiana*. Além disso, estes autores observaram que os dois isolados mais virulentos foram, no primeiro bioensaio, 865 e 866 para *M. anisopliae* e 447 e 760 para *B. bassiana*, coincidindo, para *B. bassiana*, com os isolados selecionados neste experimento. Entretanto, deve-se considerar que os autores utilizaram uma metodologia de inoculação diferente da empregada para este estudo. Na metodologia

utilizada por Fernandes e Alves (1992b), os insetos ficaram em permanente contato com os conídios do fungo, depositados na superfície cartonada. Assim, potencializou-se a ação do fungo pois o tempo prolongado de exposição proporcionou maior concentração dos conídios nos insetos diminuindo o tempo letal. Este aspecto é mais relevante quando os insetos têm como parte importante do comportamento de defesa a limpeza dos conídios da sua superfície antes que estes possam germinar e penetrar. Esta pode ser a principal causa das maiores mortalidades obtidas nos trabalhos de Fernandes (1991) e Fernandes e Alves (1992b) em relação às observadas neste trabalho.

Por outro lado a comparação entre dados de diferentes bioensaios somente é possível se a concentração de conídios recebida individualmente for igual e conhecida uma vez que os valores dos tempos letais são correlacionados com as concentrações de conídios.

Fernandes (1991) somente coletou os dados de mortalidade confirmada no segundo bioensaio. Neste último teste o autor constatou mortalidades confirmadas da ordem de 95 a 100 % para os isolados de *M. anisopliae* e de 9 a 42 % para os isolados de *B. bassiana*, no 5º dia após a inoculação. As maiores mortalidades em relação às observadas neste estudo podem estar também relacionadas com a metodologia de inoculação.

As diferenças de virulência entre os isolados testados podem ser devidas a vários fatores. Um fator importante na expressão da virulência de um determinado isolado pode estar relacionado com a velocidade de germinação e consequente penetração na cutícula do inseto (Moorhause et al., 1993). No caso de insetos com hábitos sociais, como os cupins onde a limpeza entre os indivíduos (grooming) é um fator importante de defesa contra microrganismos, em especial os fungos, este aspecto pode ser decisivo na maior ou menor virulência de um determinado isolado. Uma elevada correlação entre a rápida germinação *in vivo* e a virulência de *Verticilium lecanii* foi reportada por Heale et al., (1989). Samuels et al. (1989) observaram correlação entre a germinação de *M. anisopliae in vivo* e o TL_{50} para *Nilaparvata lugens*. Entretanto, não foi observada correlação entre rápida germinação *in vitro* de *Metarhizium* spp. e *Otiorhynchus sulcatus*

(Moorehouse et al., 1993). Assim, a porcentagem e a velocidade de germinação *in vitro* e *in vivo* não são necessariamente correlacionadas e outros fatores são importantes neste processo como por exemplo algumas substâncias estimulantes que existem no tegumento do hospedeiro. A falta de correlação pode também ser reflexo do fato de que a germinação é somente um dos muitos fatores que influenciam a virulência. Entre outros, pode ser citada, a atividade do sistema imunológico do hospedeiro. As diferenças na habilidade de transpor as barreiras deste sistema pode refletir a maior ou menor virulência de um isolado (Moorehouse et al., 1993). Esta habilidade pode estar associada com a produção de toxinas do patógeno no hospedeiro. Vey et al. (1982) sugerem que metabólitos secundários como as dextruxinas, produzidas pelo patógeno, podem diminuir a resposta imunológica das células. Entretanto, as dextruxinas são somente um componente de um processo complexo de ataque do patógeno ao hospedeiro.

Os isolados selecionados neste estudo foram obtidos de diferentes hospedeiros e de regiões climáticas diversas (Tabela 3.1). Somente o isolado 760 de *B. bassiana* foi obtido de *Cornitermes cumulans* sendo que os outros foram encontrados parasitando espécies bastante distintas do cupim de montículo. Mesmo o isolado 760 foi encontrado parasitando *C. cumulans* no laboratório podendo ter sido inoculado por contaminação da colônia e não a partir de uma infecção ocorrida no ambiente natural do cupim. Alguns autores citam que os isolados mais virulentos são os encontrados parasitando a espécie alvo ou espécies intimamente relacionadas (Soares et al., 1983; Poprawski et al., 1985). Em termos coevolutivos esta constatação pode ser considerada correta pela seleção imposta pelo hospedeiro ao patógeno e vice-versa. Entretanto, analisando-se mais profundamente deve-se considerar que existem diferenças fisiológicas entre as populações de uma determinada espécie de inseto, principalmente quando em regiões geograficamente distintas, e que algumas possam ser mais susceptíveis do que outras a determinado isolado. Também é importante relacionar as condições bióticas e abióticas ideais para a ocorrência de determinado isolado. Estudando a variação no perfil de isoesterases de populações geográficas de *B. bassiana* isoladas de coleópteros do gênero *Sitona* Poprawski et al. (1988) constataram que isolados obtidos de uma mesma lavoura mostraram bandas com padrões bastante distintos. Este resultado possibilita levantar a

hipótese de que diferentes isolados com diferentes características estão presentes no ambiente, principalmente no solo, e que a sua ocorrência em determinada espécie está relacionada com as flutuações bióticas e abióticas do ambiente e com a sua conjugação propiciando as condições ideais para, por exemplo, ocorrer uma epizootia. Ainda, com relação à especificidade dos isolados, deve-se considerar que muitos isolados não correlacionados com a espécie alvo podem ter sido encontrados parasitando espécies com mecanismos fisiológicos de defesa bastante mais complexos e por isso possuem características que os tornam muito virulentos para outra espécie que não possua estes mecanismos de defesa.

Deste modo, pode-se concluir que a virulência pode ser determinada por um número de diferentes características intrínsecas ao isolado as quais atuam de forma aditiva na expressão total da virulência e que quando uma delas não se manifesta ou está ausente, não é necessariamente prejudicial para um isolado quanto à sua capacidade de colonizar e matar o hospedeiro. A manifestação destas características está também intimamente relacionada com as variações bióticas e abióticas do ambiente, assim como com as condições experimentais dos bioensaios.

3.3.2 Seleção de isolados - segunda fase

Os resultados obtidos nos bioensaios para a seleção entre os melhores isolados encontram-se representados nas Tabelas 3.5 e 3.6 e Figuras 3.6 e 3.7. A mortalidade total acumulada na testemunha, no 9º dia após a inoculação, foi de 8,3 % para o primeiro bioensaio e 0 para o segundo. Não se confirmou a mortalidade pelos patógenos em nenhuma das testemunhas.

Como na primeira fase, os dados não se adequaram ao modelo de Probit, para a determinação do TL_{50} , pelas mesmas razões já citadas, optando-se pela análise gráfica através da mortalidade confirmada.

Tabela 3.5 - Mortalidade (acumulada) (%), total e confirmada, no controle de *Cornitermes cumulans*, 1º bioensaio, na segunda fase da seleção de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

Dias	Isolados e % de mortalidade (acumulada)									
	1037		E9		1097		447		760	
	Tot. ¹	Conf. ²	Tot.	Conf.	Tot.	Conf.	Tot.	Conf.	Tot.	Conf.
2	4,9	2,0 a	8,8	0,0 a	3,7	0,0 a	6,12	0,0 a	4,1	0,0 a
3	28,4	13,7 a	24,5	0,0 b	13,0	0,0 b	16,3	1,0 b	15,3	0,0 b
4	57,4	33,3 a	44,1	4,9 b	29,6	5,6 b	40,8	13,2 ab	42,9	5,1 b
5	77,5	51,0 a	65,7	21,6 b	53,7	23,1 b	69,4	34,7 ab	61,2	12,2 b
6	82,3	55,8 a	75,5	30,4 ab	62,0	29,6 ab	75,5	37,8 ab	72,4	14,3 b
7	82,3	55,8 a	80,4	34,3 ab	71,3	36,1 ab	80,6	40,8 ab	77,5	14,3 b
8	87,3	56,9 a	85,3	37,3 ab	74,1	37,0 ab	83,7	43,9 a	77,5	14,3 b
9	89,2	57,8 a	87,3	37,3 ab	75,9	37,0 ab	89,8	45,9 a	78,6	14,3 b

¹ Mortalidade total; ² Mortalidade confirmada;

³ Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, dentro de um mesmo dia.

Observou-se que no primeiro bioensaio a mortalidade confirmada acumulada no 9º dia foi maior para os isolados 1037 e 447, respectivamente, 57,8 e 45,9%. Também, no 5º dia a mortalidade confirmada foi de 51% para o isolado 1037, acentuando a sua elevada virulência (Figura 3.7).

No segundo bioensaio, os isolados 1037 e E9 foram mais virulentos respectivamente com 69,7 e 63,5% de mortalidade confirmada. Novamente, o isolado 1037 alcançou níveis de mortalidade confirmada acima de 50% mais rapidamente, com 62,4% de mortalidade no 4º dia (Figura 3.7). Considerando-se a média de mortalidade confirmada nos dois bioensaios, esta foi maior para 1037 (63,7%), igual para E9 e 447 com 50,4 e 50,5% respectivamente, e ligeiramente inferior para 1097 (47,2%) sendo que o isolado 760 mostrou-se menos virulento (24,3%) (Tabela 3.7 e Figura 3.8 e 3.9).

Tabela 3.6 - Mortalidade (acumulada) (%), total e confirmada, no controle de *Cornitermes cumulans*, 2^o bioensaio, na segunda fase de seleção entre os melhores isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

Dias	Isolados e % de mortalidade (acumulada)									
	1037		E9		1097		447		760	
	Tot. ¹	Conf. ²	Tot.	Conf.	Tot.	Conf.	Tot.	Conf.	Tot.	Conf.
2	13,8	0,9 ab ³	6,7	3,8 a	10,2	1,85 ab	7,21	0,9 ab	6,48	0,0 b
3	43,1	22,0 a	22,1	6,7 ab	38,0	15,7 ab	27,9	0,9 b	30,6	4,6 b
4	89,9	62,4 a	67,3	43,3 ab	61,1	30,6 bc	66,7	27,9 bc	49,1	15,7 c
5	99,1	68,8 a	82,7	56,7 ab	87,0	50,0 ab	83,8	44,1 ab	72,2	28,7 b
6	100,0	69,7 a	88,5	62,5 ab	93,5	56,5 ab	94,6	53,1 ab	78,7	32,4 b
7	100,0	69,7 a	94,2	63,5 ab	95,4	56,5 ab	94,6	54,0 ab	78,7	34,3 b
8	100,0	69,7 a	94,2	63,5 ab	96,3	57,4 ab	96,4	55,0 ab	82,4	34,3 b
9	100,0	69,7 a	94,2	63,5 ab	96,3	57,4 ab	97,3	55,0 ab	84,3	34,3 b

¹ Mortalidade total ; ² Mortalidade confirmada;

³ Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, dentro de um mesmo dia.

Assim, destacou-se dos demais o isolado 1037 de *M. anisopliae*, que foi o mais virulento nos dois bioensaios de seleção, causando uma maior porcentagem de mortalidade confirmada mais rapidamente e apresentou a maior média de virulência entre os isolados (Figura 3.7). Para *B. bassiana* o isolado 447 foi o mais virulento nos dois bioensaios.

Os isolados mais virulentos para o controle de *C. cumulans*, 1037 *M. anisopliae* e 447 *B. bassiana* foram obtidos a partir de *Solenopsis* spp. (Hymenoptera: Formicidae) insetos filogeneticamente bastante distintos dos cupins mas também sociais e com uma característica semelhante quanto ao hábito de utilização da limpeza externa na descontaminação de sua cutícula por fungos entomopatogênicos. Assim, pode-se inferir que a rápida germinação e penetração no inseto pode ter sido um dos fatores que possibilitou a infecção destas formigas por estes patógenos. Novamente, esta característica pode ter sido decisiva no sucesso da colonização e na expressão da maior virulência para

C. cumulans. Provavelmente, esta não é a única característica importante nestes dois isolados que os torna altamente virulentos para diferentes espécies de insetos. Para 1037 Alves et al., (1997) mostraram que este isolado, em comparação com outros, apresentou, para determinadas espécies de insetos, uma elevada virulência pela rapidez de sua ação letal. Assim, para larvas de *Culex quinquefasciatus* foi observada mortalidade de 100%, 24 h após a aplicação, sendo esta comparada com a mortalidade provocada por *Bacillus sphaericus*. Para *Blatella germanica*, a mortalidade foi de aproximadamente 75% no sétimo dia após o caminhar em superfície tratada com conídios do isolado 1037 ocorrendo conidiogênese na maioria dos insetos mortos. Testes em outros insetos como *D. saccharalis*, *Solenopsis saevissima* e *Heterotermes tenuis* mostraram resultados bastante satisfatórios e promissores para a utilização deste isolado. Assim, como já discutido anteriormente uma série de características importantes durante todo o processo de infecção, colonização e reprodução faz com que este isolado seja altamente virulento a diferentes espécies, entre elas *C. cumulans*.

Figura 3.6 - Mortalidade total acumulada (%) de *Cornitermes cumulans* inoculado com os isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

Figura 3.7 - Mortalidade confirmada acumulada (%) de *Cornitermes cumulans* inoculado com os isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

Tabela 3.7 - Mortalidade (acumulada) média (%), total e confirmada, de *Cornitermes cumulans* na segunda fase (bioensaios 1 e 2) de seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*

Isolados / % de mortalidade										
Dias	1037		E9		1097		447		760	
	Tot. ¹	Conf. ²	Tot.	Conf.	Tot.	Conf.	Tot.	Conf.	Tot.	Conf.
2	9,3	1,4	7,75	1,9	6,9	0,9	6,7	0,5	5,3	0,0
3	35,7	17,8	23,3	3,3	25,5	7,8	22,1	1,0	23,0	2,3
4	73,6	47,8	55,7	24,1	45,3	18,1	53,7	20,6	46,0	10,4
5	88,3	59,9	74,2	39,1	70,3	36,5	76,6	39,4	66,7	20,5
6	91,1	62,7	82	46,4	77,7	43,0	85,0	45,5	75,6	23,4
7	91,1	62,7	87,3	48,9	83,3	46,3	87,6	47,4	78,1	24,3
8	93,6	63,3	89,7	50,4	85,2	47,2	90,0	49,5	80,0	24,3
9	94,6	63,7	90,7	50,4	86,1	47,2	93,5	50,5	81,5	24,3

¹ Mortalidade total; ² Mortalidade confirmada

Figura 3.8 - Mortalidade total acumulada média (%) (bioensaios 1 e 2) de *Cornitermes cumulans* inoculado com os isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

Figura 3.9 - Mortalidade confirmada acumulada média (%) (bioensaios 1 e 2) de *Cornitermes cumulans* inoculado com os isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

3.3.3 Testes de produção dos isolados selecionados na segunda fase

Pela análise dos dados de produção (Tabela 3.8), o isolado 1037 alcançou as maiores produtividades. Entretanto, não foi observada diferença estatística entre os isolados. Somente o isolado 760 de *B. bassiana* foi estatisticamente diferente dos demais sendo o menos produtivo.

A comparação destes resultados com os obtidos por outros autores mostra certas limitações. A primeira está relacionada com os isolados utilizados, diferentes dos testados aqui. A segunda está relacionada com a variação do tempo de cozimento do arroz, praticamente impossível de ser igual para dois experimentos, podendo deixar os grãos de arroz com diferentes teores de umidade (mais ou menos duros), o tipo (variedade e local de cultivo) de arroz utilizado é também importante nos níveis de produção alcançados pelos isolados. Além disso, os

Tabela 3.8 - Médias de produção de conídios para os diferentes isolados.

Isolado	Médias da produção de conídios	
	Por grama de arroz ¹	Por quilograma de arroz ²
1037	337,15 a ³	3,37
447	265,57 a	2,66
E9	153,62 a	1,54
1097	104,03 a	1,04
760	12,28 b	0,12

¹ Médias ($\times 10^7$ conídios por grama de arroz);

² Médias ($\times 10^{12}$ conídios por quilograma de arroz);

³ Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey. Dados transformados por $\log(x + 0,5)$

dados de produção foram extrapolados de grama para quilogramas de arroz, para possibilitar uma comparação com dados de outros autores. Entretanto, a comparação

destes dados com os obtidos por Alves e Pereira (1989) mostraram que os resultados de produção, em grande escala, relatados por estes autores foram superiores aos obtidos neste estudo tanto para o melhor isolado de *B. bassiana* (447) e menores para o melhor de *M. anisopliae* (1037). Os autores constataram produções médias de $6,2 \times 10^{12}$ e $8,13 \times 10^{11}$ conídios por quilo de arroz para *B. bassiana* e *M. anisopliae*, respectivamente. Neste estudo a produção extrapolada de um grama para um quilograma de arroz mostrou potencial de produção de $3,37 \times 10^{12}$ conídios por quilo para o isolado 1037 e de $2,66 \times 10^{12}$ conídios por quilo de arroz para 447. Fernandes (1991) observou produções de conídios por quilo de arroz de $3,3 \times 10^{12}$ para o isolado de *B. bassiana* 868; $3,23 \times 10^{12}$ para 865; $2,35 \times 10^{12}$ para 866 e $2,45 \times 10^{12}$ para 259, todos isolados de *M. anisopliae*. As produtividades observadas por este autor estão muito próximas das constatadas neste estudo. Assim, com exceção do isolado 760, a o se considerar a produtividade em meio de arroz, todos os outros isolados estudados podem ser utilizados.

Considerando-se os resultados de virulência e de produção obtidos o isolado 1037 de *M. anisopliae* deve utilizado na próxima fase da pesquisa para os experimentos de campo.

3.4 Conclusões

O isolado 1037 de *M. anisopliae* é o mais virulento de todos os isolados.

O isolado 447 é o mais virulento dos isolados de *B. bassiana*.

Os isolados mais produtivos são o 1037, 447, E9 e 1097.

4 EFEITO DO IMIDACLOPRID NA INIBIÇÃO DA CAPACIDADE DE LIMPEZA DE *Cornitermes cumulans* INOCULADOS COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

4.1 Introdução

Estudos realizados com o inseticida imidacloprid mostraram que após a utilização do produto ocorreu uma maior incidência de patógenos infectando cupins. Para *Reticulitermes flavipes* avaliações de laboratório onde se aplicou imidacloprid no solo e em iscas, mostraram um sinergismo com entomopatógenos, ocorrendo a morte mais rápida dos insetos (Zeck, 1992). Este autor observou que a utilização de *M. anisopliae* em associação com imidacloprid possibilitou o emprego de concentrações de conídios e de imidacloprid bastante inferiores às utilizadas quando cada componente foi empregado sozinho, com a mesma eficiência.

Estudos posteriores, realizados por Boucias et al. (1996), mostraram que a aplicação de concentrações subletais de imidacloprid não provocaram alterações no tegumento e nem no sistema imunológico dos insetos. Entretanto, foi afetado o seu comportamento de limpeza, diminuindo a capacidade de lambimento “grooming” entre os indivíduos, possibilitando que um maior número de conídios germinasse e penetrasse os insetos, causando a sua morte rapidamente. Deste modo, o sinergismo obtido na utilização de fungo e imidacloprid está associado a uma alteração no comportamento de limpeza superficial dos indivíduos.

Os aspectos relacionados com o ciclo dos fungos entomopatogênicos nos cupins são pouco conhecidos. Entretanto, o ciclo de *M. anisopliae* em *N. exitiosus* foi estudado por Hanel (1982b), que observou um tempo médio para a penetração de 48 horas. O ciclo de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em *H. tenuis* mostrou, para *B. bassiana*, que a germinação dos conídios iniciou-se entre 12 e 24 h e a penetração após 48 h. Para *M. anisopliae*, a germinação e penetração ocorreram entre 24 e 48 h, com a morte dos insetos. Já a conidiogênese iniciou-se mais rapidamente para *M. anisopliae* (4 dias) do que para *B. bassiana* (5 dias) (Lopes et al., 1996).

Para as observações utilizando o M.E.V., diferentes técnicas de preparo do material podem ser utilizadas, propiciando diferenças de qualidade na preservação dos insetos e das estruturas dos fungos. De um modo geral, nas técnicas mais simples o material é fixado em vapor OsO₄ e posteriormente seco em dessecador (Quattlebaum & Carner, 1980; Neves et al., 1996; Lopes et al., 1996). Uma técnica mais sofisticada e demorada utiliza fixadores líquidos como o glutaraldeído, onde os insetos são fixados por imersão, sendo posteriormente desidratados em série de etanol e secos em ponto crítico através de CO₂ (Champlin et al., 1981; Boucias & Pendland, 1982; Gunnarsson, 1988; Lecuona et al., 1991).

Este estudo teve como objetivos observar o comportamento e a capacidade de limpeza dos cupins quando submetidos ao tratamento com o fungo ou com o fungo e inseticida, determinar a duração das fases do processo infectivo de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre operários e soldados de *C. cumulans* e comparar dois métodos de fixação dos insetos e dos patógenos para as observações ao M.E.V.

4.2 Material e Métodos

Utilizaram-se os melhores isolados selecionados nos bioensaios (Capítulo 1), (1037) de *M. anisopliae* e (447) de *B. bassiana*. Todas as observações ao M.E.V. foram feitas em um microscópio Zeiss modelo DMS 940 A.

4.2.1 Ciclo de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em *C. cumulans* e comparação de métodos de fixação

Os insetos foram coletados em colônia de campo, na região de Piracicaba-SP e separados em dois grupos, cada um com 120 soldados e 120 operários, acondicionados em placas de Petri.

Pulverizaram-se os insetos nas placas, com 0,5 ml de uma suspensão de 1×10^8 conídios/ml separando-os em grupos de 10 operários e 10 soldados em recipientes idênticos aos utilizados nos bioensaios (Capítulo 1) com parte cartonada do ninho e papel

de filtro úmido preso à tampa. Os cupins foram mantidos em estufa incubadora (B.O.D.) à temperatura de $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ no escuro. Retiraram-se amostras das duas castas às 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h após a inoculação. Foram comparadas duas técnicas de fixação dos espécimes para posterior observação ao M.E.V..

Técnica de dissecador - os insetos, mortos em vapor de éter, foram fixados em vapor de OsO_4 por no mínimo 48 h e desidratados em dissecador por no mínimo 72 h, sendo então feita a cobertura com ouro e as observações ao M.E.V.

Técnica de ponto crítico - os insetos mortos em vapor de éter foram fixados em solução de glutaraldeído a 4% com tampão cacodilato 0,2 M a pH 7,2 por 6 h, seguida de imersão em OsO_4 a 1% em tampão cacodilato 0,1 M a pH 7,2 por 1 h, desidratação em série de acetona, diluída a 30, 50, 70, 90 e três vezes a 100%, ficando as amostras 10 minutos em cada diluição, com secagem ao ponto crítico em CO_2 e posterior cobertura com ouro para observação ao M.E.V..

Para cada uma das metodologias foi preparado 1 "stub" com 2 operários e 2 soldados por horário de coleta, perfazendo um total de 20 insetos por casta.

Para as observação da presença de conídios de *M. anisopliae* no trato digestivo de operários, vários exemplares foram dissecados 24 h após a aplicação

4.2.2 Estudo da inibição da capacidade de limpeza de *C. cumulans* sob a ação de um estressor

A. Determinação da concentração subletal

Em todos os estudos com imidacloprid utilizou-se o produto comercial Gaucho 70% PM, sendo que as diluições foram feitas sempre em porcentagem de ingrediente ativo.

Instalou-se um bioensaio com diferentes concentrações de ingrediente ativo (imidacloprid) visando determinar aquelas que se mostrassem subletais. Utilizaram-se placas de Petri plásticas de 6 cm de diâmetro por 2 cm de altura, colocando-se na base círculos de papel de filtro tratado. Os tratamentos utilizados foram: testemunha,

0,00001%; 0,0001%; 0,001%; 0,01% e 0,1% de ingrediente ativo. Prepararam-se as suspensões nas diferentes concentrações, mergulhando o papel de filtro e deixando secar por uma noite. Para a testemunha o papel foi tratado somente com água destilada. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco repetições (recipientes) colocando-se 15 insetos por recipiente (dois soldados e 13 operários). Na tampa da placa foi colocado papel de filtro umedecido com água destilada e os recipientes foram deixados em estufa incubadora (B.O.D.) à temperatura de $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ no escuro. As avaliações foram feitas às 6, 12, 24, 48 e 72 h após a colocação dos insetos em contato com o inseticida, tempo suficiente para que ocorra a penetração do patógeno. Avaliou-se a porcentagem de mortalidade e deram-se notas de atividade, para os insetos, de 0 (sem atividade), 2 (pouco ativo), 5 (medianamente ativo), 8 (ativo) e 10 (muito ativo) para os diferentes tratamentos.

B. Inibição da capacidade de limpeza de *C. cumulans*

B.1 Inoculação de *Metarhizium anisopliae* e imidacloprid

Os insetos foram coletados em colônias, pulverizados com 0,5 ml de suspensão de *M. anisopliae* (isolado 1037) de concentração igual a $7,3 \times 10^8$ conídios/ml e colocados em placas de Petri com papel de filtro tratado ou não com imidacloprid. O papel de filtro foi tratado do mesmo modo descrito no item anterior. Para os tratamentos em que somente foi utilizado *M. anisopliae* o papel de filtro foi tratado com água destilada. Os tratamentos utilizados constam da tabela 4.1.

Nos tratamentos 2, 4 e 6 foram utilizados somente soldados visando observar a sua capacidade de limpeza na ausência dos operários.

Tabela 4.1 - Tratamentos dos ensaios para observação de inibição da limpeza de *Cornitermes cumulans* tratados com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. Concentração de imidacloprid (% i.a.), castas utilizadas e número de insetos de cada casta por placa.

Trat.	Fungo	Inseticida	Castas	Número de insetos
1	<i>M. anisopliae</i>	0,0	Operários e soldados	100 operários e 15 soldados
	<i>B. bassiana</i>	0,0	Operários e soldados	100 operários e 15 soldados
2	<i>M. anisopliae</i>	0,0	Soldados	25 soldados
3	<i>M. anisopliae</i>	0,01	Operários e soldados	100 operários e 15 soldados
	<i>B. bassiana</i>	0,01	Operários e soldados	100 operários e 15 soldados
4	<i>M. anisopliae</i>	0,01	Soldados	25 soldados
5	<i>M. anisopliae</i>	0,001	Operários e soldados	100 operários e 15 soldados
6	<i>M. anisopliae</i>	0,001	Soldados	25 soldados

Após tratados, os insetos foram transferidos para estufa incubadora (B.O.D.) à temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ no escuro. Às 0, 6, 12, e 24 h após, foram retirados 4 insetos de cada tratamento (dois soldados e dois operários ou 4 soldados), mortos em vapor de éter, fixados em vapor de OsO_4 , por no mínimo 48 h e desidratados em dissecador, por no mínimo 72 h. Foram então cobertos com ouro para serem observados ao M.E.V.

B.2 Inoculação de *Beauveria bassiana* e imidacloprid

Para o fungo *B. bassiana* (isolado 447) utilizou-se a mesma metodologia descrita no item anterior. Entretanto, a concentração da suspensão foi de $1,6 \times 10^9$ conídios/ml e os tratamentos foram somente dois: o tratamento 1, (testemunha) e o tratamento 3 (0,01% de imidacloprid) (tabela 4.1). Foram retirados dois soldados e dois operários às 0, 6, 12 e 24 h após a aplicação (para cada tratamento) fixados como no item anterior, cobertos com ouro e observados ao M.E.V.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Ciclo de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em *C. cumulans* e comparação de métodos de fixação

A. Ciclo de *M. anisopliae*

O processo de adesão de *M. anisopliae* iniciou após a aplicação entre 0 e 6 h (Figura 4.1 A e Figura 4.3). A germinação iniciou-se entre 6 e 12 h após a aplicação (Figura 4.1 B, C, D, E e Figura 4.3). Entre 12 e 24 h iniciou-se a penetração do fungo (Figura 4.3) com a formação (Figura 4.2 C) ou não (Figura 4.1 E, F) de apressório. Hanel (1982b) observou as mesmas características no processo de penetração de *M. anisopliae* em *N. exitiosus*. Este autor citou o tempo médio para que ocorra a penetração como sendo de 48 h, variando de 18 a 66 h. A formação de apressório foi também citada por Lopes et al. (1996) no processo de penetração de *M. anisopliae* em *S. temis* sendo que esta ocorreu entre 24 e 48 h com a morte dos insetos. Para a formação do apressório ocorre uma dilatação na extremidade do tubo germinativo com a migração do conteúdo citoplasmático transformando este local em um centro de elevada atividade metabólica associada com a produção de exoenzimas para a degradação da cutícula (St. Leger, 1993; Alves, 1998). A penetração de *M. anisopliae* foi observada nas diferentes partes do corpo do inseto, principalmente nos segmentos das pernas e na cabeça. Na penetração de *M. anisopliae* em *N. exitiosus*, Hanel (1982b) referiu-se à formação de uma placa ou corpo hifal entre as camadas da cutícula. Esta constatação foi também relatada por Boucias et al. (1996) na penetração de *B. bassiana* em *R. flavipes* onde o fungo apresentou um crescimento vegetativo bastante extenso entre as camadas da epicutícula e da endocutícula.

Alguns tubos germinativos penetraram pela base de setas (Figura 4.1 E, F ; Figura 4.2 A). A penetração pela base da seta é provavelmente mais rápida por ser a camada da cutícula menos espessa, exigindo menor produção de enzimas extracelulares importantes na sua degradação. Algumas observações mostraram a formação de um halo em volta das

Figura 4.1 - Fotografias ao M.E.V. de *Metarhizium anisopliae* em *Cornitermes cumulans*; **A** - Conídio germinando - 24 h (5000 x); **B** - Conídios germinando - 12 h (500 x 4); **C** - Conídio germinando - 12 h (500 x 8); **D** - Conídio germinando - 12 h (1000 x 8); **E** - Penetração em base da seta - 24 h (5000 x 2); **F** - Penetração em base da seta -24 h (10000 x).

estruturas do conídio germinado (Figura 4.2 B, para *M. anisopliae* e Figura 4.5 A, C, D, para *B. bassiana*). Este halo provavelmente está associado com a produção de exoenzimas na degradação da cutícula durante o processo de penetração. Várias enzimas são descritas como responsáveis pela degradação da cutícula durante o processo de penetração como a quimoelastase, produzida por *M. anisopliae* conhecida como Pr1 (Roberts & Krasnoff, 1998). Estes autores mencionaram que, no momento da formação do apressório, 78% da produção de proteína de *M. anisopliae* é destinada à síntese de Pr1 sendo um fator-chave na virulência deste fungo. Alguns estudos revelam que os alcanos, presentes na camada de lipídios da epicutícula podem ser utilizados como fonte de nutrientes nos estágios iniciais de desenvolvimento de *M. anisopliae* (St. Leger, 1988). A observação bastante nítida do halo, como pode ser verificado nas figuras citadas anteriormente, ocorreu mais frequentemente na cabeça dos soldados e dos operários. Esta constatação pode suportar a hipótese de que a epicutícula nesta parte do corpo dos cupins apresenta algumas características diferentes das restantes. Por outro lado, somente em uma quantidade muito pequena dos conídios, observados germinando e penetrando, foi constatada a presença deste halo.

Outra característica importante no processo de penetração do fungo foi a formação de diversos pontos de penetração num mesmo tubo germinativo (Figura 4.2 D, para *M. anisopliae* e Figura 4.5 F, para *B. bassiana*). Esta penetração múltipla proporciona maior virulência e deve ter contribuído para a seleção destes isolados contra diversas espécies de insetos. Também, este comportamento é importante para a produção de um maior número de corpos hifais, durante o processo de colonização, aumentando a capacidade competitiva do fungo em relação aos outros microrganismos, saprófitas ou oportunistas presentes no inseto. Entretanto, esses tubos germinativos com múltiplos pontos de penetração foram constatados apenas ocasionalmente.

No período entre 24 e 72 h após a aplicação, o fungo colonizou o inseto (Figura 4.3). O processo de colonização iniciou-se, provavelmente com a produção de corpos hifais e liberação de toxinas na hemolinfa dos insetos. Com relação aos tipos de corpos hifais, os blastósporos são citados como os primeiros a ocorrer no processo de colonização de *N. exitiosus* por *M. anisopliae* e o último o micélio do fungo (Hanel,

Figura 4.2 - Fotografias ao M.E.V. de *Metarhizium anisopliae* em *Cornitermes cumulans*; **A** - Penetração em base da seta - 24 h (1000 x 4); **B** - Germinação e possível penetração com formação de halo na cutícula pela degradação enzimática - 24 h (2100 x 2); **C** - Conídio germinando com formação de apressório - 72 h (10000 x); **D** - Conídio germinando com formação de diferentes pontos de penetração - 72 h (1000 x 8); **E** - Extrusão do micélio do fungo pela extremidade do lábio do soldado - 96 h (200 x 4); **F** - Extrusão do micélio do fungo pela extremidade da perna - 120 h (100 x 4).

1982b). Alguns fungos, após passarem a barreira da cutícula, têm um desenvolvimento dimórfico, produzindo inicialmente corpos hifais na hemocele, e posteriormente, uma fase de invasão dos tecidos por um estágio micelial (Pendland et al., 1993; Boucias et al., 1995). A liberação de metabólitos secundários tóxicos no meio está associada com a ação antimicrobiana e deletéria do sistema imunológico do hospedeiro, eliminando a competição por nutrientes e facilitando o estabelecimento do patógeno (Vilcinskas et al., 1997).

A maioria dos insetos morreu entre 72 e 96 h ou seja, entre o terceiro e o quarto dia após a inoculação. A morte pode ser devida a diferentes fatores relacionados também com a produção de toxinas que agem como inseticidas, como as dextruxinas (Suzuki et al. 1971; Samuels et al., 1988b citados por Roberts & Krasnoff, 1998).

O início da extrusão do micélio do fungo ocorreu entre 72 e 96 h (terceiro e quarto dias), inicialmente pelas partes menos rígidas do corpo, como as regiões intersegmentares (Figura 4.2 E, F) ou por aberturas naturais, como a extremidade da fontanela (Figura 4.4 A, B). Esta região, como toda a cabeça, foi sempre um local de maior saída de micélio e consequentemente maior conidiogênese em relação ao restante do corpo dos insetos (Figura 4.4 C). A extremidade do lábio dos soldados foi um dos pontos onde ocorreu o início da extrusão do patógeno (Figura 4.2 E e 4.4 A). Esta região mostra-se bastante membranosa, estando provavelmente associada a órgãos sensoriais dos soldados.

A conidiogênese iniciou-se entre 96 e 120 h (quarto e quinto dias) após a aplicação (Figura 4.4 A), aumentando de intensidade entre 120 e 144 h (Figura 4.4 B) e atingindo o pico entre as 144 e 168 h (Figura 4.4 C) ficando o inseto completamente coberto por micélio e conídios do fungo, principalmente nas regiões mais quitinosas do corpo como a cabeça e o tórax. A menor conidiogênese na região do abdome deve estar associada com a maior competição do fungo com microrganismos antagonistas presentes no intestino do inseto, os quais inibem o seu pleno desenvolvimento nesta região. Também este fato pode estar correlacionado com a maior quantidade e melhor qualidade de nutrientes (polissacarídios) encontrados nas regiões quitinosas. Na inoculação de *H.*

temuis por *M. anisopliae*, a conidiogênese iniciou-se também entre o quarto e o quinto dia (96 a 120 h) (Lopes et al., 1996).

Figura 4.3 - Ciclo de *Beauveria bassiana* (447) e *Metarhizium anisopliae* (1037) sobre *Cornitermes cumulans*.

B. Ciclo de *B. bassiana*

Para o fungo *B. bassiana* observou-se um comportamento idêntico ao de *M. anisopliae*. A adesão dos conídios ocorreu entre 0 e 6 h após a aplicação e o início da germinação entre 6 e 12 h (Figura 4.4 D, E, F e Figura 4.3). Os conídios foram observados principalmente na cabeça, tórax e pernas. A maioria dos conídios penetrou o corpo do hospedeiro no período das 12 às 24 h (Figura 4.5 A, B, C, D, E, F). Entretanto, observaram-se estruturas semelhantes a um apressório (Figura 4.4 E, F) formando-se entre 6 e 12 h. Estas estruturas podem estar associadas com a penetração no corpo do cupim, mostrando a rapidez deste processo para este isolado e evidenciando uma característica importante para a elevada virulência. Entretanto, o número de conídios possivelmente germinados neste período foi muito baixo. Na inoculação de *B. bassiana* em *H. temuis*, a germinação iniciou-se entre 12 e 24 h com a penetração após as 48 h e a

Figura 4.4 - Fotografias ao M.E.V. de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em *Cornitermes cumulans*; **A** - Início da conidiogênese de *M. anisopliae* -120 h (100 x 8); **B** - Plena conidiogênese de *M. anisopliae* -144 h (165 x 4); **C** - Idem anterior - 168 h (500 x); **D** - Conídio de *B. bassiana* germinando -12 h (3000); **E** - Idem anterior às 12 h (5000 x 2); **F**- Idem anterior -12 h (2000 x 4).

morte às 72 h (Lopes et al., 1996). Também para *R. flavipes* observou-se que *B. bassiana* formou tubos germinativos e estruturas de penetração entre 12 e 24 h após a inoculação (Boucias et al., 1996). Estes autores constataram ainda que um número considerável de bactérias foi observado nos locais de penetração dos fungos e que por sua característica oportunista podem ser responsáveis pelas septicemias observadas nos insetos tratados com imidacloprid.

Assim como para *M. anisopliae*, ao redor de alguns conídios e tubos germinativos de *B. bassiana*, observou-se a formação de um halo, provavelmente provocado pela ação das exoenzimas produzidas pelo patógeno (Figura 4.5 A). Em alguns conídios observaram-se expansões laterais saindo da estrutura principal de penetração, com características de apressório (Figura 4.5 A) ou de tubo germinativo (Figura 4.5 D). Estas podem estar associadas com o processo de penetração ou com a adesão à cutícula do inseto. A adesão dos conídios por microbastonetes “rodlets” de natureza lipoprotéica ou de outra constituição química foi citada por Boucias et al. (1988).

Entre 24 e 72 h ocorreu a colonização do corpo dos insetos com a produção de toxinas e invasão dos diferentes tecidos (Figura 4.3). Os insetos morreram entre 48 e 72 h após a inoculação apresentando, na sua grande maioria (> 80%), antes da extrusão do fungo, coloração rosa na região da cápsula cefálica e das pernas, regiões de onde foi observada a saída do micélio do fungo em maiores quantidades. Esta coloração é característica de insetos de cutícula clara, quando atacados por *B. bassiana* como observado para *R. flavipes* (Boucias et al., 1996) e *H. tenuis* (R. Lopes, comunicação pessoal). Durante o processo de colonização de *R. flavipes* por *B. bassiana*, células fúngicas foram observadas invadindo os tecidos do hospedeiro, incluindo o epitélio da cutícula, músculos e corpos gordurosos (às 72 horas). O exame da hemolinfa não revelou a formação de uma grande quantidade de corpos hifais sendo que decorridas 96 a 120 h, quando os cupins morreram, esta continha relativamente poucos corpos hifais (Boucias et al., 1996). No estudo conduzido por Bao & Yendol (1971) com *B. bassiana* em *R. flavipes*, não se constatou um intenso crescimento do micélio próximo à morte dos insetos. Entretanto, após a morte este desenvolveu-se rapidamente, envolvendo os corpos

Figura 4.5 - Fotografias ao M.E.V. de *Beauveria bassiana* em *Cornitermes cumulans*; **A** - Conídio germinando com formação de halo na cutícula pela degradação enzimática - 24 h (3000 x 2); **B** - Conídios germinando e penetrando na base da seta -24 h (5000 x 2); **C** - Penetração - 24 h (4300 x); **D** - Idem anterior (10000 x); **E** - Penetração - 24 h (3000 x 4); **F** - Penetração em dois pontos com bifurcação do tubo germinativo - 72 h (3000 x 4).

gordurosos, células sanguíneas, músculos, gânglios, glândulas salivares e tubos de Malpighi, aproximadamente 64 h após a inoculação.

A extrusão do patógeno iniciou-se entre 72 e 96 h (Figura 4.6 A), bem como a conidiogênese (Figura 4.6 B). Como para *M. anisopliae*, a extrusão iniciou-se a partir das regiões intersegmentares, espalhando-se posteriormente por todo o corpo do hospedeiro principalmente na cabeça, no tórax e nas pernas. Com o início da conidiogênese ocorrendo entre 72 e 96 h, praticamente logo após a extrusão do micélio, o isolado de *B. bassiana* testado mostrou-se mais rápido na formação dos conídios em comparação ao isolado de *M. anisopliae*, para o qual esta iniciou-se entre 96 e 120 h (Figura 4.3). A plena esporulação de *B. bassiana* ocorreu entre as 120 e 144 h.

É importante salientar que as diferentes fases do ciclo dos patógenos variam em função de condições do ambiente (principalmente temperatura e umidade), do hospedeiro, como seu estágio de desenvolvimento e do patógeno (virulência) além da quantidade de inóculo. A temperatura é importante em todo o desenvolvimento do patógeno, desde a germinação à conidiogênese. A umidade relativa influencia as etapas que ocorrem no exterior do hospedeiro como a germinação e penetração, e principalmente a conidiogênese.

Neste estudo, de todos os fatores citados acima, o mais variável e de menor controle foi a quantidade de conídios depositados sobre os indivíduos ou seja, a quantidade de inóculo. Na inoculação de *R. flavipes* por *B. bassiana*, Bao & Yendol (1971) citam que os insetos morreram entre 24 e 36 h após a inoculação e que a elevada virulência de *B. bassiana* pode estar associada, entre outros fatores, à quantidade de inóculo e às condições do hospedeiro. A quantidade de inóculo provavelmente provoca alterações no tempo necessário para causar a morte, devendo ser menor quanto maior o número de conídios que penetra o inseto, alterando consequentemente, o tempo necessário para se iniciar a extrusão do patógeno e a conidiogênese. Por outro lado, os períodos de germinação e penetração não são teoricamente alterados pela quantidade de inóculo presente.

Figura 4.6 - Fotografias ao M.E.V. de *Beauveria bassiana* em *Cornitermes cumulans* e comparação de técnicas de fixação; **A** - Extrusão da extremidade do lábio - 96 h (100 x 8); **B** - Início da conidiogênese - 96 h (1000 x 2); **C** - Soldado fixado pela técnica de ponto crítico (19 x); **D** - Idem anterior (28 x); **E** - Soldado fixado pela técnica de dissecador (20 x); **F** - Idem anterior (27 x).

Na comparação do ciclo dos dois fungos (Figura 4.3) observa-se que ocorreu uma semelhança nas diversas etapas de desenvolvimento, entretanto, o início da conidiogênese ocorreu mais precocemente em *B. bassiana*.

Outro aspecto importante relacionado com o ciclo dos patógenos é a sobreposição das diferentes fases de desenvolvimento, ou seja, a germinação dos patógenos iniciou-se entre 6 e as 12 h e a penetração entre 12 e 24 h. Entretanto, estas duas fases do desenvolvimento continuaram ocorrendo por períodos maiores, podendo ser observada a germinação e a penetração até 72 h após a inoculação.

C. Comparação dos métodos de fixação

Com relação ao melhor método de fixação observou-se que a técnica de ponto crítico preservou de forma mais adequada os insetos e o fungo, em relação à técnica de dissecador. Na preservação dos insetos, estes mantiveram o aspecto e forma originais, sem sofrer enrugamentos e deformações, quando fixados por ponto crítico (Figura 4.6 C e D). Por outro lado, quando se utilizou o dissecador, os insetos mostraram um enrugamento do abdome (Figura 4.6 E e F). Como observado nas figuras, a região do abdome foi a mais deformada por ressecamento por ser a menos quitinosa. Além disso, as pernas dos insetos, principalmente fêmur e tíbia, ficaram murchas quando foi utilizada a técnica de dissecador. A cabeça, mais quitinosa, não mostrou diferença quando fixada pelas duas técnicas.

Com relação aos patógenos o método de fixação utilizando o ponto crítico foi também mais adequado por preservar as estruturas dos fungos, em especial os conídios e estruturas de penetração, mantendo-os na sua forma original. Isto pode ser comprovado pelas Figuras 4.1 F; 4.2 A; 4.7 A, D e F nas quais os conídios e tubos germinativos, fixados utilizando o dissecador, apresentaram um aspecto murcho. No entanto, quando a técnica de ponto crítico foi utilizada, a maioria das estruturas preservaram sua forma não ocorrendo deformação. Assim, nas Figuras 4.2 C, D e 4.7 C e E a preservação foi melhor que a obtida pelo tratamento através do método de dissecador.

As diferenças nos métodos de fixação, que resultaram em diferentes níveis de qualidade, mostram que quando o objetivo dos estudos é o de se fazerem análises de rotina, como por exemplo observar o número ou a quantidade de conídios em determinadas regiões do corpo do inseto ou até o ciclo do fungo no inseto, pode-se optar pela técnica mais simples (dissecador) por ser menos dispendiosa e trabalhosa do que a fixação por imersão e secagem ao ponto crítico. Por outro lado, quando o objetivo é estudar as diferentes estruturas dos insetos e dos fungos, a técnica de ponto crítico é preferível, pois os resultados são consideravelmente melhores.

4.3.2 Inibição da capacidade de limpeza de *C. cumulans* sob a ação de um estressor

A. Determinação das concentrações subletais de imidacloprid

Os resultados referentes à porcentagem de mortalidade de *Cornitermes cumulans* nos diferentes tratamentos e as notas de atividade encontram-se na Tabela 4.2. As figuras 4.8 e 4.9 representam, respectivamente, a porcentagem de mortalidade acumulada e as notas médias de atividade para os diferentes tratamentos. Os dados de mortalidade não se adequaram ao modelo de Probit, por ter ocorrido, para a grande maioria dos tratamentos um χ^2 altamente significativo e elevada heterogeneidade. Deste modo optou-se pela análise gráfica através da mortalidade confirmada.

A porcentagem de mortalidade foi baixa para todas as concentrações de imidacloprid até 24 h após o tratamento com exceção da concentração mais elevada (0,1%) com 54,67% de mortalidade. Decorridas 48 h a mortalidade foi para os tratamentos 0,1% (66,67%) e 0,01% (58,67%) para os tratamentos 0,001% (18,67%) e 0,0001% (13,34%) e para o tratamento 0,00001% (2,67%) (Tabela 4.2 e Figura 4.8). Decorridas 72 h da aplicação a mortalidade foi superior a 50% para todos os tratamentos com exceção da concentração 0,0001 e 0,00001%. Boucias et al. (1996) constataram mortalidades próximas a 95, 60, 40, 15% e menores que 5% respectivamente para as concentrações 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 e 0,00001% de imidacloprid no quarto dia após a

Figura 4.7 - Fotografias ao M.E.V. Comparação de técnicas de fixação; **A** - Conídios de *M. anisopliae* fixados pela técnica de dissecador (1000 x 4); **B** - Conídio de *M. anisopliae* fixado pela técnica de ponto crítico (1000 x 8); **C** - Massa de conídios de *M. anisopliae* fixados pela técnica de ponto crítico (500 x 4); **D** - Massa de conídios de *M. anisopliae* fixados pela técnica de dissecador (1000 x 4); **E** - Conídio de *M. anisopliae* fixado pela técnica de ponto crítico (20000 x); **F** - Conídio de *M. anisopliae* fixado pela técnica de dissecador (10000 x).

inoculação (96 horas) em *R. flavipes*. Estes dados aproximam-se dos observados neste estudo com relação aos níveis de mortalidade aos 3 dias (72 h).

Tabela 4.2 - Mortalidade acumulada corrigida (%) de *Cornitermes cumulans* para os tratamentos com diferentes concentrações de imidacloprid e média das notas de atividade de 0 a 10.

Trat.	Horas após o tratamento									
	6		12		24		48		72	
	Mort. ¹	Ativ. ²	Mort.	Ativ.	Mort.	Ativ.	Mort.	Ativ.	Mort.	Ativ.
Test.	-----	10,0	-----	10,0	-----	10,0	-----	10,0	-----	10,0
0,00001	0,00	10,0	0,00	9,6	0,00	9,2	2,67	8,4	12,00	8,0
0,0001	2,67	8,0	2,67	5,0	2,67	5,0	13,34	5,0	36,01	2,0
0,001	0,00	5,0	0,00	2,0	2,67	2,0	18,67	2,0	52,00	0,0
0,01	1,33	2,0	1,33	0,0	2,67	0,0	58,67	0,0	68,00	0,0
0,1	36,00	0,0	48,00	0,0	54,67	0,0	66,67	0,0	78,67	0,0

¹ Porcentagem de mortalidade acumulada corrigida;

² Notas de atividade 0 (sem atividade); 2 (pouco ativo); 5 (medianamente ativo); 8 (ativo) e 10 (muito ativo).

Os dados de atividade (0 a 10) mostraram que esta foi pouco alterada na menor concentração (0,00001%) até as 72 h após a inoculação, mediana para a concentração de 0,0001% até as 48 h, baixa para os tratamentos 0,001% e 0,01% a partir das 12 h e muito baixa para a maior concentração (0,1%) logo na primeira avaliação (Figura 4.9). As concentrações de 0,001 e 0,0001% de imidacloprid foram consideradas como o nível limiar requerido para induzir uma mudança significativa de atividade em *R. flavipes* (Boucias et al., 1996).

Figura 4.8 - Mortalidade acumulada (%) de *Cornitermes cumulans* para as diferentes concentrações de imidacloprid.

Figura 4.9 - Atividade de *Cornitermes cumulans* determinada pelo critério de notas de (0 a 10), para as diferentes concentrações de imidacloprid.

Considerando que a atividade de limpeza de *Cornitermes cumulans* deve ser inibida ou consideravelmente reduzida logo nas primeiras horas após a aplicação e prolongar-se por um maior tempo possível sem que ocorra mortalidade dos insetos, de modo a possibilitar o estabelecimento do patógeno até um nível em que possa competir e vencer os antagonistas presentes no hospedeiro, o tratamento ou a concentração ideal para o estudo da capacidade de limpeza deverá propiciar uma menor mortalidade com uma baixa atividade pelo maior tempo possível. Deste modo, as concentrações 0,01 e 0,001% foram escolhidas por propiciarem uma acentuada redução de atividade logo após a contaminação e não apresentarem mortalidade elevada até as 24 h.

B. Inibição da capacidade de limpeza de *C. cumulans*

A elevada capacidade de limpeza dos cupins pode ser observada comparando-se a quantidade de conídios depositados na sua superfície, logo após a aplicação (Figura 4.11 A, C e E) com a quantidade presente sobre os insetos 6 h após a aplicação (Figura 4.11 B, D e F).

A assepsia é efetuada pelos operários, entre si e nos soldados, provavelmente utilizando para esta função estruturas parecidas com escovas que se localizam na extremidade das maxilas (Figura 4.10 C, D, E e F). Entretanto, não foram observados conídios nestas “escovas” ou depositados em outras regiões do corpo dos cupins. Assim, duas hipóteses podem ser consideradas com relação aos locais onde os conídios, retirados da superfície do corpo, são eliminados ou desativados. A primeira é que os conídios sejam ingeridos e desativados no aparelho digestivo dos operários e a segunda que os conídios sejam depositados em algum substrato que não seja a região interna ou externa dos insetos. Com relação à primeira hipótese, vários operários foram dissecados e seu aparelho digestivo observado ao microscópio óptico, não se constatando a presença de conídios germinando. Alguns fungos entomopatogênicos são citados como invadindo o seu hospedeiro pelo trato digestivo (Alves, 1998). Entretanto, em muitos casos, fatores físicos e químicos previnem esta infecção pelo canal alimentar. Para *Leptinotarsa decemlineata* a rápida passagem do alimento pelo canal alimentar previne da infecção por

Figura 4.10 - Fotografias ao M.E.V. Locais de difícil limpeza e possíveis estruturas utilizadas para a limpeza “grooming”; **A** - Conídios de *B. bassiana* retidos entre as garras de operário - 6 h (1000 x 4); **B** - Conídios de *B. bassiana* retidos entre tarsômetros de operário - 6 h (500 x 4); **C** - Cabeça de operário mostrando estrutura possivelmente utilizada para limpeza (extremidade da maxila) (66 x 4); **D** - Idem anterior (100 x 4); **E** - Idem anterior (260 x 4); **F** - Estrutura de limpeza em detalhe (1000 x).

Figura 4.11 - Fotografias ao M.E.V. da capacidade de limpeza “grooming” de *Cornitermes cumulans* sem e com a ação de estressor; **A** - Conídios de *M. anisopliae* em cabeça de operário logo após a aplicação - 0 h (100 x 8); **B** - Idem após limpeza - 6 h (100 x 8); **C** - Tarso de soldado logo após a aplicação - 0 h (500 x); **D** - Garra de operário após limpeza - 6 h (575 x); **E** - Fêmur de operário logo após a aplicação (220 x 4); **F** - Fêmur de operário após limpeza - 6 h (200 x 4).

B. bassiana, podendo ser considerado como um fator físico de defesa (Allee et al., 1990, citados por Boucias et al. 1996). Além desta característica de rápida passagem do alimento pelo trato digestivo, alguns insetos têm uma microbiota com propriedades fungistáticas e/ou fungicidas, desativando os conídios ingeridos pelos insetos (Dillon & Charnley, 1991, citados por Boucias et al., 1996). Este é o caso de *Schistocerca gregaria*, que além da rápida passagem do alimento pelo trato digestivo possui bactérias que produzem substâncias fenólicas com ação antifúngica (Dillon & Charnley, 1986, 1988, citados por Boucias et al., 1996). Em outras espécies de insetos, como nas formigas australianas *Myrmecia nigriscapa*, secreções das glândulas metapleurais reduziram significativamente a germinação de *B. bassiana* e *Paecilomyces lilacinus*, mas não de *Metarhizium anisopliae* que mostrou reduzido crescimento micelial (Beattie et al., 1986). Nos estudos conduzidos por Boucias et al. (1996), não se constatou que *R. flavipes* seja suscetível à infecção pelo trato digestivo, uma vez que os insetos ao adquirirem os conídios *per os* não foram infectados pelo fungo. Estes autores observaram ainda que as comunidades de microrganismos isoladas do aparelho digestivo dos cupins mostraram elevada atividade fungistática para *B. bassiana* tendo a capacidade de inibir a germinação dos conídios. Constataram também que dos 381 conídios marcados com o flourocromo FITC e detectados no intestino, 48 h após inoculados por via oral, nenhum germinou. Para *C. cumulans* provavelmente ocorra o mesmo padrão de defesa se considerarmos o mecanismo de retirada dos conídios, idêntico ao relatado para *R. flavipes* e também por estes insetos desenvolverem suas colônias em locais de extremo potencial de contaminação como o solo. Por outro lado, Bao & Yendol (1971) constataram que a maioria dos conídios de *B. bassiana* perdeu a sua integridade no intestino de *R. flavipes*, mas que alguns foram observados germinando e penetrando o epitélio.

Em relação à segunda hipótese observou-se, para *R. flavipes*, que os conídios foram transferidos ou depositados no complexo de galerias e túneis e desativados pela atividade antifúngica do solo e da microbiota do intestino. Este comportamento de defesa pode também ocorrer para *C. cumulans*, por este inseto construir os seus ninhos utilizando a saliva e o conteúdo fecal, bem como isolar os insetos mortos utilizando o

mesmo material, o que foi constatado nos bioensaios.

Mesmo com o apurado comportamento de limpeza em alguns locais de difícil acesso como regiões intersegmentares nas antenas, palpos e principalmente tarsômeros e garras, nem sempre todos os conídios foram retirados. Isto foi constatado através da presença de conídios nestes locais, como pode ser observado na Figura 4.10 A e B, para os insetos que não foram expostos ao imidacloprid. Possivelmente em condições naturais, onde o número de conídios em contato com os insetos é centenas de vezes menor do que na aplicação direta em pulverização, poucos ou nenhum conídio escape deste comportamento de limpeza.

Ainda, com relação à assepsia, observou-se que os soldados, quando deixados sem operários, não tiveram a capacidade de se limpar, comprovando que esta tarefa é feita exclusivamente pelos operários, quando agrupados, não sendo possível para os operários, quando isolados, retirarem os conídios da sua cutícula. Este comportamento foi constatado para *R. flavipes* inoculado com *B. bassiana* onde os insetos não tratados com imidacloprid mas deixados individualizados não foram capazes de retirar os conídios da superfície do corpo. Também, em comparação com os cupins tratados, estes não mostraram alterações nas taxas de germinação às 24 h mostrando que a germinação não foi alterada pelo ação do imidacloprid (Boucias et al., 1996).

A inibição da atividade dos insetos através da utilização de um estressor mostra uma considerável redução mesmo nas mais baixas concentrações. Assim, para *M. anisopliae*, em contraste com as testemunhas, onde ocorreu a limpeza dos conídios nas primeiras 6 h após a aplicação (Figura 4.11 B, D e F), quando os insetos entraram em contato com o estressor, tanto na maior concentração (0,01%) (Figura 4.12 A e C) como na menor (0,001) (Figura 4.12 B e D) não foi observada a retirada dos conídios. Para o fungo *B. bassiana*, observou-se o mesmo comportamento. Os insetos da testemunha apresentaram uma grande quantidade de conídios sobre o seu corpo, logo após a aplicação (Figura 4.12 E e F). Entretanto, 6 h após a aplicação praticamente todos os conídios haviam sido retirados (Figura 4.13 A e B). A quantificação da capacidade de remoção dos conídios foi feita para *R. flavipes* inoculados com *B. bassiana* onde 72% foram removidos 2 h após aplicação e às 24 h praticamente nenhum conídio foi

Figura 4.12 - Fotografia ao M.E. V. da inibição da limpeza “grooming” de *Cornitermes cumulans*; **A** - *M. anisopliae* em garra de soldado isolado - 6 h (875 x); **B** - *M. anisopliae* em tibia de soldado onde ocorreu inibição de limpeza pelos operários (estressor) - 6 h (500 x); **C** - *M. anisopliae* em cabeça de soldado isolado - 24 h (70 x 8); **D** - *M. anisopliae* em cabeça de soldado onde ocorreu inibição de limpeza pelos operários (estressor) (100 x 8); **E** - *B. bassiana* em tarso e garra de operário - 0 h (700 x); **F** - Idem anterior em trasômeros (1700 x).

Figura 4.13 - Fotografia ao M.E. V. da inibição da capacidade de limpeza “grooming” de *Cornitermes cumulans*; **A** - Tarso e garra de operário sem ação de estressor - 6 horas (200 x 4); **B** - Cabeça de soldado sem a ação de estressor - 6 h (200 x 4); **C** - *B. bassiana* em fêmur de soldado - ação de estressor - 6 h (500 x 4); **D** - *B. bassiana* em garra de operário - ação de estressor - 6 h (600 x 4); **E** - *B. bassiana* em tarsômero de operário - ação de estressor - 12 h (500 x 2); **F** - *B. bassiana* em cabeça de soldado - ação de estressor - 24 h (725 x).

constatado sobre os insetos. A remoção foi maior na cabeça, tórax e nos tergitos dorsais e menor nos ventrais (Boucias et al., 1996). Por outro lado, quando sob a ação do estressor, a capacidade de limpeza foi drasticamente inibida como se observa na Figura 4.13 C e D para 6 h, E para 12 h e F para 24 h. Esta inibição foi também constatada para *R. flavipes* inoculados com *B. bassiana* e tratados com imidacloprid, nos quais não ocorreu redução no número de conídios retirados às 8 e 24 h (Boucias et al., 1996).

Ainda segundo Boucias et al. (1996), ficou constatado que a cutícula dos insetos tratados e não-tratados com imidacloprid não mostrou diferenças morfológicas. Amostras de hemolinfa não apresentaram alterações na resposta fagocítica dos cupins tratados e não-tratados com imidacloprid.

Assim, o imidacloprid consegue afetar imediatamente o comportamento social dos cupins e compromete as barreiras de resistência observadas nos não-tratados.

Comprovou-se que o estressor, limitando diretamente a atividade dos insetos e consequentemente a atividade de limpeza, tem um efeito sinérgico com o patógeno por possibilitar que este permaneça e germine em maiores quantidades sobre a cutícula do que quando aplicado sozinho. Estas observações levam a considerar a hipótese de que o fungo, quando aplicado com o estressor, num controle associado, possa ser utilizado em concentrações consideravelmente menores do que quando aplicado sozinho, diminuindo os custos do produto e do controle e aumentando a eficiência a campo. Este aspecto será estudado na fase seguinte deste trabalho.

4.4 Conclusões

Os ciclos biológicos de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em *C. cumulans* são semelhantes em todas as fases variando somente com relação ao início da conidiogênese que foi mais rápida para *B. bassiana*.

O método de fixação em ponto crítico (método dois) preserva as estruturas dos patógenos e as diferentes partes do corpo do inseto de forma mais adequada.

Os operários têm um eficiente mecanismo de limpeza superficial de conídios

através do lambimento.

O inseticida imidacloprid em concentrações subletais inibe este comportamento de limpeza.

5 CONTROLE ASSOCIADO DE COLÔNIAS DE *Cornitermes cumulans* UTILIZANDO *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* E ESTRESSORES.

5.1 Introdução

O controle do cupim de montículo *C. cumulans* tem sido realizado, basicamente, utilizando inseticidas químicos. Dentre esses pode-se citar os produtos clorados como os mais utilizados até a década de oitenta, quando foram proibidos (Vanetti, 1959; Amante, 1963). Posteriormente, os produtos organo fosforados, carbamatos e piretróides foram testados e utilizados no controle deste inseto (Furquim et al., 1968; Mariconi et al., 1971; Biondo et al., 1988; Mariconi et al., 1989; Mariconi et al., 1990; Wilcken, 1992). Outras moléculas inseticidas, desenvolvidas mais recentemente, são atualmente utilizadas no controle desta espécie de cupim. Desses produtos destacam-se o fipronil, utilizando-se 10 g por ninho do produto comercial granulado a 2%, com 100% de eficiência de controle e o imidacloprid, nas concentrações de 150 e 300 mg/litro/ninho do produto comercial a 70%, controlando 80 e 100% das colônias de *C. cumulans*, respectivamente (Mariconi et al., 1994).

Para contornar o problema de transporte de água nas áreas de difícil acesso, diversas formulações foram estudadas no controle de *C. cumulans*. Assim, iscas granuladas com diferentes princípios ativos foram empregadas (Nogueira et al., 1971; Mariconi et al., 1977). Também formulações como as pastilhas de fosfina apresentaram bons resultados no controle dos cupins de montículo (Perez et al., 1987; Melo Filho, 1996).

Métodos mecânicos de controle como a “broca cupinzeira” (Ávilla & Goulart, 1992; Ávila & Rumiatto, 1995a) e o “demolidor de cupinzeiros” (Ávila & Rumiatto, 1995b), todos equipamentos acoplados a tratores, apresentaram boa eficiência de controle.

No controle biológico desta espécie com entomopatógenos, os resultados mostram que ninhos pequenos (15 a 24 cm de diâmetro ao nível do solo) são controlados utilizando 2 a 5 g de conídios/cupinzeiro de *B. bassiana* ou *M. anisopliae* (Fernandes,

1991; Fernandes & Alves, 1991; Alves et al., 1995). Entretanto, para ninhos grandes (50 a 150 cm de diâmetro ao nível do solo), os resultados de controle são bastante variáveis, sendo que somente concentrações muito elevadas de conídios provocam um controle eficiente, porém economicamente inviável (Alves et al., 1995).

A elevada capacidade de assepsia dos cupins é um dos principais mecanismos de defesa contra entomopatógenos, como os fungos (Capítulo 2). Esta resistência comportamental pode ser quebrada com a utilização de substâncias químicas, como alguns inseticidas, que atuam sobre os indivíduos diminuindo a sua atividade e, conseqüentemente, a sua capacidade de limpeza. Assim, uma das estratégias para o aumento da eficiência de controle de colônias grandes de *C. cumulans* está relacionada com a utilização desta associação patógeno/estressor (Capítulo 2). Este estudo teve como objetivos realizar testes de campo visando comprovar a eficiência desta estratégia e determinar quais os níveis mínimos do estressor e do fungo que promovem um controle eficiente dos cupins, através de um efeito sinérgico a um custo ecologicamente e economicamente aceitável.

5.2 Material e métodos

Os testes de campo foram realizados em áreas de pastagens no município de Piracicaba-SP. Utilizaram-se em todos os ensaios ninhos grandes com uma média de 250 ± 50 cm de diâmetro ao nível do solo. Para a aplicação os ninhos foram perfurados, utilizando-se um bastão de ferro de modo a atingir a parte basal da região cartonada, por ser o local onde geralmente se localiza a rainha da colônia (Sanchez et. al., 1989). Este procedimento também foi realizado em todas as testemunhas, onde não se efetuou a aplicação do produto.

Cada ninho foi considerado uma repetição. De todos os ninhos foi retirada, antes da aplicação, uma pequena parte da calota superior para se certificar da presença dos cupins, bem como da espécie. As misturas dos diferentes componentes envolvendo estressores, conídios e calcene (inerte) foram feitas um dia antes da aplicação e mantidas em “freezer”.

Utilizou-se uma polvilhadeira manual de aplicação de formicida onde se instalou, na extremidade da mangueira, uma ponteira de aço inox de aproximadamente 40 cm de comprimento com a ponta chanfrada, aberta e com 4 séries de furos de 3 a 4 mm, espaçados de 2 a 2,5 cm até uma distância de aproximadamente 20 cm da extremidade (Figura 5.1 A). Este dispositivo possibilitou uma melhor distribuição do produto dentro do ninho e foi utilizado em todos os experimentos. Para a aplicação de pequenas quantidades de produto foi adaptado um dispositivo, tipo Venturi, constituído de um “T” de PVC de 1 polegada ligado à mangueira por dois redutores. O produto foi colocado no interior do dispositivo, através de um funil, tampando-se com uma rolha de borracha (Figura 5.1 B). Para evitar problemas de contaminação entre os tratamentos, foram empregadas várias polvilhadeiras. A aplicação dos diferentes tratamentos foi sempre da menor para a maior concentração.

Realizaram-se experimentos com o objetivo de testar o controle associado do fungo com inseticida. Utilizou-se o produto comercial Regent 800 WG na formulação grânulos dispersíveis em água, tendo como ingrediente ativo fipronil e o produto Gaucho 70 PM, formulação pó molhável, com o ingrediente ativo imidacloprid, nas misturas com os fungos e o inerte. Os inseticidas foram sempre misturados com os fungos e o inerte, na forma de pó (imidacloprid) ou grânulos (fipronil). As quantidades de inseticida foram sempre especificadas em miligramas dos produtos comerciais. O inerte utilizado foi o calcene, após constatar-se que o mesmo não afeta a viabilidade dos conídios.

5.2.1 Experimentos de controle associado

Foram realizados quatro experimentos de controle associado. No primeiro foi avaliada a eficiência de controle de colônias de *C. cumulans* utilizando conídios de *M. anisopliae*, isolado 1037, misturados ou não com os inseticidas fipronil, imidacloprid e o inerte (calcene).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 17 tratamentos (Tabela 5.1) e duas repetições por tratamento sendo uma observada aos 15 e outra aos 43 dias após a aplicação. Avaliou-se a porcentagem de mortalidade das colônias e a

porcentagem de conidiogênese sobre os cadáveres. Na avaliação da mortalidade considerou-se como ninho morto aquele sem nenhuma atividade ou sem nenhum inseto vivo. A avaliação da conidiogênese foi feita visualmente, quando da abertura do ninho, observando-se qual a porcentagem de insetos onde o patógeno esporulou. Foi também determinada a presença ou não de ninfas como um indicador do vigor dos ninhos.

Tabela 5.1 - Tratamentos utilizados no primeiro experimento visando o controle associado de *Cornitermes cumulans*, *Metarhizium anisopliae* e imidacloprid.

Tratamentos	Imidacloprid (mg p.c.)*	Fipronil (mg p.c.)	<i>M. anisopliae</i> (mg de conídios)	Inerte (g)
1	75	0	2000	6
2	150	0	1000	6
3	300	0	500	6
4	75	0	0	6
5	150	0	0	6
6	300	0	0	6
7	0	50	2000	6
8	0	100	1000	6
9	0	200	500	6
10	0	50	0	6
11	0	100	0	6
12	0	200	0	6
13	0	0	2000	6
14	0	0	1000	6
15	0	0	500	6
16	0	0	0	0
17	0	0	0	6

* miligramas do produto comercial.

No segundo experimento de controle associado, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com 13 tratamentos (Tabela 5.2) e duas repetições por tratamento sendo uma observada aos 15 e outra aos 30 dias após a aplicação. A associação do isolado 1037 de *M. anisopliae*, foi feita somente com o inseticida imidacloprid e o inerte.

Os parâmetros avaliados foram os mesmos descritos para o experimento anterior.

Tabela 5.2 - Tratamentos utilizados no segundo experimento visando o controle associado de *Cornitermes cumulans*, *Metarhizium anisopliae* e imidacloprid.

Tratamentos	Imidacloprid (mg p.c.)*	<i>M. anisopliae</i> (mg de conídios)	Inerte (g)
1	75	500	6
2	75	250	6
3	15	500	6
4	15	250	6
5	7,5	500	6
6	7,5	250	6
7	75	0	6
8	15	0	6
9	7,5	0	6
10	0	500	6
11	0	250	6
12	0	0	6
13	0	0	0

* miligramas de produto comercial

No terceiro experimento de controle associado, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 tratamentos e 4 repetições (Tabela 5.3). As observações foram feitas aos 14 e 46 dias após a aplicação. A associação do isolado 1037 de *M. anisopliae*, foi feita somente com o inseticida imidacloprid e o inerte.

Em cada avaliação foram abertos dois ninhos, observando-se os mesmos parâmetros descritos para o primeiro experimento de controle associado. Os dados relativos à porcentagem de mortalidade e conidiogênese foram transformados em raiz quadrada de $(x + 0,5)$ e a comparação das médias dos tratamentos feita pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para o quarto experimento adotou-se também o delineamento experimental inteiramente casualizado com 10 tratamentos e quatro repetições (Tabela 5.4). As avaliações foram feitas aos 14 e 35 dias após a aplicação. Utilizaram-se conídios de dois entomopatógenos, o isolado 1037 de *M. anisopliae* e o 447 de *B. bassiana*, em associação ou não com o imidacloprid, tendo-se adicionado o calcene como inerte.

Tabela 5.3 - Tratamentos utilizados no terceiro experimento visando o controle associado de *Cornitermes cumulans*, *Metarhizium anisopliae* e imidacloprid.

Tratamentos	Imidacloprid (mg p.c.)*	<i>M. anisopliae</i> (mg de conídios)	Inerte (g)
1	3,75	500	6
2	3,75	250	6
3	1,9	500	6
4	1,9	250	6
5	0	500	6
6	0	250	6
7	3,75	0	6
8	1,9	0	6
9	0	0	6
10	0	0	0

* miligramas de produto comercial

Tabela 5.4 - Tratamentos utilizados no quarto experimento visando o controle associado de *Cornitermes cumulans*, *Metarhizium anisopliae* e imidacloprid.

Tratamentos	Imidacloprid (mg p.c.)*	<i>M. anisopliae</i> ou <i>B. bassiana</i> (mg de conídios)	Inerte (g)
1	1,9	500 <i>M. anisopliae</i>	6
2	1,9	250 <i>M. anisopliae</i>	6
3	1,9	500 <i>B. bassiana</i>	6
4	1,9	250 <i>B. bassiana</i>	6
5	0	500 <i>B. bassiana</i>	6
6	0	250 <i>B. bassiana</i>	6
7	0	500 <i>M. anisopliae</i>	6
8	0	250 <i>M. anisopliae</i>	6
9	1,9	0	6
10	0	0	0

* miligramas de produto comercial

Em cada avaliação foram abertos dois ninhos, seguindo a mesma metodologia já descrita para o primeiro experimento de controle associado. Os dados relativos à porcentagem de mortalidade e conidiogênese foram transformados em raiz quadrada de $(x + 0,5)$ e a comparação das médias dos tratamentos feita pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Experimentos de controle associado

Os resultados do primeiro experimento de controle associado encontram-se na Tabela 5.5. Ocorreu elevada mortalidade (100%) em todos os tratamentos, independente da presença ou não do fungo, com exceção da testemunha (tratamento 17 e 16), onde foi aplicado somente o calcene (tratamento 16) e onde foi aplicado somente o fungo *M. anisopliae* nas três concentrações (tratamentos 13, 14 e 15) (Tabela 5.5). Em todas as avaliações onde as colônias não morreram observou-se a presença de ninfas evidenciando o vigor do ninho.

As porcentagens de conidiogênese foram irregulares para os tratamentos onde foi aplicado o patógeno com o imidacloprid (Tabela 5.5 e Figura 5.2). O tratamento com a menor concentração de imidacloprid associado com a maior concentração de fungo (tratamento 1) e vice-versa (tratamento 3), apresentaram porcentagens médias de conidiogênese de 100%. Por outro lado, no tratamento com as concentrações intermediárias de imidacloprid e fungo (tratamento 2), ocorreu uma menor porcentagem de conidiogênese. Os insetos nos quais ocorreu conidiogênese ficaram com a superfície do corpo de coloração verde e completamente coberta por conídios (Figura 5.3 A). A maioria dos indivíduos morreu na região cartonada (Figura 5.3 B). Entretanto, insetos mortos foram também observados na camada mais externa do ninho (Figura 5.3 C).

Quando o imidacloprid foi empregado sem o patógeno observou-se, na avaliação aos 43 dias, para as duas menores concentrações do inseticida (tratamentos 4 e 5), uma

Figura 5.1 - A - Polvilhadeira utilizada nos experimentos (ponteira de aço assinalada)
B - Dispositivo, tipo Venturi, para aplicação de pequenas quantidades das misturas.

Figura 5.2 - Médias da mortalidade (%) de colônias de *Cornitermes cumulans* e conidiogênese (%) observadas em todos os tratamentos de controle utilizando imidacloprid com e sem conídios de *Metarhizium anisopliae* nos primeiros três experimentos.

Tabela 5.5 - Mortalidade *Cornitermes cumulans*, atividade de ninfas e conidiogênese de *Metarhizium anisopliae* nos tratamentos de controle associado.

n ^o	Componentes dos tratamentos				Porcentagem de mortalidade ⁴			Conidiogênese (%) ⁴			Ninfas ⁵	
	Tratam.		Imidacloprid.		Fipronil		M. a.		Calcene		Dias após a aplicação	
	mg ¹	mg ¹	g ²	g ²	g ²	g ²	15 ³	43 ³	Média	15 ³	43 ³	43 ³
1	75	0	2	6	100	100	100	100	100	100	100	-
2	150	0	1	6	100	100	100	100	100	50	60	-
3	300	0	0,5	6	100	100	100	100	100	100	100	-
4	75	0	0	6	100	100	100	100	100	0	50	-
5	150	0	0	6	100	100	100	100	100	0	50	-
6	300	0	0	6	100	100	100	100	100	0	0	-
7	0	50	2	6	100	100	100	100	100	0	0	-
8	0	100	1	6	100	100	100	100	100	50	0	-
9	0	200	0,5	6	100	100	100	100	100	10	50	-
10	0	50	0	6	100	100	100	100	100	0	0	-
11	0	100	0	6	100	100	100	100	100	0	0	-
12	0	200	0	6	100	100	100	100	100	0	0	-
13	0	0	2	6	0	0	0	0	0	0	0	+
14	0	0	1	6	0	0	0	0	0	0	0	+
15	0	0	0,5	6	0	0	0	0	0	0	0	+
16	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	+
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+

¹ (miligramas do p.c.); ² gramas; ³ um ninho por avaliação; ⁴ de 0 a 100%; ⁵ (+) com ninfas, (-) sem.

Figura 5.3 - **A** - Soldados e operários de *Cornitermes cumulans* onde ocorreu conidiogênese de *Metarhizium anisopliae*; **B** - Região cartonada do ninho com insetos mortos pelo patógeno; **C** - Região mais externa do ninho com insetos mortos pelo patógeno; **D** - Alado de *Cornitermes cumulans* apresentando elevada conidiogênese do patógeno.

porcentagem média de conidiogênese de aproximadamente 25% (Tabela 5.5 e Figura 5.2). Em princípio, isso poderia ser à contaminação entre os tratamentos com e sem o patógeno, o que deve ser descartado por terem sido utilizados diferentes equipamentos para a aplicação. Assim, a hipótese mais provável é que o inseticida tenha atuado sobre a inibição da capacidade de defesa dos cupins em relação ao fungo *M. anisopliae* presente naturalmente no solo, com melhoria da germinação do patógeno ou em outra atividade fisiológica do mesmo. Esta hipótese é reforçada uma vez que a conidiogênese somente ocorreu nas menores concentrações, onde os insetos demoraram mais tempo para morrer possibilitando a penetração e colonização pelo patógeno. Para a maior concentração (tratamento 6) os insetos provavelmente morreram mais rapidamente impossibilitando o estabelecimento do fungo.

A associação do inseticida fipronil com o patógeno apresentou níveis de conidiogênese consideravelmente inferiores aos observados na mistura com imidacloprid (Tabela 5.5). A menor conidiogênese pode estar relacionada com a elevada toxicidade deste produto provocando uma grande mortalidade em um curto espaço de tempo, diminuindo a possibilidade de estabelecimento do patógeno. Também na aplicação de fipronil sem os conídios não se observaram insetos onde tenha ocorrido conidiogênese (tratamentos 10, 11 e 12). Assim, nos experimentos posteriores somente foi utilizado o imidacloprid como estressor, em associação com o patógeno.

Os conídios de *M. anisopliae* aplicados sem os inseticidas não provocaram a morte de nenhuma das colônias avaliadas ressaltando-se para ninhos grandes a ineficiência do patógeno, nas concentrações testadas.

Mesmo ocorrendo elevada conidiogênese na associação do fungo com imidacloprid, observaram-se níveis de 100% de mortalidade das colônias quando foi utilizado somente o inseticida. Este aspecto evidenciou que estas concentrações de imidacloprid foram ainda elevadas, não caracterizando a ação sinérgica do patógeno em associação com o inseticida. Assim, as concentrações de fungo e estressor foram diminuídas de modo a se obterem melhorias quanto aos custos de controle e às vantagens da utilização do controle microbiano. Deste modo, no experimento seguinte, testou-se o efeito de menores concentrações do fungo e do estressor (imidacloprid) de modo a se

determinarem níveis economicamente e ecologicamente mais aceitáveis.

Os resultados referentes ao segundo experimento de controle associado encontram-se na Tabela 5.6. Em todos os tratamentos onde se utilizou o inseticida em associação ou não com o fungo ocorreram mortalidades de 100% (Figura 5.2). Em todas as avaliações, onde as colônias não morreram, observou-se a presença de ninfas evidenciando o vigor do ninho.

Na utilização do fungo sem o inseticida não foi constatada mortalidade e conidiogênese demonstrando que o patógeno, nas concentrações aplicadas, não tem condições de colonizar o ninho. A conidiogênese, nos tratamentos onde foi utilizada a mistura, apresentou-se bastante variável sendo a maior média (100%) para 7,5 mg de imidacloprid mais 250 mg de conídios do patógeno (tratamento 6) e a menor para a concentração de 75 mg de imidacloprid mais 500 mg de conídios a qual ocorreu no tratamento 1 (Tabela 5.6 e Figura 5.2). Pelos dados da primeira avaliação (15 dias), observa-se que as concentrações de 15 e 7,5 mg de imidacloprid nas duas misturas com *M. anisopliae* (tratamentos 3, 4, 5 e 6) provocaram níveis de conidiogênese semelhantes entre si e iguais a 100%. Já nos tratamentos 1 e 2, onde se utilizaram maiores concentrações de imidacloprid, a conidiogênese foi menor atingindo 20 e 50%, respectivamente. Quando somente o inseticida foi aplicado (tratamentos 7, 8 e 9), não se constatou a conidiogênese sobre os insetos.

A porcentagem de controle e de conidiogênese dos insetos dentro dos ninhos pode ser afetada por diferentes fatores, influenciando os resultados das avaliações. Estes estão relacionados com o vigor do ninho, que por sua vez é determinado pela sua idade (capacidade de postura da rainha), pelo número de indivíduos de cada uma das castas, época do ano e pela pressão de predação, principalmente por formigas. Quando os ninhos possuem grande número de alados e pré-alados, aguardando a revoada, a conidiogênese é maior sobre esta casta, possivelmente por apresentar maior quantidade de nutrientes, possibilitando o desenvolvimento mais vigoroso do patógeno (Figura 5.3 D). Também, num grande número de ninhos, foram observadas formigas habitando partes do montículo. Estas provavelmente, exercem uma pressão de predação constante sobre a colônia de cupins, enfraquecendo-a. Esta predação já foi referida como

Tabela 5.6 - Mortalidade *Cornitermes cumulans*, atividade de ninfas e conidiogênese de *Metarhizium anisopliae* nos tratamentos de controle associado.

Tratam. nº	Componentes dos tratamentos			Porcentagem de mortalidade ⁵			Conidiogênese (%) ⁵			Ninfas ⁶		
	Imidacloprid	M. a.	Calcene	Dias após a aplicação			Dias após a aplicação			Dias após a aplicação		
	mg ¹	mg ²	g ³	15 ⁴	30 ⁴	Média	15 ⁴	30 ⁴	Média	15 ⁴	30 ⁴	Média
1	75	500	6	100	100	100	20	80	50	-	-	-
2	75	250	6	100	100	100	50	100	75	-	-	-
3	15	500	6	100	100	100	100	80	90	-	-	-
4	15	250	6	100	100	100	100	50	75	-	-	-
5	7,5	500	6	100	100	100	100	10	55	-	-	-
6	7,5	250	6	100	100	100	100	100	100	-	-	-
7	75	0	6	100	100	100	0	0	0	-	-	-
8	15	0	6	100	100	100	0	0	0	-	-	-
9	7,5	0	6	100	100	100	0	0	0	-	-	-
10	0	500	6	0	0	0	0	0	0	+	+	+
11	0	250	6	0	0	0	0	0	0	+	+	+
12	0	0	6	0	0	0	0	0	0	+	+	+
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+

¹ (miligramas do p.c.); ² *M. anisopliae* (miligramas de conídios); ³ (gramas); ⁴ um ninho por avaliação; ⁵ de 0 a 100%; ⁶ (+) com ninfas, (-) sem ninfas.

sendo um importante fator de controle destes insetos em ninhos tratados com entomopatógenos (Alves et al., 1995). A avaliação da porcentagem de conidiogênese após os 15 a 20 dias pode não representar o que realmente ocorreu no ninho, uma vez que os insetos atacados pelo patógeno morrem em 3 a 4 dias e a conidiogênese inicia-se depois de 5 dias da aplicação do patógeno (Capítulo 2). Assim, nas avaliações mais tardias, muitos dos insetos mortos pelo patógeno podem não mais apresentar o corpo coberto pelos conídios ou podem ter sido eliminados por predadores. Foi constatado, em alguns ninhos, grande quantidade de ácaros, provavelmente se alimentando dos cadáveres dos cupins. Também Fernandes (1991) citou que os ninhos tratados no verão mostraram uma maior contaminação por organismos saprofíticos (ácaros, fungos e bactérias), que se desenvolveram mais facilmente sobre os cupins mortos diminuindo a conidiogênese em relação aos ninhos tratados no inverno.

Por terem ocorrido níveis de mortalidade de 100% quando o inseticida foi aplicado sem o fungo, pode-se concluir que as misturas testadas neste experimento não causaram um efeito sinérgico. Por essa razão, novo experimento foi instalado com menores concentrações do estressor mantendo-se, entretanto, as mesmas concentrações de conídios.

Os resultados referentes ao terceiro experimento de controle associado encontram-se na Tabela 5.7. Os tratamentos 1, 2, 3 e 4, onde se utilizaram conídios de *M. anisopliae* em associação com imidacloprid, controlaram de forma eficiente os cupins com 75%, 100%, 100% e 100% de mortalidade respectivamente, não sendo observada diferença entre esses índices de mortalidade (Tabela 5.7 e Figura 5.2). Como nos experimentos anteriores, nas colônias que não morreram, observou-se a atividade de ninfas. No primeiro tratamento, num dos ninhos avaliados aos 14 dias, ocorreu uma diminuição na atividade, apesar de não ter sido eliminada a colônia. Isto pode ter ocorrido por erro experimental, quando da aplicação ou na elaboração da formulação do produto. Por outro lado, as duas concentrações de imidacloprid aplicadas sem o patógeno não controlaram as colônias de cupins, com exceção da maior concentração (tratamento 7) onde o controle ocorreu em uma das repetições avaliadas aos 46 dias.

Tabela 5.7 - Mortalidade *Cornitermes cumulans*, atividade de ninfas e conidiogênese de *Metarhizium anisopliae* nos tratamentos de controle associado.

n ^o	Componentes dos tratamentos			Porcentagem de mortalidade ⁵		Conidiogênese (%) ⁵			Ninfas ⁶	
	Tratam.	Imidacloprid	M. a. ²	Calcene ³	g ³	Dias após a aplicação		Média	Dias após a aplicação	
						14 ⁴	46 ⁴		14 ⁴	46 ⁴
1	3,75	500	6	50	100	75 ab*	100	75,50 b*	+	-
2	3,75	250	6	100	100	100 a	100	11,25 bc	-	-
3	1,9	500	6	100	100	100 a	100	23,75 b	-	-
4	1,9	250	6	100	100	100 a	100	75,00 a	-	-
5	0	500	6	0	0	0 c	0	0,00 c	++	++
6	0	250	6	50	0	25 bc	0	0,00 c	-	+
7	3,75	0	6	0	50	25 bc	0	0,00 c	++	-
8	1,9	0	6	0	0	0 c	0	0,00 c	++	++
9	0	0	6	0	----	0 c	0	0,00 c	++	----
10	0	0	0	0	0	0 c	0	0,00 c	++	----

¹ (miligramas do p.c.); ² *M. anisopliae* (miligramas de conídios); ³ (gramas); ⁴ dois ninhos por avaliação; ⁵ de 0 a 100%; ⁶ (+) com ninfas, (-) sem ninfas.

* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade; ---- parcela perdida.

Entretanto, todos os tratamentos de controle associado diferiram daqueles onde se utilizou somente o estressor ou o patógeno. Também, com exceção do tratamento 6, no qual ocorreu a morte de uma colônia, sem conidiogênese, o fungo isento do estressor não controlou a colônia. Deste modo, com os resultados deste experimento pode-se afirmar que as concentrações de imidacloprid testadas somente provocaram a morte das colônias quando associadas com o patógeno caracterizando o efeito sinérgico. Assim, as concentrações de Gaucho 70% PM entre 3,75 e 1,9 mg em associação com concentrações de conídios de *M. anisopliae*, isolado 1037, entre 500 e 250 mg, quando misturadas a 6 gramas de calcene, podem ser consideradas como ideais para o controle associado. Com essa mistura foi possível obter uma ação sinérgica otimizada manifestada pelo controle eficiente das colônias de *C. cumulans*.

Com relação à conidiogênese observou-se que esta foi relativamente baixa para a maioria dos tratamentos onde se utilizou a mistura, com exceção do tratamento 4 onde em 75% dos insetos o fungo produziu conídios. Convém destacar que, após a morte dos insetos, provavelmente ocorre uma alteração nas condições de temperatura e umidade internas da colônia, passando esta a ser mais influenciada pela temperatura e umidade externas ou do ambiente. Fernandes (1991) citou que, para *B. bassiana*, a conidiogênese foi maior, sobre os cadáveres, com o aumento da pluviosidade confirmando que a umidade externa, ou do ambiente, influencia a umidade no interior do ninho, principalmente após a morte da colônia. Também pela baixa concentração de inóculo utilizada, pode ter ocorrido um aumento no período de colonização do inseto, tornando o patógeno mais exposto à ação de competidores e antagonistas além das condições de temperatura e umidade.

Os dados do quarto experimento de controle associado encontram-se na Tabela 5.8. Observou-se, com relação à eficiência de controle e à conidiogênese, que o tratamento 1 (1,9 mg de imidacloprid mais 500 mg de conídios de *M. anisopliae*, isolado 1037) foi o melhor, controlando 100% das colônias com uma conidiogênese média de aproximadamente 70%. O tratamento 3, utilizando as mesmas concentrações, mas com conídios de *B. bassiana* causou um nível médio de controle de 50% e uma menor média de conidiogênese (22,5%). Os outros tratamentos sem a mistura (tratamentos 5, 6, 7, 8 e

Tabela 5.8 - Mortalidade *Cornitermes cumulans*, atividade de ninfas e conidiogênese de *Metarhizium anisopliae* nos tratamentos de controle associado.

Tratam.	Componentes dos tratamentos			Porcentagem de mortalidade			Conidiogênese (%) ⁵						Ninfas ⁶	
	Imidacloprid		Calcene ³	Dias após a aplicação		Média	Dias após a aplicação		Média	Dias após a aplicação		Média	Dias após a aplicação	
	mg ¹	mg		14 ⁴	35 ⁴		14 ⁴	35 ⁴		14 ⁴	35 ⁴		14 ⁴	35 ⁴
1	1,9	500 <i>M.a.</i>	6	100	100	100 a*	60	80	70	70,0	a*		--	--
2	1,9	250 <i>M.a.</i>	6	50	100	75 a	10	30	30	17,5	bc		- +	--
3	1,9	500 <i>B.b.</i>	6	50	50	50 ab	0	20	0	22,5	bc		+ -	+ -
4	1,9	250 <i>B.b.</i>	6	100	50	75 a	100	50	40	47,5	ab		--	- +
5	0	500 <i>B.b.</i>	6	0	0	0 b	0	0	0	0,0	c		++	++
6	0	250 <i>B.b.</i>	6	0	0	0 b	0	0	0	0,0	c		++	++
7	0	500 <i>M.a.</i>	6	0	0	0 b	0	0	0	0,0	c		++	++
8	0	250 <i>M.a.</i>	6	0	0	0 b	0	0	0	0,0	c		++	++
9	1,9	0	6	0	0	0 b	0	0	0	0,0	c		++	++
10	0	0	0	0	0	0 b	0	0	0	0,0	c		++	++

¹ (miligramas do p.c.); ² *M. anisopliae* ou *B. bassiana* (miligramas de conídios); ³ (gramas); ⁴ dois ninhos por avaliação; ⁵ de 0 a 100%; ⁶ (+) com ninfas, (-)sem ninfas.

* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

9) não controlaram os ninhos e foram significativamente inferiores aos tratamentos de controle associado, com exceção do tratamento 3 onde a mortalidade não diferiu estatisticamente. Com relação às menores concentrações de conídios (tratamentos 2 e 4), tanto para *M. anisopliae* como para *B. bassiana* os níveis de eficiência de controle foram similares (75%) ocorrendo, entretanto, uma maior média de conidiogênese quando se utilizou *B. bassiana* (47,5%).

Estes resultados caracterizam de forma bastante evidente que as concentrações do patógeno e do estressor onde o sinergismo mostrou-se mais eficiente, no controle de *C. cumulans*, foram 500 mg de conídios de *M. anisopliae* (isolado 1037) e 1,9 mg de imidacloprid.

Uma análise conjunta dos resultados observados nos três experimentos onde se utilizou o inseticida imidacloprid com e sem o patógeno mostrou que entre as concentrações de 300 e 7,5 mg deste produto, aplicado juntamente com o inerte calcene, obteve-se um controle de 100 % dos ninhos de *C. cumulans* (Figura 5.2). Desse modo, uma redução de 40 vezes na máxima concentração recomendada para o controle de ninhos de *C. cumulans*, mostrou-se ainda efetiva. Quando em associação com os conídios de *M. anisopliae* a eficiência de controle foi de 100 % até à concentração de 1,9 mg de imidacloprid (Figura 5.2) obtendo-se uma redução de aproximadamente 157 vezes na maior concentração de imidacloprid recomendada. Para as concentrações de conídios ocorreu uma redução de 8 vezes, de 2 g para 250 mg, quando aplicados juntamente com o estressor. Portanto, o custo do controle foi reduzido significativamente com grandes benefícios ecológicos pelo emprego de reduzidas quantidades de inseticida.

Os resultados obtidos no capítulo 2 confirmaram, a campo, que os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana*, quando utilizados no controle associado com imidacloprid em concentrações subletais provocam elevadas mortalidades das colônias destes insetos através de uma ação sinérgica em que o estressor atua indiretamente, inibindo a capacidade de limpeza do inseto, possibilitando que menores concentrações de conídios dos referidos patógenos possam causar elevada mortalidade. Assim, a associação patógeno/estressor mostrou-se como alternativa para o aumento da eficiência de controle de ninhos grandes de *C. cumulans*. Entretanto, este estudo foi

exploratório, para que se pudesse delimitar as faixas de otimização do sinergismo, havendo a necessidade de novos testes a campo para a confirmação e ajuste dos resultados aqui obtidos. Estes ajustes estão relacionados com as concentrações e formulações das misturas, de modo a se atingirem resultados mais seguros e que diminuam as margens de erro a níveis aceitáveis. Também testes relativos ao controle de outras espécies de cupins de montículo são importantes, para que esta estratégia possa ser utilizada aumentando os benefícios ecológicos e econômicos do emprego de baixas concentrações de inseticidas e do fungo.

5.3.2 Comparação de custos dos diferentes produtos utilizados no controle

Considerando que o custo de fabricante do produto comercial Gaucho 70% PM é de US\$ 241,22 por quilograma e que a concentração recomendada para o controle de colônias de *C. cumulans* é de 20 a 30 gramas do produto comercial por 100 litros de água ou de 200 mg a 300 mg/litro/ninho tem-se o custo do imidacloprid por ninho variando de US\$ 0,05 a 0,07. Para o inerte o preço de um quilograma é de R\$ 0,34 sendo o custo de 6 gramas, quantidade usada por ninho, igual a R\$ 0,0020 ou US\$ 0,0018 (R\$ 1,11 por US\$ 1). Os conídios de *M. anisopliae* ou *B. bassiana* podem ser comercializados a US\$ 50 por quilograma o que dá um custo de R\$ 0,0125 por 250 miligramas e de US\$ 0,025 por 500 miligramas.

Considerando, que para o controle de um ninho se utilizam, 1,9 mg de Gaucho 70% PM a um custo de US\$ 0,00046 mais 6 gramas de calcene a US\$ 0,0018 mais 250 mg a US\$ 0,0125 ou 500 mg de conídios a US\$ 0,025, o custo de controle utilizando a estratégia de controle associado pode variar de aproximadamente US\$ 0,015 a US\$ 0,027 por ninho. Estes valores referem-se aos custos do produto não considerando mão-de-obra e transporte.

Fernandes (1991) citou o custo de controle, considerando a aplicação de 2 gramas de conídios de *M. anisopliae* por ninho, igual a US\$ 0,044. Entretanto, este autor considerou um quilograma de conídios a aproximadamente US\$ 22, preço inferior ao utilizado neste estudo que foi de US\$ 50 por quilograma. Mesmo assim o controle

associado foi 1,6 vezes mais econômico do que o obtido por Fernandes (1991).

Na comparação com o custo de controle com produtos inseticidas como o imidacloprid e o fipronil, o custo por ninho deste produtos é de US\$ 0,05 e 0,21, respectivamente. Este é 7,7 vezes mais caro para fipronil e 1,8 vezes mais caro para imidacloprid, quando comparado com o controle associado utilizando 500 mg de conídios de *M. anisopliae*. É importante salientar que além dos benefícios econômicos o controle associado tem como principal vantagem os aspectos ecológicos pela redução das concentrações de inseticida.

5.4 - Conclusões

- Ocorre uma ação sinérgica entre os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana* quando aplicados em associação com o estressor imidacloprid em concentrações subletais.

- Esta ação sinérgica é otimizada para as concentrações de 500 mg de conídios dos dois patógenos e 1,9 mg do produto comercial Gaucho 70 PM misturados a 6 gramas do inerte calcene.

- A ação sinérgica do fungo e do estressor permitem reduzir as concentrações de conídios em até 8 vezes e as de inseticida em até 157 vezes.

- O controle associado tem benefícios econômicos e ecológicos devendo ser utilizado como uma alternativa importante na eliminação das colônias de *C. cumulans*.

6 CONCLUSÕES GERAIS

- O isolado 1037 de *M. anisopliae* é o mais virulento a *C. cumulans*.
- O isolado 447 é o mais virulento dos isolados de *B. bassiana* e o segundo melhor entre todos os isolados.
- O isolado 1037 de *M. anisopliae* deve ser utilizado no controle de colônias de *C. cumulans* a campo.
- Os ciclos biológicos de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em *C. cumulans* são semelhantes nas fases de adesão, germinação, penetração, colonização e extrusão variando somente quanto ao início da conidiogênese que foi mais rápida para *B. bassiana*.
- O método de fixação em ponto crítico preserva as estruturas dos patógenos e as diferentes partes do corpo do inseto de forma mais adequada devendo ser utilizado em estudos onde se pretenda fotografar ou observar detalhes dos patógenos e dos insetos.
- Os operários têm um eficiente mecanismo de limpeza superficial, através do lambimento retirando, nas primeiras horas após a aplicação, praticamente todos os conídios da superfície dos soldados e de outros operários.
- O inseticida imidacloprid, quando utilizado em concentrações subletais, inibe o comportamento de limpeza, possibilitando que um maior número de conídios germine e penetre os insetos.
- O controle associado, utilizando conídios e imidacloprid como estressor, é eficiente para os ninhos grandes com níveis de controle acima de 80%.

- Ocorre uma ação sinérgica entre os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana* quando aplicados em associação com o estressor imidacloprid em concentrações subletais.
- Esta ação sinérgica é otimizada para as concentrações de 500 mg de conídios dos dois patógenos e 1,9 mg do produto comercial Gaucho 70 PM misturados a 6 gramas do inerte calcene.
- A ação sinérgica do fungo e do estressor (imidacloprid) permitem reduzir as concentrações de conídios em até 8 vezes e as de inseticida em até 157 vezes.
- O controle associado apresenta benefícios econômicos e ecológicos podendo ser utilizado como uma alternativa importante na eliminação das colônias de *C. cumulans*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBINK, J. The biochemistry of imidacloprid. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**, v. 44, n.2, p.183-195, 1991.
- ALMEIDA, J.E.M. Avaliação de fungos entomopatogênicos visando o controle do cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858) (Isoptera, Rhinotermitidae). Piracicaba, 1994. 105 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- ALMEIDA, J.E.M ; ALVES, S.B. Mortalidade de *Heterotermes tenuis* (Hagen) atraídos por armadilhas com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e imidacloprid. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.25, n.3, p. 507-512, 1996.
- ALTSON, R.A. A fungus parasitic on *Coptotermes curvignathus*, Holmgr. **Nature**, v.160, p. 120, July 1947.
- ALVES, S.B. **Controle Microbiano dos Insetos**. São Paulo: Manole, 1986. cap. 6, p. 72-126: Fungos entomopatogênicos.
- ALVES, S.B. **Controle Microbiano dos Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 11: Fungos entomopatogênicos (no prelo).
- ALVES, S.B. ; PEREIRA, R.M. Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em bandejas. **Ecossistema**, v.14, p.188-92, 1989.
- ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO JUNIOR., A. et al. Uso de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* no controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) em pastagens. **Ecossistema**, v.20, p. 50-7, out. 1995.

- ALVES, S.B.; ALVES, L.F.A.; LOPES, R.B. et al. Isolado 1037 de *Metarhizium anisopliae* promissor para o controle microbiano de insetos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., Salvador, 1997. **Resumos**. Salvador: 1997. p. 139.
- AMANTE, E. Ensaio de campo para controlar o cupim de montículo *Cornitermes cumulans* (Kolar, 1832) (Isoptera, Termitidae). **Divulgação Agrônômica**. v.9, p. 30-33, 1963.
- ARAUJO, R. L. Termites of the Neotropical Region. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F.M. (Ed.). **Biology of Termites**. New York: Academic Press, 1970. v. 2, p. 525-576.
- ARAUJO, R. L. **Catálogo dos isópteros do Novo Mundo**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1977. 92p.
- ÁVILLA, C. J. ; GOULART, J. A. Broca-cupinzeira. Dourados: Embrapa, UEPAE de Dourados, (Embrapa, UEPAE de Dourados **Comunicado Técnico n. 49**), 1992. 5 p.
- ÁVILA, C.J.; RUMIATTO, M. Rendimento operacional do conjunto “demolidor de cupinzeiros” mais trator na destruição de montículos de *Cornitermes cumulans* (Kollar). In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE INSETOS DE SOLO, 5., Dourados, 1995. **Ata e Resumos**. Dourados: EMBRAPA, CPAO, 1995a. p. 71.
- ÁVILA, C.J.; RUMIATTO, M. Controle mecânico do cupim de montículo, *Cornitermes cumulans* (Kollar), com o implemento “demolidor de cupinzeiros”. In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE INSETOS DE SOLO, 5., Dourados, 1995. **Ata e Resumos**. Dourados: EMBRAPA, CPAO, 1995b. p. 70.

- BAO, L.; YENDOL, W.G. Infection of the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Kollar) with the fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. **Entomophaga**, v. 16, n.3, p. 343-352, 1971.
- BEATTIE, A.J.; TURNBULL, C.L.; HOUGH, T. Antibiotic production: a possible function for the metapleural glands of ants (Hymenoptera: Formicidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 79, n.3, p. 448 - 450, 1986.
- BERTI FILHO, E.; MARICONI, F.A.M.; WILKEN, C.F. et al. Cupins e Térmitas. In: BERTI FILHO, E. (Coord). **Manual de Pragas em Florestas**. Piracicaba: IPEF/SIF, 1993. v.3 , 56 p.
- BIDOCHKA, M.J.; KHACHATAURIANS, G.G. Growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on cuticular components from the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 59, p. 165 - 173, 1992.
- BIONDO, C.J.; GERALDI, F.I.; CLARI, A.I. et al. Cupim de monte *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832): combate experimental com formulações inseticidas líquidas. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz"**, v.45, n. 1, p. 91 -97, 1988.
- BLACKWELL, M. New records of termite-infesting fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.35, p. 101- 104, 1980.
- BLACKWELL, M.; KIMBROUGH, J.K. Ultrastructure of the termite-associated fungus *Laboulbeniopsis termitarius*. **Mycologia**, v.68, p. 541-550, 1976.

- BLACKWELL, M.; KIMBROUGH, J.K. *Hormiscioideus filamentosus* gen. et. sp. nov., a termite-infesting fungus. **Mycologia**, v.70, n.6, p. 1274-1280, 1978.
- BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C. Ultrastructural studies on the fungus *Nomuraea rileyi*, infecting the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.39, p. 338 - 345, 1982.
- BOUCIAS D.G.; PENDLAND, J.C.; LATGÉ, J.P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host cuticle. **Appl. Environm. Entomology**, v.54, p. 1795 - 1805, 1988.
- BOUCIAS, D.G.; MAZET, I.; PENDLAND, J.C. et al. Comparative analysis of the *in vivo* and *in vitro* metabolites produced by the entomopathogen *Beauveria bassiana*. **Canadian Journal of Botanic**, v.73, suppl. 1, p. 1092 - 1099, 1995.
- BOUCIAS, D.G.; STOKES, C.; STOREY, G. et al.. The effect of imidacloprid on the termite *Reticulitermes flavipes* and its interaction with the mycopathogen *Beauveria bassiana*. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**, v.49, n.2, p. 103-144, 1996.
- CANCELLO, E.M. Revisão de *Cornitermes* Wasmann (Isoptera, Termitidae, Nasutotermitinae). São Paulo, 1989. 136p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- CHAMPLIN, F.R.; CHEUNG, Y.K.; PEKRUL, S. et al. Virulence of *Beauveria bassiana* mutants for the pecan weevil. **Journal of Economic Entomology**, v. 74, n. 5, p. 617 - 621, 1981.
- COLLINS, N. M.; WOOD, T.G. Termites and Atmospheric Gas Production. **Science**, v. 224, p. 84- 85, 1984

- COPPEL, H.C.; LIANG, M.C. **Rhabditoid nematodes associated with subterranean termites**. Wisconsin: University of Wisconsin, Department of Forestry. 1987. 5 p. Forestry Research Notes, 274. Resumo em **CAB Abstracts on CD-Rom**, 1990-91.
- CZEPAK, C.; FERREIRA, E.; NOGUEIRA, S.B. Identificação de cupins rizófagos na cultura do arroz de sequeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n.8, p. 871 - 875, 1993.
- DANTHARANAVANA, W.; VITARANA, S.I. Control of the live-wood tea termite *Glyptotermes dilatatus* using *Heterorhabditis* sp. (Nemat.). **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.19, p.333-342, 1987.
- DISNEY, R.H.L. Two remarkable new species of scuttle-fly (Diptera: Phoridae) that parasitize termites (Isoptera) in Sulawesi. **Systematic Entomology**, v.11, p. 413 - 422, 1986.
- EPSKY, N.D.; CAPINERA, J.L. Efficacy of the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* against a subterranean termite, *Reticulitermes tibialis* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Economic Entomology**, v.81, n.5, p. 1313-1317, 1988.
- FAGGIN, L.E.B.; ALVES, S.B. Controle de *Heterotermes tenuis*, cupim subterrâneo de cana-de-açúcar com o menatóide *Steinernema carpopapsae*, produzido em lagartas de *Diatraea saccharalis*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6., Foz do Iguaçu, 1996. **Anais: Sessão de Posters**. Foz do Iguaçu: Embrapa/CNPSo, 1996. p. 232.
- FERNANDES, P. M. Controle microbiano de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) utilizando *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Piracicaba, 1991. 114p. Tese (Doutorado) - Escola

Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

FERNANDES, P.M.; ALVES, S.B. Controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em condições de campo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.20, n.1, p. 46-49, 1991.

FERNANDES, P.M.; ALVES, S.B. Preferência alimentar e danos de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) às plantas cultivadas em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.21, n.2, p.125-132, 1992a.

FERNANDES, P.M.; ALVES, S.B. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. para controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.21, n.3, p. 319-328, 1992b.

FERNANDES, P.M.; CZEPAK, C.; VELOSO, L.S. Manejo integrado de cupins de montículos em pastagens. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., Salvador, 1997. **Resumos**. Salvador: 1997. p. 296.

FOWLER, H.G. An epizootic iridovirus of Orthoptera (Gryllotalpidae: *Scapteriscus borellii*) and its pathogenicity to termites (Isoptera: *Cryptotermes*). **Revista de Microbiologia**, v.20, n.1, p. 115-120, Jan./Mar. 1989.

FURQUIM, M.R.; KAMIZONO, Y.; ANDRADE, S.C. et al. Combate experimental ao cupim *Cornitermes cunmulans* (Kolar). **O Solo**, v.60, p. 57-62, 1968.

GITONGA, N.; EILENBERG, J.; MANIANIA, N.K. et al. The potential of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as biological control agents of termites in Kenya. In: ANNUAL MEETING OF THE

SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 29., Córdoba, 1996.
Abstracts. Córdoba: Society for Invertebrate Pathology, 1996. p. 31.

GRASSÉ, P.P. Sur le nid et la biologie de *Cornitermes cumulans* (Kollar) termite brésilien. **Insectes Sociaux**, v.5, p. 189-200, 1958.

GUNNARSSON, S.G.S. Infection of *Schistocerca gregaria* by the fungus *Metarhizium anisopliae*: cellular reactions in the integument studied by Scanning Electron and Light Microscopy. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.52, n.1, p. 9-17, 1988.

HALL, D.W. Potential for microbial control of subterranean termites. In: ROSEN, D.; BENNETT, F.D.; CAPINERA, J.L. (Ed.). **Pest management in the subtropics: biological control - a Florida perspective.** Andover: Intercept, 1994. cap. 20, p. 381-393.

HANEL, H. A bioassay for measuring the virulence of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (fungi imperfect) against the termite *Nasutitermes exitiosus* (Hill) (Isoptera, Termitidae). **Zeitschrift fur Angewandte Entomologie**, v.92, n.1, p. 9-18, 1981.

HANEL, H. Selection of a fungus species, suitable for the biological control of the termite *Nasutitermes exitiosus* (Hill). **Zeitschrift fur Angewandte Entomologie**, v.94, p. 237-245, 1982a.

HANEL, H. The life cycle of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the termite *Nasutitermes exitiosus*. **Mycopathologia**, v.80, p. 137-145, 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**, v.73, n.2, p. 305-313, 1983.

- HEALE, J.B.; ISAAC, J.E.; CHANDLER, D. Prospects for stain improvement in entomopathogenic fungi. **Pesticide Science**, v. 26, p. 79-92, 1989.
- HUNT, D.W.A.; BORDEN, J.H.; RAHE, J.E. Nutrient-mediated germination of *Beauveria bassiana* conidia on the integument of the Dark beetle *Dnedroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.44, p. 304-314, 1984.
- KHALIL, M.A.K.; RASMUSSEN, R. A. Termites and methane. **Nature**, v. 302, p. 355, 1983.
- KHAN, S.R.; ALDRICH, H.C. The haustoria of *Termitaria snyderi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.25, n.2, p. 247-260, 1975.
- KIMBROUGH, J.W.; MORALES, M.I. A new species of *Dimeromyces* (Laboulbeniales) on subterranean termites. **Mycologia**, v.64, p. 388-393, 1972.
- 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**, v.40, n.1, p. 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**, v.40, n.1, p. 1-6, 1982.
- LAI, P.Y.; TAMASHIRO, M.; FUJII, J.K. Pathogenicity of six strains of entomogenous fungi to *Coptotermes formosanus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.39, n.1, p. 1-5, 1982.

- LAUMOND, C.; MAULÉON, H.; KERMARREC, A. New data on the host spectrum and the parasitism of the entomophagous nematode, *Neoaplectana carpocapsae*. **Entomophaga**, v.24, n.1, p. 13-27, 1979.
- LECUONA, R.; RIBA, G.; CASSIER, P. et al. Alterations of insect epicuticular hydrocarbons during infection with *Beauveria bassiana* or *Beauveria brongniartii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.58, n.1, p. 10 - 18, 1991.
- LEVIN, D.B.; ADACHI, D.; WILLIAMS, L.L et al. Host specificity and molecular characterization of the entomopoxvirus of the Lesser migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.62, n.3, p. 241-247, 1993.
- LOPES, R.B.; VIEIRA, S.A.; ALVES, S.B. et al. Infecção e conidiogênese de *Beauveria bassiana* e *Matarhizium anisopliae* em *Heterotermes tenuis*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6., Foz do Iguaçu, 1996. **Anais: Sessão de Posters**. Foz do Iguaçu: Embrapa; CNPSo, 1996. p. 362.
- MARICONI, F.A.M.; BARBIN, D.; MURAI, N.T. et al. Novos resultados de combate químico ao cupim de monte *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832). **O Biológico**, v.27, p. 317- 322, 1971.
- MARICONI, F.A.M.; FRANCO, J.F.; de PALMA, V. et al. Combate aos cupinzeiros de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) com granulados. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.6, n.1, p. 106 - 12, 1977.
- MARICONI, F.A.M.; GERALDI, F.I.; BIONDO, C.J. et al. Fention e cloropirifós no combate ao cupim de monte *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera, Termitidae). **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz"**, v.46, n. 2, p. 295-302, 1989.

- MARICONI, F.A.M.; HAMAMURA, R.; RANGEL, R.C. et al. Deltametrina e fention em ensaio contra o cupim de monte *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae). **Revista de Agricultura**, v. 65, n.3, p. 273-278, 1990.
- MARICONI, F.A.M.; GALAN, V.B.; ROCHA, M.T. et al. Ensaios de combate ao cupim de monte *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832) (Isoptera, Termitidae). **Sciencia Agricola**, v.51, n. 3, p. 505-508, 1994.
- MAULDIN, J.K.; BEAL, R.H. Entomogenous nematodes for control of subterranean termites, *Reticulitermes* spp. (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Economic Entomology**, v.82, n.6, p. 1638 - 1642, 1989.
- MELO FILHO, R.M. Controle químico do cupim *Nasutitermes* (Dudley, 1890) (Isoptera: Termitidae), em cana-de-açúcar, nos Estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte. Recife, 1996. 100p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- MILL, A. E. Faunal Studies on Termites (Isoptera) and Observations on their Ant Predators (Hymenoptera: Formicidae) in the Amazon Basin. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 26, n. 3/4, p. 253-260, 1982.
- MOOREHAUSE, E.R.; GILLESPIE, A.T.; CHARNLEY, A.T. Laboratory selection of *Metarhizium* spp. isolates for control of vine weevil larvae (*Otiorhynchus sulcatus*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.62, p. 15-21, 1993.
- NEVES, P.M.O.J.; VIEIRA, S.A.; LOPES, R.G. et al. Germinação, penetração e reprodução de *Beauveria bassiana* na broca do algodoeiro *Eutinobothrus brasiliensis* Hambleton, (Coleoptera: Curculionidae) observadas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6.,

- Foz do Iguaçu, 1996. **Anais: Sessão de Posters**. Foz do Iguaçu: Embrapa, CNPSo, 1996. p. 330.
- NGUYEN, K.B.; SMART JR, G.C. *Neosteinerinema longicurvicauda* n.gen., n.sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a parasite of the termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar). **Journal of Nematology**, v.26, n.2, p. 162 - 174, 1994.
- NOGUEIRA, S.B.; LIMA, J.O.G.; FREIRE, J.A.H. et al. Iscas granuladas no controle ao cupim de montículo *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832). **Seiva**, v. 31, p. 303 - 308, 1971.
- NOVARETTI, W.R.T.; CARDERÁN, J.O.; TOTINO, L.C. et al. Experimentos de controle de cupins em cana-de-açúcar. **Boletim Técnico Copersucar**, v.42, p. 12-24, 1988.
- PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; VILLA NOVA, N.A. et al. Determinação de temperatura e umidade relativa no interior de colônias de insetos sociais para estudos bioecológicos. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.3, n.1, p. 20-33, 1974.
- PENDLAND, J. C.; HUNG, S.Y.; BOUCIAS D.G. Evasion of host defense by in-vivo produced protoplast-like cells of the insect mycopathogen *Beauveria bassiana*. **Journal of Bacteriology**, v.175, p. 5962-5969, 1993.
- PEREZ FILHO, O.; SALVATORI, J.R.; SANCHEZ GUTIERREZ, G. et al. Observações sobre a estrutura do cupinzeiro de montículo visando o seu controle através da fumigação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 11., Campinas, 1987. **Resumos**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1987. p. 365.
- PIZZANO, M.A. Bioecologia e controle de cupins (Insecta: Isoptera) em áreas

agrícolas. **Álcool & Açúcar**, v.54, p. 57-65, 1990.

POPRAWSHI, T.J.; MARCHAL, M.; ROBERT, P.H. Comparative susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* and *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) early stages to five entomopathogenic hyphomycetes. **Environmental Entomology**, v.14, p. 247-253, 1985.

POPRAWSHI, T.J.; RIBA, G.; JONES, W.A. et al. Variation in isoesterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolate from *Sitona* weevils (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, v.17, p. 275-279, 1988.

QUATTLEBAUM, E.C. & CARNER, G.R. A technique for preparing *Beauveria* spp. for scanning electron microscopy. **Canadian Journal of Botany**, v. 58, p. 1700-1703, 1980.

RASMUSSEN, R. A.; KHALIL, M. A. K. Global production of methane by termites. **Nature**, v.301, p. 700-702, 1983.

RATH, A.C.; TIDBURY, C.A. Susceptibility of *Coptotermes acinaciformis* (Isoptera: Rhinotermitidae) and *Nasutitermes exitiosus* (Isoptera: Termitidae) to commercial isolates of *Metarhizium anisopliae*. **Sociobiology**, v.28, n. 8, p. 67-72, 1996.

ROBERTS, D.W.; KRASNOFF, S.B. Toxinas e enzimas de fungos entomopatogênicos In: ALVES, S. B. (Coord). **Controle Microbiano dos insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 32, (no prelo).

SAMUELS, K.D.Z.; HEALE, J.B.; LLEWELLYN, M. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* towards *Nilaparvata lugens*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.53, p.25-31, 1989.

- SANCHEZ, G.; PERES FILHO, O.; SALVADORI, J.R.; NAKANO, O. Estrutura e sistema de aeração do cupinzeiro de *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832) (Isoptera: Termitidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.24, n.8, p.941-943, 1989.
- SANNASI, A. Studies of an Insect Mycosis. I. Histopathology of the Integumente of the Infected Queen of the Mound-Building Termite *Odontotermes obesus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.13, p. 4-10, 1969.
- SMYTHE, R.V.; COPPEL, H.C. The susceptibility of *Reticulitermes flavipes* (Kollar) and other termite species to an experimental preparation of *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.7, p. 423-426, 1965.
- SMYTHE, R.V.; COPPEL, H.C. Pathogenicity of externally occurring fungi to *Reticulitermes flavipes*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.8, n.2, p. 266-267, 1968.
- SOARES, G.G.; MARCHAL, M.; FERRON, P. Susceptibility of *Otiiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) larvae to *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) at two different temperatures. **Environmental Entomology**, v.12, p. 1886-1890, 1983.
- St. LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Utilization of alkanes by entomopathogenic fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.52, p. 356-359, 1988.
- St. LEGER, R.J. Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by deuteromycete fungal pathogens. In: BECKAGE, N. E.; THOMPSON, S.N.; FEDERICI, B. A. (Eds.). **Parasites and pathogens of insects**, New York, Academic Press, 1993, v. 2,

p. 211- 229.

VALÉRIO, J.R. Ocorrência, danos e controle de cupins de montículo em pastagens. In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE INSETOS DE SOLO, 5., Dourados, 1995. **Ata e Resumos** . Dourados: EMBRAPA,CPAO, 1995. p. 33-36.

VALÉRIO, J.R.; SANTOS, A.V.; SOUSA, A.P. et al. Avaliação de alguns produtos inseticidas e da broca cupinzeira no controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) em pastagens. In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE INSETOS DE SOLO, 5., Dourados, 19995. **Ata e Resumos** . Dourados: EMBRAPA, CPAO, 1995. p. 69.

VANETTI, F. Combate ao cupim de montículo *Cornitermes cumulans* (Kollar). **Revista Ceres**, v.10, p. 437-43, 1959.

VEY, A.; FARGUES, J.; ROBERT, P. Histological and ultrastrutural studies of factors determining the specificity of pathotypes of the fungus *Metarhizium anisopliae* for the sacarabeid larvae. **Entomophaga**, v. 27, p. 387-397, 1982.

VILCINSKAS, A.L.; MATHA, V.; GOTZ, P. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. **Journal of Invertebrate Pathology**, (no prelo).

WARDELL, D.A. The African Termite Peaceful Coexistence or Total War?. **Commonwelth Forestry Review**, v.66, p. 77 -89, 1987.

WILCKEN, C.F. Danos de cupins subterrâneos *Cornitermes* sp. (Isoptera: Termitidae) em plantios de *Eucalyptus grandis* e controle com inseticidas do solo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.21, n.3, p. 329-338, 1992.

- YENDOL, W.G.; PASCHKE, J.D. Pathology of an *Entomophthora* infection in the eastern subterranean termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.7, p. 414-422, 1965.
- YENDOL, W.G.; ROSARIO, S.B. Laboratory evaluation of methods for inoculating termites with entomophthoraceous fungi. **Journal of Economic Entomology**, v.65, p. 1027-1029, 1972.
- ZECK, W. M. Synergism between a new insecticide and entomophagous fungi in the control of subterranean termites. In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY , 25., Heidelberg, 1992. **Abstracts**. Heidelberg: Society for Invertebrate Pathology, 1992. p. 304.
- ZIMMERMAN, P.R.; GREENBERG, J.P.; WANDIGA, S.O. et al. Termite: A potentially Source of Atmospheric Methane, Carbon Dioxid, and Molecular Hydrogem. **Science**, v. 218, p. 563-565, 1982.
- ZIMMERMAN, P.R.; GREENBERG, J. P. Termites and methane. **Nature**, v.302, p. 354, 1983.
- ZIMMERMAN, P.R.; GREENBERG, J. P.; DARLINGTON, J.P.E.C. Termitas and Atmospheric Gas Production. **Science**, v. 224, p. 86, 1984.
- ZOBERI, M.H. *Metarhizium anisopliae*, a fungal pathogen of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Mycologia**, v.87, n.3, p. 354-359, 1995.