**FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA DE *Beauveria bassiana* E
Metarhizium anisopliae NO CONTROLE DE *Heterotermes tenuis*
(ISOPTERA, RHINOTERMITIDAE)**

ALCIDES MOINO JUNIOR

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

Moino Junior, Alcides

Fatores que afetam a eficiência de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no controle de *Heterotermes tenuis* (Isoptera, Rhinotermitidae) / Alcides Moino Junior. - Piracicaba, 1998.

134 p. : il.

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

1. Controle biológico 2. Cupim 3. Entomologia agrícola 4. Fungo entomopatogênico 5. Inseto nocivo 6. Solo I. Título.

632.736

FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA DE *Beauveria bassiana* E *Metarhizium anisopliae* NO CONTROLE DE *Heterotermes tenuis* (ISOPTERA, RHINOTERMITIDAE)

ALCIDES MOINO JUNIOR

Aprovada em: 27.03.1998

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Sérgio Batista Alves

ESALQ/USP

Dr. Antônio Batista Filho

IB/SP

Prof. Dr. Paulo Sérgio Machado Botelho

CCA/UFSCar

Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati

ESALQ/USP

Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes

ESALQ/USP

Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES
Orientador

À minha esposa Andréa,
e aos meus pais Alcides e Alice,

DEDICO

“...não é o prêmio para os que melhor correm, nem a guerra para os que são mais fortes, nem o pão para os que são mais sábios, nem as riquezas para os que são mais doutos, nem a boa aceitação para os que são mais hábeis artífices:...tudo se faz por encontro, e por casualidade.”

Eclesiastes: 9, 11

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Batista Alves, pela orientação, confiança, amizade e respeito demonstrados durante nosso convívio, e pelas oportunidades que me foram dadas.

Aos professores do Departamento de Entomologia (ESALQ/USP) pelos valiosos conhecimentos por mim adquiridos no decorrer do curso de pós-graduação.

À bióloga Solange Aparecida Vieira, técnica do Laboratório de Patologia de Insetos (Departamento de Entomologia, ESALQ/USP) pelo auxílio na elaboração dos experimentos e pela amizade sincera.

A todos os colegas do curso de pós-graduação em Entomologia, pelos momentos de alegria dos quais sempre nos lembraremos, em especial aos amigos do Laboratório de Patologia de Insetos, José Eduardo M. de Almeida, Luis Francisco A. Alves, Pedro M. O. J. Neves, Rogério B. Lopes e Marco A. Tamai, pelo companheirismo, espírito de equipe e compreensão que sempre marcaram nosso trabalho.

À CAPES, pela bolsa de estudos que possibilitou a execução desse trabalho, e à FINEP, pelo financiamento do projeto “Controle Microbiano de Cupins”.

Ao Prof. Elliot W. Kitajima e à técnica Silvania Machado, do NAP-MEPA (ESALQ/USP), pela oportunidade e apoio na utilização do microscópio eletrônico de varredura.

Ao Prof. Dr. Roberto Manoel Pereira, da Universidade do Tennessee, EUA, pelo auxílio na elaboração do “Summary”.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 <i>Heterotermes tenuis</i> : ocorrência, prejuízos e controle.....	3
2.2 Controle microbiano de cupins.....	8
2.2.1 Perspectivas para o uso de microrganismos no controle de cupins.....	8
2.2.2 Fungos entomopatogênicos.....	11
2.2.3 Outros entomopatógenos.....	21
2.3 Estudos da relação patógeno/hospedeiro em doenças fúngicas de cupins.....	25
2.4 Interação entre entomopatógenos e produtos fitossanitários no controle de cupins.....	29
2.5 Relações parasíticas e antagonísticas entre microrganismos.....	31
3 EFEITO DA FLORA MICROBIANA DO SOLO SOBRE A EFICIÊNCIA DE <i>Beauveria bassiana</i> E <i>Metarhizium anisopliae</i> NO CONTROLE DE <i>Heterotermes tenuis</i>	37
3.1 Introdução.....	37
3.2 Material e métodos.....	37
3.3 Resultados e discussão.....	42
4 EFEITO ANTAGÔNICO DE <i>Trichoderma</i> sp. NO DESENVOLVIMENTO DE <i>Beauveria bassiana</i> E <i>Metarhizium anisopliae</i>	60
4.1 Introdução.....	60
4.2 Material e métodos.....	61

4.2.1 Efeito de <i>Trichoderma</i> sp. no crescimento vegetativo de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>in vitro</i>	61
4.2.2 Efeito de extrato de <i>Trichoderma</i> sp. sobre o desenvolvimento de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i>	62
4.3 Resultados e discussão.....	64
4.3.1 Efeito de <i>Trichoderma</i> sp. no crescimento vegetativo de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>in vitro</i>	64
4.3.2 Efeito de extrato de <i>Trichoderma</i> sp. sobre o desenvolvimento de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i>	75
5 CICLO DE DESENVOLVIMENTO DE <i>Beauveria bassiana</i> E <i>Metarhizium anisopliae</i> SOBRE <i>Heterotermes tenuis</i>	81
5.1 Introdução.....	81
5.2 Material e métodos.....	82
5.2.1 Observação do ciclo de desenvolvimento de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> em <i>Heterotermes tenuis</i> ao microscópio eletrônico de varredura. 1. Fixação em vapor de tetróxido de ósmio.....	82
5.2.2 Observação do ciclo de desenvolvimento de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> em <i>Heterotermes tenuis</i> ao microscópio eletrônico de varredura. 2. Fixação em glutaraldeído e OsO ₄ com tampão de sódio-cacodilato..	83
5.3 Resultados e discussão.....	84
5.3.1 Observação do ciclo de desenvolvimento de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> em <i>Heterotermes tenuis</i> ao microscópio eletrônico de varredura.....	84
5.3.2 Comparação das duas metodologias utilizadas para observação do ciclo dos entomopatógenos ao microscópio eletrônico de varredura.....	88
6 EFEITO DE IMIDACLOPRID E FIPRONIL SOBRE <i>Beauveria bassiana</i> E <i>Metarhizium anisopliae</i>	98
6.1 Introdução.....	98

	Página
6.2 Material e métodos.....	99
6.2.1 Avaliação do efeito fungitóxico de imidacloprid e fipronil sobre <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i>	99
6.2.2 Estudo do comportamento de limpeza de <i>Heterotermes tenuis</i> na eliminação do inóculo de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> sob o efeito de imidacloprid e fipronil.....	101
6.3 Resultados e discussão.....	102
6.3.1 Avaliação do efeito fungitóxico de imidacloprid e fipronil sobre <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i>	102
6.3.2 Estudo do comportamento de limpeza de <i>Heterotermes tenuis</i> na eliminação do inóculo de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> sob o efeito de imidacloprid e fipronil.....	109
7 CONCLUSÕES.....	116
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

LISTA DE FIGURAS

Página

1.1 Organograma de um projeto de controle microbiano de cupins (Alves et al., 1996).....	7
3.1 A) Isca de papelão corrugado (Termitrap®) para monitoramento e controle de <i>H. tenuis</i> ; B) Copo de poliestireno com solo e pedaço de papelão corrugado; C) Bandeja plástica para acondicionamento dos copos; D) Detalhe da conidiogênese de <i>B. bassiana</i> (isolado 634) em operário de <i>H. tenuis</i> no solo tratado.....	41
3.2 Equações de regressão para porcentagens médias de mortalidade confirmada de operários de <i>Heterotermes tenuis</i> 4 dias após a inoculação de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634) em solo arenoso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$).....	45
3.3 Porcentagens de mortalidade confirmada diária de <i>Heterotermes tenuis</i> após a inoculação de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634) em solo arenoso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$).....	46
3.4 Equações de regressão para porcentagens médias de mortalidade confirmada de operários de <i>Heterotermes tenuis</i> 4 dias após a inoculação de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634) em solo argiloso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$).....	48
3.5 Porcentagens de mortalidade confirmada diária de <i>Heterotermes tenuis</i> após a inoculação de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634) em solo argiloso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$).....	49

3.6 Equação de regressão para porcentagens médias de mortalidade confirmada de operários de <i>Heterotermes tenuis</i> 4 dias após a inoculação de <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) em solo arenoso (Temperatura = $25 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$).....	52
3.7 Porcentagens de mortalidade confirmada diária de <i>Heterotermes tenuis</i> após a inoculação de <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) em solo arenoso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$).....	53
3.8 Equações de regressão para porcentagens médias de mortalidade confirmada de operários de <i>Heterotermes tenuis</i> 4 dias após a inoculação de <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) em solo argiloso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$).....	55
3.9 Porcentagens de mortalidade confirmada diária de <i>Heterotermes tenuis</i> após a inoculação de <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) em solo argiloso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$).....	56
4.1 Diâmetro médio de colônias (mm) de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634), <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) e <i>Trichoderma</i> sp. inoculados simultaneamente em meio de cultura BDA, com avaliações 48 e 120 horas após a inoculação de <i>Trichoderma</i> sp.....	66
4.2 Diâmetro médio de colônias (mm) de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634), <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) e <i>Trichoderma</i> sp. inoculados com intervalo de 48 horas em meio de cultura BDA, com avaliações 48 e 120 horas após a inoculação de <i>Trichoderma</i> sp.....	68
4.3 Diâmetro médio de colônias (mm) de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634), <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) e <i>Trichoderma</i> sp. inoculados com intervalo de 120 horas em meio de cultura BDA, com avaliações 48 e 120 horas após a inoculação de <i>Trichoderma</i> sp.	70

4.4 Diâmetro médio de colônias (mm) de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634), <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) e <i>Trichoderma</i> sp. inoculados com intervalo de 168 horas em meio de cultura BDA, com avaliações 48 e 120 horas após a inoculação de <i>Trichoderma</i> sp.	72
4.5 Aspecto das colônias de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634), <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) e <i>Trichoderma</i> sp. inoculadas simultaneamente. Fotografia obtida 48 horas após a inoculação.....	73
5.1 Desenvolvimento de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634) sobre <i>Heterotermes tenuis</i> . Fotografias ao microscópio eletrônico de varredura. A) Conídios (1000 X, 0 horas após a inoculação). B) Conídios provocando halo na cutícula (1000 X, 6 horas). C) Conidio germinando (1000 X 2, 24 horas). D) Crescimento de vários tubos germinativos (1000 X, 24 horas). E) Penetração de tubo germinativo (1000 X 8, 72 horas).....	90
5.2 Desenvolvimento de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634) sobre <i>Heterotermes tenuis</i> . Fotografias ao microscópio eletrônico de varredura. A) Conidio germinando, com formação de halo na cutícula (1000 X 4, 72 horas). B) Entrelaçamento de tubos germinativos (200 X 4, 72 horas). C) Tubos germinativos, com presença de cristais de oxalato (500 X 4, 96 horas). D) Detalhe dos cristais de oxalato (10000 X, 96 horas). E) Extrusão de hifas em operário (50 X 8, 120 horas).....	91
5.3 Desenvolvimento de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634) sobre <i>Heterotermes tenuis</i> . Fotografias ao microscópio eletrônico de varredura. A) Início de conidiogênese em cabeça de operário, com degradação da cutícula (100 X 8, 120 horas). B, C, D e E) Detalhes da conidiogênese de <i>B. bassiana</i> (1000 X 4, 120 horas; 5000 X, 144 horas; 5000 X, 144 horas; 500 X 8, 144 horas, respectivamente).....	92

5.5 Desenvolvimento de <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) sobre <i>Heterotermes tenuis</i> . Fotografias ao microscópio eletrônico de varredura. A) Crescimento do tubo germinativo (3000 X, 24 horas). B) Extrusão do micélio em região intersegmentar (1000 X, 48 horas). C) Extrusão do micélio (2000 X, 72 horas). D) Formação de conidióforos (500 X 4, 72 horas). E) Micélio sobre a cabeça de operário (50 X 8, 72 horas).....	94
5.6 Desenvolvimento de <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) sobre <i>Heterotermes tenuis</i> . Fotografias ao microscópio eletrônico de varredura. A) Início da formação de conidióforos (1000 X 4, 96 horas). B) Extrusão do micélio em região intersegmentar (500 X 2, 96 horas). C) Extrusão do micélio com degradação da cutícula, na tibia (500 X 2, 96 horas). D) Formação de conidióforos (500 X 8, 96 horas). E) Detalhe da extrusão do micélio, na cabeça de operário (1000 X 8, 120 horas).....	95
5.7 Desenvolvimento de <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) sobre <i>Heterotermes tenuis</i> . Fotografias ao microscópio eletrônico de varredura. A) Início de conidiogênese (1000 X, 120 horas). B) Detalhe de cadeia de conídios (1000 X 2, 120 horas). C) Conidiogênese na cabeça de operário (200 X 8, 144 horas). D) Massa de conídios (2000 X, 144 horas). E) Conidiogênese no fêmur de operário (200 X 4, 144 horas).....	96
5.8 Duração, em horas, das diferentes fases do ciclo de infecção de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634) e <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) sobre operários do cupim subterrâneo <i>Heterotermes tenuis</i>	97
6.1 Índices relativos (Testemunha = 100) de diâmetro médio de colônias e número de conídios produzidos por colônia de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634) sob o efeito de imidacloprid e fipronil.....	104
6.2 Índices relativos (Testemunha = 100) de diâmetro médio de colônias e número de conídios produzidos por colônia de <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) sob o efeito de imidacloprid e fipronil.....	105

6.3 Alterações no comportamento de limpeza de <i>Heterotermes tenuis</i> inoculados com <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634). Fotografias ao microscópio eletrônico de varredura. A, B e C) Testemunha às 0, 6 e 12 horas após a inoculação (1000 X 4, 500 X 2 e 500 X 4, respectivamente). D e E) Imidacloprid (0,001%) às 6 e 12 horas (500 X 4 e 500 X 8, respectivamente). F) Imidacloprid (0,01%) às 6 horas (1000 X 2).....	113
6.4 Alterações no comportamento de limpeza de <i>Heterotermes tenuis</i> inoculados com <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634) (de A a E) e <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) (F). Fotografias ao microscópio eletrônico de varredura. A) Imidacloprid (0,01%), às 12 horas (2000 X). B e C) Fipronil (0,001%), às 6 e 12 horas (1500 X e 1000 X 2, respectivamente). D e E) Fipronil (0,01%), às 6 e 12 horas (1000 X 4 e 1000 X, respectivamente). F) Testemunha, 0 horas (1000 X 2).....	114
6.5 Alterações no comportamento de limpeza de <i>Heterotermes tenuis</i> inoculados com <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9). Fotografias ao microscópio eletrônico de varredura. A e B) Testemunha, às 6 e 12 horas (500 X 4 e 500 X, respectivamente). C e D) Imidacloprid (0,01%), às 6 e 12 horas (1000 X 2 e 500 X 4, respectivamente). E e F) Imidacloprid (0,001%), às 6 e 12 horas (1000 X e 500 X, respectivamente).....	115

LISTA DE TABELAS

Página

<p>3.1 Porcentagens médias de mortalidade confirmada de operários de <i>Heterotermes tenuis</i> 4 dias após a inoculação de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634) em solo arenoso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$).....</p>	44
<p>3.2 Porcentagens médias de mortalidade confirmada de operários de <i>Heterotermes tenuis</i> 4 dias após a inoculação de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634) em solo argiloso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$).....</p>	47
<p>3.3 Porcentagens médias de mortalidade confirmada de operários de <i>Heterotermes tenuis</i> 4 dias após a inoculação de <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) em solo arenoso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$).....</p>	51
<p>3.4 Porcentagens médias de mortalidade confirmada de operários de <i>Heterotermes tenuis</i> 4 dias após a inoculação de <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) em solo argiloso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$).....</p>	54
<p>4.1 Diâmetro médio de colônias (mm) de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634), <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) e <i>Trichoderma</i> sp. inoculados simultaneamente em meio de cultura BDA, com avaliações 48 e 120 horas após a inoculação de <i>Trichoderma</i> sp. (Temperatura = $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$; Fotofase = 12 horas).....</p>	65

4.3 Diâmetro médio de colônias (mm) de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634), <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) e <i>Trichoderma</i> sp. inoculados com intervalo de 120 horas em meio de cultura BDA, com avaliações 48 e 120 horas após a inoculação de <i>Trichoderma</i> sp. (Temperatura = $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$; Fotofase = 12 horas).....	69
4.4 Diâmetro médio de colônias (mm) de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634), <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) e <i>Trichoderma</i> sp. inoculados com intervalo de 168 horas em meio de cultura BDA, com avaliações 48 e 120 horas após a inoculação de <i>Trichoderma</i> sp. (Temperatura = $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$; Fotofase = 12 horas).....	71
4.5 Diâmetro médio de colônias e número médio de conídios produzidos por colônia de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634) na presença do extrato do fungo <i>Trichoderma</i> sp. (Temperatura = $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$; Fotofase = 12 horas).....	76
4.6 Diâmetro médio de colônias e número médio de conídios produzidos por colônia de <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) na presença do extrato do fungo <i>Trichoderma</i> sp. (Temperatura = $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$; Fotofase = 12 horas).....	77
6.1 Diâmetro médio de colônias e número médio de conídios produzidos por colônia de <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634) sob o efeito de imidacloprid e fipronil (Temperatura = $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$; Fotofase = 12 horas).....	102
6.2 Diâmetro médio de colônias e número médio de conídios produzidos por colônia de <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9) sob o efeito de imidacloprid e fipronil (Temperatura = $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$; Fotofase = 12 horas).....	103

	Página
6.3 Valores calculados do índice “T” e classificação dos produtos imidacloprid e fipronil em relação ao efeito fungitóxico sobre <i>Beauveria bassiana</i> (isolado 634) e <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado E-9).....	107

FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA DE *Beauveria bassiana* E *Metarhizium anisopliae* NO CONTROLE DE *Heterotermes tenuis* (ISOPTERA, RHINOTERMITIDAE)

Autor: ALCIDES MOINO JUNIOR

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

RESUMO

Esta pesquisa foi conduzida visando avaliar o efeito de alguns fatores que podem afetar a eficiência dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (isolado 634) e *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) no controle do cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis*. Foram realizados experimentos com os isolados dos fungos, incorporados ao solo esterilizado ou não, os quais indicaram que os mesmos têm sua eficiência de controle comprometida devido à ação antagonica da flora microbiana do solo. O fungo *Trichoderma* sp., isolado dos solos em estudo, exerceu efeito inibidor do desenvolvimento dos entomopatógenos, por meio de sua rápida taxa de crescimento micelial, bem como pela ação de substâncias excretadas no meio. O estudo dos ciclos de infecção dos fungos entomopatogênicos usando-se o microscópio eletrônico de varredura indicou que o isolado E-9 (*M. anisopliae*) provocou mortalidade em *H. tenuis* mais rapidamente que o isolado 634 (*B. bassiana*), devido à maior rapidez na ocorrência das fases de penetração e colonização do hospedeiro. Também foi avaliado o efeito tóxico dos inseticidas imidacloprid e fipronil em concentrações subletais sobre os fungos entomopatogênicos, visando sua utilização conjunta no controle da praga, sendo que o produto imidacloprid apresentou menor fungitoxicidade, além de alterar a capacidade de limpeza de *H. tenuis*. Este fato resultou em maior quantidade de inóculo sobre o tegumento do inseto, o que pode potencializar o efeito dos entomopatógenos, favorecendo a utilização do controle associado.

FACTORS AFFECTING THE STABILITY AND EFFICACY OF *Beauveria bassiana* AND *Metarhizium anisopliae* IN THE CONTROL OF *Heterotermes tenuis* (ISOPTERA, RHINOTERMITIDAE)

Author: ALCIDES MOINO JUNIOR

Adviser: Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

SUMMARY

The objective of this research was to evaluate the effect of some factors on the stability and efficacy of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (634 isolate) and *Metarhizium anisopliae* (E-9 isolate) in the control of the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. Experiments were carried out with the isolates incorporated into sterile or nonsterile soil. These experiments demonstrated that the efficacy of entomopathogenic fungi was affected by the antagonistic action of the soil microorganisms. *Trichoderma* sp., a fungus isolated from the tested soils, inhibited the development of the entomopathogens, due to its fast mycelial growth rate and to the action of compounds released into the culture medium. A scanning electronic microscopy study was conducted on the life cycles of the entomopathogenic fungi. Results showed that isolate E-9 (*M. anisopliae*) caused mortality of *H. tenuis* faster than 634 isolate (*B. bassiana*) because of the faster penetration and colonization phases. The toxic effects to the entomopathogenic fungi by the insecticides imidacloprid and fipronil at sublethal concentrations were also evaluated. Imidacloprid was less toxic to the fungi and caused a change in the grooming behavior of *H. tenuis*. This resulted on a greater inoculum level on the insect integument, increasing the effect of the entomopathogens. This synergistic effect justifies the utilization of a chemical/fungus combination for control of termites.

1 INTRODUÇÃO

O cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858) (Isoptera, Rhinotermitidae) vem sendo considerado uma das pragas mais importantes da cultura canavieira no Estado de São Paulo. Os danos causados e conseqüentemente sua importância econômica aumentaram após a proibição do uso de inseticidas organoclorados, em meados dos anos 80.

Os prejuízos causados por esta espécie de cupim podem levar a perdas na produção de até 10 ton/ha/ano, atacando a cana-de-açúcar na época do plantio, no período de maturação e após o corte, prejudicando o desenvolvimento das soqueiras (Novaretti, 1985).

O hábito subterrâneo e difuso deste inseto dificulta o seu controle que, anteriormente, era realizado com o uso de inseticidas químicos de alto poder residual, como os organoclorados. Atualmente, as alternativas de controle químico, apesar de atingirem o mesmo nível de eficiência destes produtos, não possuem longo poder residual, além de serem mais onerosas.

O controle microbiano de cupins com fungos entomopatogênicos vem sendo estudado há algum tempo, e representa uma metodologia bastante ecológica e promissora. No Laboratório de Patologia de Insetos, do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, em Piracicaba/SP, vêm sendo desenvolvidas pesquisas sobre o controle do cupim de montículo *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera, Termitidae) (Fernandes & Alves, 1991; 1992), bem como de *H. tenuis* (Almeida, 1994), com a utilização de isolados selecionados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok..

As boas perspectivas de utilização de fungos entomopatogênicos para o controle do cupim subterrâneo devem-se ao fato deste inseto possuir hábitos comportamentais peculiares como trofalaxia, lambimento, tigmotropismo e canibalismo. Esses hábitos, em espécies como *H. tenuis*, podem contribuir para o estabelecimento de epizootias nas colônias, facilitando a disseminação dos patógenos de indivíduos infectados para os sadios. Também estes hábitos são relevantes no aspecto de defesa do inseto contra o estabelecimento de agentes patogênicos, provocando a diminuição do potencial de inóculo para o início de epizootias, por meio da retirada de propágulos dos patógenos do corpo dos insetos (Almeida & Alves, 1996; Boucias et al., 1996a).

Com base no exposto, esta pesquisa visa avaliar o efeito de alguns fatores que podem afetar a eficiência de *B. bassiana* e *M. anisopliae* no controle do cupim *H. tenuis*, objetivando potencializar a ação de iscas à base destes fungos a serem colocadas no solo, com a estratégia de contaminação dos insetos e transmissão do patógeno a outros indivíduos da colônia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Heterotermes tenuis*: ocorrência, prejuízos e controle

Os estudos referentes ao cupim subterrâneo *H. tenuis* são escassos, pois é recente a sua ocorrência como praga em algumas culturas no Brasil, principalmente na cana-de-açúcar. Segundo Gallo et al. (1988), este isóptero pertence à família Rhinotermitidae, que compreende os cupins com ninhos subterrâneos, os quais causam, em todo o mundo, os maiores danos, reunindo cerca de 174 espécies. Recentemente, foram relatadas 206 espécies (Grace, 1994). Neste grupo de cupins, parte da colônia, ou toda ela, vive no solo em ninho cartonado e difuso. Há, todavia, colônias cuja atividade se processa quase que exclusivamente no material celulósico atacado acima do solo. No primeiro caso, a colônia se mantém em conexão com o solo, e no segundo, separada do mesmo. De acordo com Mill (1992), a família Rhinotermitidae contém três subfamílias que atacam predominantemente madeira morta. Todos os membros das subfamílias Coptotermitinae e Heterotermitinae depositam fezes empalidecidas, com as quais, em mistura com partículas do solo, constroem galerias de forrageamento. O aspecto destas galerias é uma característica importante, ocorrendo variações nas paredes das mesmas de acordo com as diferentes espécies. O dano típico dos rinotermitídeos é o tunelamento de estruturas das plantas, podendo provocar a morte destas.

Segundo Novaretti (1985), os ataques e subseqüentes danos causados por cupins na cana-de-açúcar, podem ser divididos em três tipos relativamente distintos: a) logo após o plantio, quando perfuram os toletes, seguido de um posterior ataque às raízes, diminuindo sensivelmente o vigor da planta e determinando falhas na germinação;

b) no período de maturação da cana, quando os cupins penetram nos colmos provocando secamento e morte dos mesmos; c) após o corte, quando as touceiras estão vulneráveis nas superfícies cortadas, com conseqüente dano ao desenvolvimento das soqueiras. Os dois primeiros tipos de danos são os mais significativos, sendo portanto, o alvo principal dos trabalhos de controle.

Estudos desenvolvidos pelo extinto IAA/Planalsucar, para levantamento de cupins de áreas canavieiras em São Paulo e estados vizinhos, revelaram ser *Heterotermes* um dos gêneros cujos ataques são mais marcantes, tanto em frequência, como em intensidade. Segundo Pizano & Fontes (1986), *H. tenuis* e *H. longiceps*, penetrando nos rizomas e toletes, são capazes de danificar a parte subterrânea e atingir a parte aérea da planta. Essas duas espécies, morfologicamente muito semelhantes, podem ser encontradas simultaneamente no mesmo canavial, sendo freqüente a mistura de representantes de ambas. Por ocasião dos levantamentos em áreas experimentais, *H. tenuis* representou cerca de 80% do total de amostras de *Heterotermes*. Em levantamentos realizados na região de Jaú (SP), Arrigoni et al. (1989) verificaram que *Cornitermes cumulans* e *H. tenuis* foram constantes em algumas áreas de usinas de açúcar e álcool, e somente *H. tenuis* foi constante no índice geral da região. De acordo com Hall (1994), as perdas estimadas na Flórida (EUA) em 1987, incluindo danos e custos de controle, devidas aos cupins subterrâneos, foram de US\$ 310 milhões, principalmente com relação a *Reticulitermes flavipes* e *R. virginicus*.

No controle de cupins subterrâneos em cana-de-açúcar, normalmente recomendam-se aplicações de inseticidas com longo poder residual por ocasião do plantio. Além desta característica, os inseticidas devem matar a praga, impedindo que ela infeste as touceiras da cana. O que parece ocorrer, na prática, é um efeito repelente dos produtos utilizados, que associado à desestruturação das colônias promovida pelo preparo do solo no plantio, resulta em diferentes graus de eficiência da operação, em função principalmente do efeito residual do inseticida (Pizano, 1995).

A Portaria nº 329 de 2 de setembro de 1985, do Ministério da Agricultura, veio proibir em todo o território nacional, o uso e a distribuição dos inseticidas

organoclorados destinados à agropecuária, embora somente os inseticidas de longo efeito residual no solo pudessem proporcionar um controle eficiente dos cupins (Novaretti et al., 1988). Na busca de substitutos para os produtos organoclorados para o controle de cupins, vários princípios ativos têm sido utilizados. Loeck & Nakano (1988) estudaram a persistência dos piretróides cipermetrina e deltametrina em condições de campo, avaliando seu efeito sobre operários de *C. cumulans*, verificando perda acentuada do poder residual nos primeiros 21 dias, sendo que a persistência estabilizou-se ao longo do tempo, após esse período inicial. Su & Scheffrahn (1990) testaram os inseticidas clorpirifós, permetrina, cipermetrina, fenvalerato, bifentrina, cihalotrina, esfenvalerato, silancofane, trialometrina e deltametrina para o controle de *Coptotermes formosanus* e *R. flavipes*, verificando que a espécie *R. flavipes* foi mais suscetível que *C. formosanus* a todos os princípios ativos. Todos os produtos testados foram repelentes aos cupins, mesmo em concentrações subletais. Outros autores como Smith & Rust (1991; 1992), Grace et al. (1992) e Su et al. (1993) também avaliaram a eficiência e a persistência de novos grupos de inseticidas para o controle de cupins. Resultados comuns têm sido a baixa persistência no solo e a característica de repelência, verificadas através da atividade de tunelamento dos insetos. Macedo (1995) destacou que o estabelecimento da Portaria nº 329 se por um lado desencadeou o comércio clandestino e um aumento substancial nos preços dos produtos, por outro lado propiciou um incremento nas pesquisas em busca de novos ingredientes ativos e formulações de ação cupinícida, aliado a um melhor conhecimento da bioecologia dos cupins. Neste avanço, o autor citou o desenvolvimento de iscas artificiais para monitoramento e controle, substituindo com maior eficiência, praticidade e menores custos, os levantamentos convencionais, como arranquio de soqueiras ou plantio de mudas de cana como iscas. Entre os novos produtos cupinícidas, o autor relatou como já registrados o isasofós (Miral) e o fipronil (Regent), além dos testes com um produto à base de endossulfan, com liberação lenta (Extermite), já utilizado para proteção em construção civil, e que vem propiciando resultados promissores em condições de campo.

Macedo et al. (1997a) estudando o efeito de diversas formulações comerciais para o controle de *H. temuis* concluíram que após duas colheitas consecutivas, o inseticida fipronil na formulação 800 WG apresentou os melhores resultados. Também Macedo et al. (1997b) trabalharam com a aplicação do inseticida imidacloprid, um inseticida do grupo das nitroguanidinas, em iscas de papelão corrugado para o controle de *H. temuis*, observando que as iscas contendo 0,05% do ingrediente ativo não foram repelentes aos cupins, e que colônias que ficaram em contato com essas iscas por um período de 12 horas tiveram a população reduzida em mais de 50%, sendo que iscas visitadas por 10 dias ou mais necessitaram de concentrações mínimas de até 0,0125% para aniquilar as colônias de cupins.

Segundo Myles (1992), o método químico convencional de controle não é o mais adequado quando se considera o comportamento social desses insetos. Assim, surgem novos conceitos, como a mortalidade retardada ou “slow-acting”. Nesse conceito, duas estratégias são utilizadas: atração e uso de armadilhas. A estratégia de atração preconiza a ingestão voluntária de princípios tóxicos e transmissão trofalática, sendo esse princípio aplicado pelo uso de armadilhas, onde se dá a transmissão dos agentes químicos ou microbianos, bem como a possibilidade de sua ação conjunta sobre os cupins. Zeck & Monke (1992) estudaram o efeito do imidacloprid (Confidor) associado ao controle microbiano, verificando que esse produto não foi repelente aos cupins *R. flavipes* e *C. formosanus*. Estudos nessa linha de pesquisa vêm sendo realizados desde o início da década de 90 no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP em Piracicaba, Estado de São Paulo. Trabalhos como os de Almeida (1994), Almeida & Alves (1995) e Alves et al. (1995) têm contribuído para o desenvolvimento de estratégias de controle microbiano com a utilização de fungos entomopatogênicos associados ou não a inseticidas químicos para o controle de *C. cumulans* e *H. temuis* em pastagens e cana-de-açúcar, respectivamente. Essa linha de pesquisa traduziu-se em projeto financiado pela FINEP, de onde pode-se destacar o que seria um organograma de fases de desenvolvimento de um programa de controle microbiano de cupins (Figura 1.1). Dessa forma, torna-se importante o

conhecimento da bioecologia dos cupins, bem como a realização de estudos básicos visando a introdução de estratégias de controle eficientes e ecologicamente viáveis, como é o caso do controle microbiano.

Figura 1.1 - Organograma de um projeto de controle microbiano de cupins (Alves et al., 1996)

2.2 Controle microbiano de cupins

2.2.1 Perspectivas para o uso de microrganismos no controle de cupins

Logan et al. (1990) fizeram referência aos métodos não-químicos de controle de cupins na agricultura e em áreas florestais, que têm atraído novos interesses, seguindo o aumento de restrições ao uso de inseticidas organoclorados. O controle não-químico envolve métodos que visam, sem o uso de inseticidas comerciais, prevenir contra o acesso dos cupins às plantas, reduzir o número de cupins na vizinhança das mesmas e diminuir a suscetibilidade ou aumentar a resistência das plantas a esses insetos. O uso de inseticidas naturais, produzidos por plantas, pode ser eficiente em alguns casos, mas como não são sujeitos aos testes rigorosos de segurança e avaliação ambiental como os inseticidas comerciais, seu uso não pode ser recomendado incondicionalmente. O uso de variedades e espécies resistentes, combinado com métodos culturais adequados e, talvez, o uso mínimo de inseticidas químicos numa visão integrada, oferecem o maior potencial para uma solução a longo prazo. Poucos prováveis patógenos têm sido isolados de cupins, segundo os autores. Apesar disso, por viverem em ambiente favorável (úmido, populoso e agregado), os cupins têm sido considerados bons candidatos como alvo para o controle biológico. Por outro lado, poucos casos de controle biológico de sucesso são conhecidos, devido aos hábitos comportamentais do inseto, principalmente o de isolamento dos membros infectados na colônia, prevenindo a disseminação do patógeno.

Boucias et al. (1996a) relataram que o cupim subterrâneo *R. flavipes*, ao contrário das formigas, não produzem compostos antimicrobianos, nem possuem respostas imunológicas internas, como os insetos holometábolos. Por outro lado, eles utilizam o lambimento (“grooming”) e a construção de túneis para a proteção contra patógenos potenciais. O lambimento entre indivíduos do ninho é eficiente e remove rapidamente aplicações tópicas de inóculos patogênicos. O tunelamento e subsequente deposição de bactérias antagônicas da microflora intestinal resultam em uma barreira que

inibe os organismos patogênicos, porém, em alguns casos, os cupins podem ingerir os indivíduos mortos e doentes, disseminando a doença na colônia.

Em contrapartida, problemas consideráveis no desenvolvimento de formulações e métodos de aplicação têm ocorrido, e as decisões sobre as estratégias apropriadas a serem adotadas podem ser prematuras. É também possível que outros microrganismos na colônia inibam o fungo ou os próprios cupins produzam alguma secreção fungistática. A inibição de fungos, por exemplo, em Macrotermitinae, exceto do simbionte obrigatório *Termitomyces* sp., é bem estabelecida, embora o mecanismo seja pouco claro. Por fim, muitos microrganismos são patogênicos aos cupins, mas poucos têm sido pesquisados com mais detalhes. Este aspecto, combinado com os mecanismos comportamentais dos cupins em combater a infecção da colônia, levam a crer que uma aplicação ampla e com sucesso do controle microbiano esteja bem longe de ser conseguida (Logan et al., 1990).

Segundo Hall (1994), a dependência do contato com o solo é a base dos métodos atuais de controle dos cupins subterrâneos, principalmente em áreas urbanas. O solo em volta e abaixo das estruturas das construções é tratado com inseticidas para formar uma barreira química entre o solo e o material celulósico. Dois fatores interferem no desenvolvimento de métodos de controle biológico para os cupins: o fato destes insetos serem benéficos no seu habitat natural e a sua natureza social, em cuja seleção natural desenvolveram defesas comportamentais contra agentes infecciosos. Com relação ao primeiro aspecto citado, Grace (1994) estabeleceu, a pedido da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), um protocolo para avaliação do efeito de agentes de controle microbiano sobre cupins subterrâneos não-alvo, onde o autor limita-se à família Rhinotermitidae, utilizando como inseto-teste o cupim subterrâneo *R. flavipes*. Os cupins são considerados, mundialmente, grandes contribuidores para a ciclagem de nutrientes, energia e produtividade do ecossistema, pois consomem vegetação morta, convertendo material lignocelulósico em carbono disponível, por meio da matéria fecal, favorecem a mistura e aeração do solo por meio de atividades de tunelamento intensivas e exercem papel fundamental como presas para pássaros, lagartos, e outros animais insetívoros. Assim, o papel dos cupins pode ser considerado ambíguo, sendo que em

áreas próximas a construções e edifícios, são freqüentemente alvo de controle, o que não se justifica em florestas naturais e regiões desérticas.

Deve-se considerar, dessa forma, o risco *versus* a segurança, quando se visa o desenvolvimento de um produto microbiano para o controle de cupins. O risco pode ser considerado como função do dano e da exposição. Assim, nesse caso, podemos considerar um dano (inerente ao produto) pequeno e conhecido, como é o caso dos fungos entomopatogênicos. Por outro lado, o fator exposição (para organismos não-alvo) deve ser mais preocupante em virtude da ocorrência simultânea, em diversos casos, de mais de uma espécie em determinada área. Portanto, no desenvolvimento de produtos e estratégias de controle, devem-se estabelecer medidas de segurança que diminuam o risco aos organismos não-alvo, caso em que se encaixa o uso de iscas atrativas.

Lund (1971) comentou que, por muitos anos, os produtos químicos têm sido aceitos como padrão para o controle de cupins em muitos países. Por outro lado, a partir da década de 60, esforços consideráveis têm sido feitos para o desenvolvimento de alternativas a essa estratégia de controle. Devido aos hábitos criptobióticos de muitos cupins, o desenvolvimento desses métodos tem sido extremamente lento. A Koppers Company Inc. de Pittsburgh, Pennsylvania, EUA, conduziu estudos em laboratório de diferentes microrganismos e das respostas atrativas, repelentes e patogênicas induzidas em cupins subterrâneos (*Reticulitermes* spp.), iniciados nos anos 50. Esses estudos levaram ao registro de cinco patentes nos EUA. No começo dos anos 60, essa companhia também conduziu testes de campo, com combinações de patógenos e produtos químicos para o controle de cupins subterrâneos. Depois de oito anos, os resultados no campo não foram encorajadores, e notou-se que algumas fontes de inativação dos patógenos estavam presentes nas parcelas tratadas. Estudos de laboratório têm demonstrado a possibilidade de controle de cupins subterrâneos usando patógenos. Por outro lado, das centenas de organismos avaliados, poucos mostraram atividade suficiente que justificasse testes posteriores, em condições de campo. Durante os últimos anos, houve um aumento substancial no número de instituições e pesquisadores examinando as possibilidades do

controle microbiano de cupins e este fato parece conduzir a uma melhor avaliação do problema no futuro.

Um dos comportamentos mais interessantes dos cupins é a passagem dos microrganismos simbiossantes por esses indivíduos através da alimentação proctodeal, atividade conhecida como trofalaxia, que é a base de tentativas de introdução de agentes químicos ou microbianos numa colônia. Segundo o autor, muitos agentes microbianos têm se mostrado promissores para o controle de cupins no laboratório, mas nenhum ainda se mostrou eficiente em testes de campo (Hall, 1994).

Os resultados obtidos por vários autores comprovam a dificuldade, mas não a impossibilidade de implantação de programas de controle microbiano de cupins, encorajando a continuidade das pesquisas nessa área da patologia de insetos.

2.2.2 Fungos entomopatogênicos

A associação entre fungos e cupins é ampla, e vai desde a simples ocorrência de um fungo não-patogênico no tegumento do inseto até o estabelecimento de relações patogênicas complexas, ou seja, doenças.

Segundo Hall (1994), os cupins estão em associação constante com uma variedade de espécies de fungos, como resultado de suas atividades no solo, na serapilheira e na madeira morta. Interações competitivas ou parasíticas entre fungos promovem a sobrevivência dos cupins nesses ambientes. Muitos fungos que crescem na cutícula dos cupins não causam danos, mas podem, ocasionalmente, ser patogênicos, como *Termitaria snyderi*, que parece não ter potencial para controle biológico. Em laboratório, cupins são rapidamente mortos por diversas espécies de fungos. A resistência comportamental à transmissão de fungos, promovida por indivíduos sadios, foi demonstrada em alguns estudos. Além disso, a esporulação de alguns fungos, como *B. bassiana* e *M. anisopliae*, é inibida no escuro, podendo diminuir a eficácia do controle. Concluindo, o autor ressaltou que qualquer agente de controle microbiano deve ser capaz

de contornar o problema da resistência comportamental e ser eficientemente transmitido por trofalaxia ou outros meios, além de se mostrar seguro ao ambiente.

Kimbrough & Morales (1972) descreveram e ilustraram uma nova espécie de fungo da ordem Laboulbeniales, *Dimeromyces isopterus*, que ocorre em *R. flavipes*, sendo o primeiro relato de um fungo deste gênero em Isoptera. Khan & Aldrich (1975) estudaram os haustórios do fungo entomógeno *T. snyderi*, que infecta o cupim subterrâneo *Reticulitermes* spp.. Os autores descreveram aspectos morfológicos dos haustórios e a forma como penetram no tegumento do inseto. Parece não haver contato das células da epiderme do inseto com os haustórios, que ficam separados pela membrana plasmática destas, havendo necessidade de mais estudos para esclarecer a ocorrência de parasitismo. Blackwell & Kimbrough (1976) fizeram uma descrição da ultraestrutura do fungo *Laboulbeniopsis termitarius*, que vive associado ao cupim subterrâneo *R. flavipes*, por meio de técnicas de microscopia eletrônica. Também Blackwell & Kimbrough (1978) listaram uma série de fungos que infestam o exoesqueleto de cupins. Um grupo muito freqüente é o da ordem Laboulbeniales. Foi descrito nesse trabalho um novo gênero, *Hormiscioideus*, espécie *H. filamentosus*, encontrada em alados, soldados e operários de *Armitermes neotenicus* no Brasil, mais precisamente no Estado do Mato Grosso. Blackwell (1980) realizou levantamentos em diversas localidades, coletando cupins (*R. flavipes*), lavando-os e removendo os fungos que infestavam o exterior dos insetos. Observou-se uma grande infestação de *L. termitarius* e *Coreomycetopsis oedipus*, sendo o primeiro mais comumente encontrado, tanto no número de amostras coletadas como na freqüência de indivíduos infestados em cada coleção. O grande número de insetos infectados levantou a questão da sua patogenicidade aos cupins, embora não haja evidências da penetração desses fungos na cutícula dos insetos.

Bao & Yendol (1971) afirmaram que a complexidade dos habitats ocupados por cupins subterrâneos oferece a possibilidade de numerosas associações saprofíticas, e que alguns estudos avaliaram quantitativa e qualitativamente essas interações, sem, contudo, esclarecer se há ou não algum tipo de relação patogênica. Alguns gêneros ectoparasíticos como *Ectomyces*, *Termitaria* e *Antennopsis* podem causar doenças. Este trabalho

descreveu o processo de infecção e um estudo histológico do cupim subterrâneo *R. flavipes* infectado com *B. bassiana*.

Dos grupos de fungos que comprovadamente causam doenças em cupins, aqueles pertencentes à ordem Entomophthorales têm despertado bastante atenção dos pesquisadores. Os fungos pertencentes a essa ordem têm ciclo de vida complexo, muito dependente de condições ambientais específicas, e são de difícil multiplicação em condições de laboratório, e, conseqüentemente, de difícil manipulação em programas de produção e aplicação em larga escala.

Altson (1947), estudando as condições ideais para a manutenção de uma criação de *Coptotermes curvignathus*, que é uma praga em seringueira (*Hevea brasiliensis*), notou a ocorrência de mortalidade muito alta em um dos tratamentos. Detectou, isolou e cultivou um fungo da ordem Entomophthorales, caracterizado como uma nova espécie de *Conidiobolus*. Yendol & Paschke (1965) conduziram testes de patogenicidade em laboratório com fungos do gênero *Entomophthora* sobre o cupim *R. flavipes*. Krejzová (1971) realizou experimentos que confirmaram que algumas espécies de *Entomophthora* não são, sob condições experimentais, tão específicas com relação ao hospedeiro, como tem sido propalado. Sua especificidade, sob condições naturais, é também dada por fatores ecológicos. *C. formosanus* foi infectado por *E. thaxteriana*, *E. destruens* e *E. virulenta* (isolado 1), causando 100, 95 e 76% de mortalidade, respectivamente, enquanto que *R. flavipes* foi infectado por *E. destruens* e *E. virulenta* (isolados 1 e 2), causando 80, 70 e 65% de mortalidade, respectivamente. As duas espécies de cupins mostraram respostas diferentes aos três fungos. A temperatura ótima para o desenvolvimento da doença causada por *E. destruens* nas duas espécies de cupins foi de 15 a 22°C; em ninhos artificiais, por outro lado, ambas as espécies desenvolvem-se bem entre 26 e 28°C. O estudo mostrou que não somente espécies diferentes, mas também isolados diferentes de uma mesma espécie podem diferir quanto à virulência, nas mesmas condições. Yendol & Rosario (1972) compararam métodos para inocular o cupim *R. flavipes* com o fungo *E. coronata*. Altos níveis de mortalidade foram obtidos quando os cupins foram expostos à superfície de cultura, ao contrário do que ocorreu quando

inoculados pelo método da ejeção de conídios em placa invertida. O tempo de exposição para produzir 50% de mortalidade na população foi de 0,73 horas para o método de inoculação na superfície do meio de cultura, contra 0,98 horas para o método da placa invertida. O número médio de unidades de potencial de inóculo por cupim foi calculado para os diferentes tempos de exposição. A DL_{50} para cupins inoculados com *E. coronata* foi de 344 unidades infectivas. Os autores relataram que, apesar de a maioria das pesquisas considerar que a fonte de inóculo para fungos entomopatogênicos são os esporos, possivelmente outros propágulos, como elementos do micélio e esporos de resistência possam servir como unidade infectiva. Possivelmente a rápida mortalidade pode ser explicada pela secreção de material tóxico pelo fungo.

Hanel (1982b) selecionou fungos patogênicos ao cupim *Nasutitermes exitiosus* em experimentos de laboratório. Trabalhou com *Entomophthora virulenta*, *E. destruens*, *Conidiobolus obscurus* (= *E. thaxteriana*), *M. anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* e *Absidia coerulea*, avaliando o crescimento radial e a esporulação dos fungos. O autor ressaltou que trabalhos futuros deveriam conter uma busca por isolados com alta capacidade de esporulação no escuro para tornar mais rápida a propagação do patógeno dentro do cupinzeiro. Blackwell & Malloch (1989) relataram outro gênero de ocorrência em cupins, *Amphoromorpha*, o qual assemelha-se muito a *Basidiobolus*, na forma de conídios secundários (capiloconídios). Há similaridades morfológicas da região de penetração no tegumento e clivagem interna dos conídios. Esses conídios secundários de *Basidiobolus* são importantes na dispersão para novos substratos no ciclo de vida do fungo.

Os fungos pertencentes à ordem Moniliales, onde se encontram gêneros bem estudados, como *Beauveria*, *Metarhizium* e *Paecilomyces*, são o principal alvo dos estudos em laboratório e testes de campo. Smythe & Coppel (1968) isolaram sete espécies de fungos a partir do tegumento de *R. flavipes* e todas foram patogênicas em condições de laboratório. Os cupins incubados isoladamente sofreram maior mortalidade que aqueles incubados em grupos, exceto nos tratamentos contendo duas espécies de

Penicillium, onde ocorreu o contrário. A atividade de limpeza foi observada nos cupins incubados em grupo e isso possivelmente influiu na mortalidade.

Krejzová (1976) descreveu um método pelo qual o fungo *P. fumosoroseus* foi isolado de cupins mortos do gênero *Zootermopsis* coletados de uma colônia desativada, na Califórnia. Este foi o primeiro relato deste fungo isolado a partir de um cupim. A ultraestrutura do fungo foi descrita por exames na estrutura superficial das hifas, fíalides e conídios, usando-se o microscópio eletrônico de varredura e estudando-se os conídios e seu desenvolvimento em microscópio eletrônico de transmissão.

Hanel (1981) realizou bioensaios quantitativos para avaliar a virulência de *M. anisopliae* a cupins. Os experimentos foram feitos com *N. exitiosus*, que constrói um monte conspícuo, sendo de fácil coleta e manutenção em laboratório. Foram estudados operários de terceiro a quinto estágio e um isolado de *M. anisopliae* originalmente oriundo de *Aneolamia* sp. (Cercopidae). Avaliou-se a mortalidade aos oito e 11 dias, sendo que aos 11 dias a mortalidade foi alta na testemunha e em ambas as avaliações encontrou-se uma boa correlação entre dose e resposta. A mortalidade que ocorreu na testemunha não foi devida a *M. anisopliae*, portanto, não houve contaminação. A mortalidade nos tratamentos variou muito nas repetições. Chama a atenção neste trabalho a discussão do autor acerca do fato das altas mortalidades na testemunha e da variação da mortalidade nas repetições, usando-se a análise de Probit. Os valores de CL_{50} obtidos para 11 dias estiveram entre 10^3 e 10^4 conídios/ml e aos oito dias entre 10^4 e 10^6 conídios/ml, com viabilidade entre 96 e 99%, garantindo um bom potencial de inóculo. O fungo penetrou em todas as partes do tegumento, e os insetos que permaneceram vivos após os 11 dias não estavam infectados, mostrando que somente um conídio germinado foi o suficiente para o desencadeamento da doença.

Hanel & Watson (1983), continuando os estudos anteriores, realizaram testes a campo com *M. anisopliae* para o controle de *N. exitiosus*, tratando os ninhos com polvilhamento ou pulverização, e tratando também as áreas próximas aos ninhos, supostamente locais de alimentação dos cupins. Foram realizados testes de transmissão em laboratório, onde insetos mortos após seis dias da aplicação do fungo foram

colocados (2, 5, 10 ou 20 insetos) em placas com 50 insetos sadios, não havendo rejeição aos cupins tratados. Nos testes a campo, houve uma grande variação nos resultados, observando-se um problema limitante com relação à falta de esporulação do fungo.

Kramm et al. (1982) expuseram cupins subterrâneos (*R. flavipes*) a culturas de *M. anisopliae* por 4, 8, 12 ou 48 horas. Os insetos tratados transferiram o fungo a cupins anteriormente sadios. Os indivíduos sadios concentraram a atividade de limpeza nos doentes e assim se infectaram. Os cupins que morreram pelo fungo foram rejeitados pelos indivíduos sadios, e foram menos eficientes na transmissão da doença quando mortos que quando expostos ainda vivos. De acordo com os autores, pelo menos três mecanismos comportamentais comuns em cupins podem disseminar os patógenos entre indivíduos: a trofalaxia, que é a troca de nutrientes entre membros da colônia, sendo um importante mecanismo homeostático e integrador; a limpeza, que consiste no lambimento da superfície do corpo dos companheiros de ninho e, finalmente, o canibalismo, que regula a proporção de indivíduos de cada casta e recicla os nutrientes nitrogenados. Na mesma linha de estudos, Kramm & West (1982) trataram grupos de *Reticulitermes* sp. com *B. bassiana*, *Gliocladium virens* e *M. anisopliae*. Os indivíduos foram removidos em intervalos de tempo variáveis e o conteúdo do estomodéu foi plaqueado em meio de cultura. Esporos viáveis dos fungos apareceram inicialmente no estomodéu após oito horas de exposição. Os fungos reisolados dos cupins doentes foram patogênicos a cupins sadios. Exames histológicos mostraram que a invasão da hemocela por *M. anisopliae* ocorreu exclusivamente devido à invasão direta do tegumento cerca de 24 horas antes da morte do inseto. *B. bassiana* invadiu, inicialmente, através do trato alimentar, cerca de 12 horas antes da morte do inseto. Segundo os autores, a possibilidade de uma rota *per os* do desenvolvimento da doença tem recebido pouca atenção. Se o material passado pela trofalaxia permanecer viável após a passagem pelo trato intestinal, o patógeno pode ser transmitido. Isso pode ser importante para incrementar a taxa de transmissão do patógeno, com reflexos na epizootiologia.

Segundo Lai et al. (1982), um isolado de *B. bassiana*, dois de *Beauveria* sp. e três de *M. anisopliae* foram testados para a patogenicidade a operários de *C.*

formosanus, empregando-se um método de inoculação por micro-seringa. Com base nas DL_{50} e limites de confiança, a patogenicidade foi maior para os isolados de *M. anisopliae*. Por causa da heterogeneidade dos dados, houve, em alguns casos, sobreposição dos limites de confiança. O método da micro-seringa permitiu a aplicação tópica das suspensões na área protorácica dos cupins, num volume de 0,5 μ l, sem perdas por escorrimento. Para a confirmação da mortalidade, usou-se a maceração de um ou dois indivíduos por tratamento.

No Brasil, os primeiros estudos com a utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de cupins foram realizados por Fernandes & Alves (1991). Foram relatados ensaios de campo para o controle de *C. cumulans* com *B. bassiana* e *M. anisopliae*, utilizando isolados previamente selecionados em bioensaios de laboratório. Foram utilizados cupinzeiros pequenos, de 15 a 24 cm de altura por 24 a 46 cm de diâmetro médio ao nível do solo, nos quais foram aplicados 5g de conídios, com aproximadamente $1,2 \times 10^{11}$ conídios/g, por meio de polvilhadeira manual. A avaliação foi feita no décimo dia após a aplicação, sendo a eficiência de 100% nos dois tratamentos. Houve um alto nível de esporulação nos cadáveres, funcionando como fator de indução de epizootias no interior do cupinzeiro, ao contrário do que Hanel & Watson (1983) haviam observado em trabalhos anteriores com *N. exitiosus*. A morte dos cupins foi muito rápida em função da alta concentração aplicada, das condições de temperatura e umidade e da ação toxicogênica envolvida no processo de colonização do hospedeiro pelo patógeno. Cinco dias após a inoculação já não se observava atividade dos operários, nem tentativas no reparo do furo feito para a aplicação do fungo no ninho.

Também Fernandes & Alves (1992) realizaram bioensaios para seleção de isolados em laboratório e um teste de campo para controle de *C. cumulans*, utilizando os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Após os dois bioensaios realizados, selecionaram-se os isolados 865, 866 e 259 (*M. anisopliae*) e o isolado 868 (*B. bassiana*), em função da virulência dos mesmos e dos níveis de conidiogênese em cadáveres de *C. cumulans*. No teste de campo todos isolados foram muito eficientes, alcançando níveis próximos ou iguais a 100%, em apenas dez dias após a aplicação, sendo que *B. bassiana* atingiu níveis

de conidiogênese bem superiores que *M. anisopliae*. Há algumas hipóteses levantadas por outros autores para a rápida mortalidade em condições de laboratório (menos de 48 horas), entre elas, a produção de micotoxinas, metabólitos tóxicos ou abrasão da cutícula, causada pela grande quantidade de inóculo, levando o inseto à desidratação. Essas altas quantidades permitem maior penetração de conídios, e conseqüente liberação de maior quantidade de toxinas e enzimas. Foi também notado o intuito de assepsia, que consiste na separação e isolamento dos insetos moribundos e recém-mortos, que, segundo os autores, não se constitui numa barreira à indução de epizootias, quando se utiliza a estratégia de introdução inundativa.

Milner (1992) realizou estudos de identificação e caracterização de isolados de *M. anisopliae* para o controle de escarabeídeos pragas da cana-de-açúcar e cupins (*Nasutitermes* e *Coptotermes*) na Austrália. Um meio de cultura semi-seletivo foi usado para isolar *M. anisopliae* do solo e do material do ninho. Os isolados variaram na morfologia da colônia, mas este caráter raramente foi correlacionado com a patogenicidade. Segundo o autor, outros métodos mais sensíveis como a análise do DNA nuclear usando a tecnologia da reação em cadeia de polimerase (PCR) têm se mostrado promissores para caracterização de isolados.

Khan et al. (1992) testaram oito fungos entomopatogênicos em laboratório contra o cupim *Odontotermes wallonensis*. *B. bassiana*, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. flavoviride* var. *minus*, *Paecilomyces lilacinus* e *P. fumosoroseus* foram patogênicos, enquanto *V. lecanii*, *P. farinosus* e *Nomuraea rileyi* não causaram mortalidade no inseto. *B. bassiana* foi o mais eficiente, seguido por *M. anisopliae*, *M. flavoviride*, *P. lilacinus* e *P. fumosoroseus*, principalmente com relação aos operários pequenos.

Almeida (1994) estudou, em condições de laboratório, a potencialidade dos fungos *B. bassiana*, *B. brongniartii* e *M. anisopliae* para o controle do cupim subterrâneo *H. tenuis*. Foram testados 134 isolados de *B. bassiana*, oito isolados de *B. brongniartii* e dois isolados de *M. anisopliae*. O isolado selecionado foi o 634 de *B. bassiana*, por ter causado 90% de mortalidade em *H. tenuis* e boa esporulação em diversos meios de cultura e sobre o inseto-teste. Determinou-se também que o inseticida

imidacloprid pode ser associado com o fungo *B. bassiana* nas formulações conídio puro, pasta de arroz e micélio seco, impregnados em armadilhas de papelão especialmente selecionadas para essa finalidade. Verificou-se também que o fungo *B. bassiana* pode ser transmitido para outros indivíduos sadios de uma população de *H. tenuis*. A armadilha de papelão corrugado (Termitrap®) foi a mais eficiente para atrair indivíduos no campo.

Alves et al. (1995) conduziram dois experimentos de campo para avaliar a eficiência de *B. bassiana* e *M. anisopliae* no controle de *C. cumulans*, aplicando, no primeiro experimento, 3 g de conídios de *B. bassiana* (isolado 868) e *M. anisopliae* (865) por cupinzeiro (0,3 a 0,4 m de altura). No segundo experimento, foram utilizadas formulações do fungo *B. bassiana* utilizando-se diversas proporções do arroz residual (sobra do processo de produção após a retirada dos conídios), em concentrações variáveis de 1,5 a 12 g/cupinzeiro (0,3 a 1,6 m de altura). A avaliação foi feita após 100 dias, sendo que no primeiro experimento, a mortalidade foi alta (98,5 e 100% para *M. anisopliae* e *B. bassiana*, respectivamente) e, no segundo, variou de 0 a 100%, sendo que mesmo o tratamento com fungo puro, no segundo experimento, causou apenas 50% de mortalidade. Os conídios puros, na concentração de 3 g/cupinzeiro, são eficientes para o controle de cupinzeiros pequenos, sendo que para os cupinzeiros médios e grandes há a necessidade do desenvolvimento de uma tecnologia de aplicação mais adequada.

Chai (1995) testou 20 espécies de fungos entomopatogênicos para sua infectividade ao rinotermitídeo *C. formosanus*, em condições de laboratório, por aplicação de suspensões aquosas a 6×10^7 conídios/ml em iscas. Encontrou-se que quatro isolados tiveram alta infectividade aos cupins, sendo o isolado 37 (*M. anisopliae*) com 100% de mortalidade, isolado 61 (*Aspergillus fumigatus*) com 96,7%, isolado 90 (*P. fumosoroseus*) com 86,7% e o isolado 20 (*P. cicadidae*) com 84,4% de mortalidade. Os outros isolados causaram de 16,7 a 78,9% de mortalidade.

Zoberi (1995) isolou o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* de indivíduos de *R. flavipes* doentes, coletados de área próxima a Toronto, no Canadá. As culturas de *M. anisopliae* cresceram em meio de ágar-extrato de malte. As unidades de dispersão, usualmente conídios, foram retiradas destas culturas. Cupins vivos contaminados com o

fungo podem levar a doença a cupins sadios, causando rápida e significativa mortalidade, e podem ser usados como iscas para o controle de cupins. O fungo foi transmitido por contato, obtendo-se 100% de mortalidade em 48 horas. Os cupins mortos por *M. anisopliae* foram retirados do ambiente por indivíduos sadios, sendo que o isolamento e repelência de cupins infectados por cupins sadios não foi um fator significativo na obstrução da transferência do fungo pela colônia, segundo o autor. Por outro lado, a transmissão do inóculo por cupins sadios tem se mostrado como o método mais eficiente de infiltrar a colônia com um fungo patogênico. A infecção pelo patógeno em cupins no laboratório foi obtida sob condições controladas que fizeram com que o patógeno fosse mais agressivo que o esperado em condições naturais subótimas.

Gitonga et al. (1996) citaram que, no Quênia, os cupins são pragas importantes de culturas agrícolas, florestais e construções, principalmente em pastagens, sendo *M. anisopliae* e *B. bassiana* investigados para o controle biológico. Em testes de laboratório, alguns isolados de *M. anisopliae* foram altamente patogênicos a *Macrotermes michaelseni*, cinco dias após o tratamento. A transmissão se deu em torno de 49%. Os cupins não rejeitaram iscas impregnadas com o fungo em testes de livre escolha, e se contaminaram por contato e pela alimentação. Em ninhos, foram colocados 7 g de conídios puros, 10 g de micélio seco ou 20 g de uma formulação com arroz, causando 80, 60 e 58% de infecção, respectivamente, sete semanas após o tratamento.

Jones et al. (1996) avaliaram o potencial de três isolados de *M. anisopliae* e 4 isolados de *B. bassiana* para o controle de *C. formosanus*. De maneira geral, os isolados de *M. anisopliae* foram os mais virulentos, com exceção de um isolado de *B. bassiana*, que foi altamente virulento, sendo que os valores de TL_{50} variaram de 0,13 a 4,5 dias. Também foram feitos testes para a verificação da capacidade de transmissão e manutenção da viabilidade dos isolados, simulando-se as condições do interior dos ninhos.

Staples et al. (1996) estudaram o controle de cupins na Austrália com o fungo *M. anisopliae*. Nos casos em que foi possível a aplicação direta do fungo, como em espécies que constroem montes ou ninhos em árvores, a eficiência do controle

microbiano foi alta. Por outro lado, no caso de cupins subterrâneos, a utilização de iscas para o controle indireto promoveu resultados muito variáveis. Os autores ressaltaram a importância do desenvolvimento de iscas para o controle de cupins subterrâneos, as quais permitiriam a incorporação dos patógenos, reguladores de crescimento, inseticidas estressores, ou combinações desses agentes de controle, associados também a substâncias atrativas.

2.2.3 Outros entomopatógenos

Apesar de a maioria dos estudos que visam o controle microbiano de cupins ser realizada com fungos entomopatogênicos, alguns trabalhos têm sido conduzidos com bactérias, vírus e nematóides, principalmente no sentido de verificar a patogenicidade desses grupos de entomopatógenos aos diversos gêneros de cupins de importância econômica.

Smythe & Coppel (1965) testaram uma preparação solúvel de uma toxina derivada de *Bacillus thuringiensis*, que é tóxica a *R. flavipes*, *R. virginicus*, *R. hesperus* e *Zootermopsis angusticollis*. Aproximadamente 75% de mortalidade foi alcançado nove dias após a administração da toxina, a qual, em combinação com esporos e corpos parasporais, resultou em mais de 90% de mortalidade. A relação precisa entre o fator solúvel experimental usado neste estudo e as toxinas reportadas anteriormente para *B. thuringiensis* não foi determinada. Kakaliev & Saparliev (1975) encontraram, em condições de laboratório, que a preparação à base de *B. thuringiensis* var. *galleriae* conhecida como Entobakterin foi eficiente sobre *Acanthotermes ahngerianus* (Jacobson). Testes foram conduzidos em 1972-74 para avaliar a eficiência deste composto quando introduzido no interior de ninhos deste cupim em campos da Turkmenia (ex-União Soviética). Os resultados dos tratamentos líquidos foram desapontadores, ocorrendo uma mortalidade inicial, mas com as colônias sobrevivendo e retornando aos níveis populacionais normais depois de um pequeno período de tempo. Farghal et al. (1987) avaliaram, em testes de laboratório, a suscetibilidade de dois cupins, *Armitermes*

desertorum e *Psammotermes hybostoma*, a quatro produtos microbianos, no Egito. Os produtos testados foram Bakthane/Thiodane (*B. thuringiensis* var. *thuringiensis*), Dipel (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*), Bactospeine (*B. thuringiensis* var. *thuringiensis*) e Thuricide (*B. thuringiensis*). Bakthane/Thiodane foi o produto mais eficiente sobre as duas espécies de cupins, enquanto o Thuricide foi o menos eficiente. Os operários de *A. desertorum* foram comparativamente os mais tolerantes a todos os produtos testados. Os operários mortos nos quatro tratamentos foram patogênicos aos cupins vivos, resultando em 100% de mortalidade após 48 horas da exposição aos cadáveres tratados com Bakthane/Thiodane, Dipel e Thuricide.

Segundo Hall (1994), em colônias de laboratório de *Z. angusticollis*, indivíduos que morreram por *Serratia* sp. foram levados para fora da colônia, envoltos em “pellets” fecais e partículas de madeira.

Fowler (1989) verificou que um iridovírus isolado de populações naturais de paquinhos (*Scapteriscus borelli*) mostrou-se altamente patogênico a cupins do gênero *Cryptotermes*. Acidentalmente, os cupins entraram em contato com papel de filtro com o vírus, e a população foi dizimada em duas semanas. Após a realização de bioensaios, observou-se que o vírus se disseminou rapidamente pelos cupins, com altos níveis de mortalidade, devido ao comportamento de canibalismo e trofalaxia, além da agregação. A injeção de hemolinfa de insetos doentes em sadios levou à morte dos mesmos num período de cinco a 20 dias. Levin et al. (1993) encontraram que o entomopoxvírus do gafanhoto migratório *Melanoplus sanguinipes* (MsEPV) infectou o cupim subterrâneo *R. flavipes*. Os cupins se alimentaram de papel filtro com o vírus, e morreram numa média de $14,25 \pm 8,0$ dias quando comparados ao controle, onde sobreviveram por $48,0 \pm 2,5$ dias. Segundo Hall (1994), o único vírus de ocorrência natural em cupins causa paralisia, e foi isolado de oito colônias de *N. exitiosus*, três colônias de *C. lacteus* e duas colônias de *Porotermes adamsoni* por centrifugação diferencial. Deve-se ressaltar que a produção de vírus para utilização como agente de controle, ou mesmo para realização de testes em maior escala, é um fator limitante, pois uma característica desses entomopatógenos é a necessidade de multiplicação *in vivo*. Atualmente, algumas pesquisas têm sido conduzidas

no intuito de viabilizar a produção *in vitro* de vírus entomopatogênicos, o que ainda não é viável economicamente.

Laumond et al. (1979) realizaram testes de laboratório para investigar a faixa de hospedeiros do nematóide *Neoaplectana carpocapsae* (= *Steinernema carpocapsae*). Foram testadas 128 espécies de insetos, de diversas ordens, entre elas a ordem Isoptera, e mais alguns outros artrópodos. A rapidez da ação do nematóide, sua habilidade para multiplicação no hospedeiro e outros requisitos ecológicos para uso prático também foram estudados. Como representante da ordem Isoptera, foi testado o cupim *N. exitiosus*. Com relação à rapidez de ação e virulência ao cupim, observou-se, em testes com placas de Petri, com 5 repetições de 10 insetos, a uma concentração de $6,0 \times 10^3$ larvas infestantes e temperatura de 23°C, que houve 100% de mortalidade dos cupins após três dias da inoculação. Segundo Dantharanavana & Vitarana (1987), *Glyptotermes dilatatus* é a mais importante praga do chá no Sri Lanka em altitudes menores que 500 m, atacando 51% da área cultivada, que correspondem a 25% da área total do país. Causa, por meio de suas escavações no lenho, seca de ramos e morte prematura das plantas. O controle químico é difícil, sendo usada a fosfina inserida dentro das galerias. O nematóide *Heterorhabditis* sp., associado à bactéria simbiote *Xenorhabdus luminescens*, pode ser considerado um bom agente de controle do cupim, neste caso. Os autores afirmaram que o nematóide pode controlar os cupins nas condições de campo existentes na cultura, sendo as colônias aniquiladas em 2 a 3 meses com a aplicação de suspensões de 4000 a 8000 nematóides/ml, havendo evidências da persistência do nematóide no ambiente, sendo as larvas produzidas nos cadáveres infectivos sobre cupins saudáveis. Os métodos de aplicação utilizados foram por meio de injeção com pipetas ou pulverização pressurizada, com resultados semelhantes.

Coppel & Liang (1987) descreveram a biologia e criação de um nematóide da família Rhabditidae, originalmente isolado de cupins, que infecta *R. virginicus*, *R. flavipes* e *C. formosanus*, e mostrou ser promissor como potencial agente de controle. Epsky & Capinera (1988) trabalharam em experimentos de laboratório e campo com o nematóide *S. feltiae* para o controle do cupim subterrâneo *R. tibialis*. As doses requeridas para

mortalidade em laboratório foram muito altas ($DL_{50} = 1,5 \times 10^4$ nematóides/cupim). No campo, aplicou-se $1,0 \times 10^7$ nematóides/m², em iscas, obtendo proteção da área por 3 a 4 semanas. Os autores comentaram, em relação ao trabalho de Dantharanavana & Vitarana (1987), que os cupins subterrâneos diferem bem dos de madeira viva, como é o caso de *Glyptotermes* em relação a *Reticulitermes*. Os cupins de madeira viva alimentam-se e vivem no interior dos ramos das plantas, com pouco ou nenhum contato com o solo, facilitando o controle, o que não ocorre com cupins subterrâneos.

Mauldin & Beal (1989) conduziram estudos para determinar a eficiência de nematóides entomopatogênicos na prevenção ou eliminação de cupins subterrâneos *R. flavipes* no laboratório, e infestações de *Reticulitermes* spp. no campo. Os nematóides testados no estudo em laboratório foram *S. feltiae*, *S. bibionis* e *Heterorhabditis heliothidis*. Os mesmos nematóides foram testados em estudos de campo. Nos estudos de laboratório, os cupins rapidamente moveram-se de um ninho, através de um tubo contendo uma mistura de areia, vermiculita e água, para uma caixa na qual estavam os nematóides. Depois de 9,5 semanas, as taxas de sobrevivência dos cupins nos tratamentos com nematóides e nos controles não diferiram significativamente. Nos estudos de campo, os nematóides não controlaram os cupins em uma simulação de tratamento de solo em caixas de concreto ou em locais naturalmente infestados com cupins.

Poinar Jr. & Georgis (1990) descreveram um isolado de *Heterorhabditis bacteriophora* do oeste dos EUA, cujas formas infectivas são hábeis em penetrar a cutícula externa de *R. hesperus* utilizando dois pequenos processos terminais subventrais. O isolado promoveu resultados de controle dos cupins iguais ou superiores ao promovido por produtos químicos como o bendiocarb e o trichlorfon. Segundo Hall (1994), o nematóide melhor estudado para cupins subterrâneos é *S. carpocapsae*, que tem sido produzido comercialmente para o controle de cupins, havendo também relatos de resistência comportamental a esses agentes de controle. Nguyen & Smart Jr. (1994) identificaram e descreveram um nematóide isolado do cupim *R. flavipes* como sendo um novo gênero e espécie, *Neosteinerinema longicurvicauda*. Adultos do nematóide foram encontrados fora do cadáver do cupim.

Passos Jr. & Alves (1995) realizaram observações preliminares a respeito da patogenicidade de *S. carpocapsae*, na formulação comercial Exhibit® a *H. tenuis*, obtendo altas taxas de mortalidade com aplicação de 75 nematóides/cm² de papelão corrugado, utilizado como isca. Níveis elevados do nematóide (1000 juvenis/cm²) permitiram a detecção e repelência por parte dos cupins.

Com relação a protozoários entomopatogênicos, Kalavati (1977) relatou, pela primeira vez ocorrendo em cupins, *Steinina coptotermi* n. sp., encontrado em *Coptotermes heini*. Segundo Hall (1994), pouco se conhece sobre protozoários patogênicos a cupins subterrâneos. Atenção especial tem sido dada à ordem Eugregarinida, sendo que as gregarinas hemocélicas são às vezes patogênicas, e microsporídeos têm sido relatados em cupins, mas pouco se sabe sobre sua transmissão e patogenia.

2.3 Estudos da relação patógeno/hospedeiro em doenças fúngicas de cupins

De maneira geral, as fases de desenvolvimento de um fungo entomopatogênico são: adesão, germinação, penetração, colonização e reprodução. O tempo de cada uma destas etapas é variável com fatores associados ao patógeno, hospedeiro e ambiente (Alves, 1998).

Os estudos relacionados com a duração das diferentes fases das doenças fúngicas em cupins são relativamente escassos, porém, sua importância no contexto do controle microbiano deve ser levada em conta. Se considerarmos, por exemplo, o controle microbiano de *H. tenuis*, por meio de iscas atrativas impregnadas com fungos entomopatogênicos (Almeida & Alves, 1995), será interessante a utilização de isolados que produzam grande quantidade de propágulos, mas pouco agressivos ou virulentos, que possibilitem o desenvolvimento mais lento da doença, permitindo o retorno dos cupins ao ninho e a contaminação de grande parcela da população por meio dos hábitos comportamentais deste inseto, agindo de maneira inoculativa. Por outro lado, o controle de *C. cumulans* (Fernandes & Alves, 1992; Alves et al., 1995) exige isolados com grande

capacidade de causar mortalidade rapidamente, funcionando assim, de maneira inundativa, como um bioinseticida. Essas características podem ser estudadas por meio de bioensaios e pela visualização das diferentes fases da doença através de técnicas de observação mais detalhadas, como a microscopia eletrônica de varredura.

Altson (1947), num dos primeiros estudos a esse nível, citou que um fungo, provavelmente do gênero *Conidiobolus*, causou mortalidade de 100% dos operários de *C. curvignathus* em 48 horas. Já Yendol & Paschke (1965) encontraram que *E. coronata* provocou mortalidade de 97 % em *R. flavipes*, 84 horas após a inoculação. Segundo esses autores, a penetração ocorreu 12 horas após a inoculação, sendo os corpos gordurosos e a musculatura colonizados inicialmente e o restante dos tecidos destruídos, no mínimo, 32 horas após a inoculação.

Segundo Bao & Yendol (1971), estudando o ciclo de *B. bassiana* em *R. flavipes*, foram observados os seguintes sintomas durante a ocorrência da doença: inativação e agregação dos insetos, tremores, aumento na defecação, falta de resposta ao estímulo tátil, flacidez, morte entre 24 e 36 horas, mudança na coloração e mumificação. O acúmulo de conídios foi observado nas áreas intersegmentais, sendo que os conídios ingeridos, encontrados no estomodéu e mesêntero, geralmente perderam sua integridade. O processo todo se completa de 88 a 96 horas após a inoculação. A elevada virulência desse fungo, segundo os autores, pode estar associada à produção de micotoxinas, à quantidade de inóculo e às condições do hospedeiro. A penetração do fungo, com formação do tubo germinativo, ocorreu no mínimo 16 horas após a inoculação, inicialmente na região ventral dos segmentos abdominais posteriores.

Estudando o ciclo de *M. anisopliae* em *N. exitiosus*, Hanel (1982a) observou que os conídios penetraram a cutícula do inseto, com a formação não obrigatória de um ou mais apressórios, no tempo médio de 48 horas, variando de 18 a 66 horas. Assim, o autor resumiu a estratégia do fungo no parasitismo de *N. exitiosus* como sendo: a) distribuição máxima de corpos hifais com o inseto ainda vivo; b) eliminação do conteúdo intestinal, após a ação de toxinas, reduzindo a possibilidade de contaminação secundária

por bactérias; c) utilização dos tecidos do hospedeiro para a conidiogênese; d) no caso de colonização por outros microrganismos, formação de estágios de resistência.

Sajap & Kaur (1990) inocularam operários de *C. curvignathus* com *M. anisopliae*, expondo-os a conídios viáveis em placas de Petri a 28°C. Os conídios que aderiram à cutícula dos insetos germinaram após 24 horas. O tubo germinativo penetrou na cutícula, invadindo em seguida os tecidos do inseto na seguinte ordem: corpos gordurosos, músculos, tecidos nervosos, células do epitélio do mesêntero e estômago. Os insetos infectados morreram entre 36 e 48 horas após a inoculação, mas a colonização completa dos cupins não se evidenciou até as 72 horas após a inoculação. O micélio emergiu da cutícula após 100 horas e massas compactas de conidióforos produzindo conídios formaram-se 120 horas após a inoculação.

O emprego de técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para estudos de observação das diferentes fases das doenças fúngicas pode ser feito utilizando diversas técnicas. A técnica utilizada na fixação dos insetos e do fungo depende do tipo de estudo que se deseja realizar, sendo que, para estudos onde o objetivo é simplesmente constatar a presença do patógeno no inseto, podem ser utilizadas técnicas mais simples e rápidas, como a fixação com vapor de OsO₄ (tetróxido de ósmio) por 48 a 96 horas, seguida por secagem em dessecador por no mínimo 72 horas. Deste modo, evita-se uma possível perda de estruturas causada pela imersão dos insetos em fixadores ou nos líquidos utilizados para a secagem ao ponto crítico.

Hunt et al. (1984), estudando a germinação de *B. bassiana* no tegumento de *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera, Scolytidae), não utilizaram qualquer técnica de fixação ou desidratação antes da metalização com ouro para observação ao MEV. Com o objetivo de evitar a imersão dos insetos e de testar diferentes técnicas de preparo de *Beauveria* spp., Quattlebaum & Carner (1980) concluíram que, entre as diferentes técnicas testadas, a fixação com OsO₄ (tetróxido de ósmio) por 96 horas, seguida de secagem ao ar por 3 a 4 dias, foi a que produziu menor distorção nas estruturas do fungo. Esta técnica foi utilizada por Neves et al. (1996) para estudos de infecção de *Eutinobothrus brasiliensis* (broca-do-algodoeiro) por *B. bassiana*. Também Lopes et al.

(1996) utilizaram esta metodologia no estudo da infecção e conidiogênese de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em *H. tenuis*. Esses autores constataram que, para *B. bassiana*, a germinação dos conídios iniciou-se entre as 12 e 24 horas após a aplicação, com a formação do tubo germinativo e penetração após as 48 horas e morte às 72 horas. Para *M. anisopliae*, a germinação e penetração ocorreram entre as 24 e 48 horas, seguidas da morte dos insetos. A conidiogênese ocorreu em 4 e 5 dias, respectivamente, para *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

Por outro lado, quando o objetivo é documentar as diferentes estruturas do fungo no seu processo de infecção, é primordial que estas estejam preservadas em sua integridade, principalmente quando se trabalha com insetos de tegumento mole, como é o caso dos cupins. Assim, a maioria dos autores utiliza a fixação dos espécimes em glutaraldeído com tampão cacodilato 0,2 M a pH 7,3, seguida de desidratação em série de etanol, secagem ao ponto crítico com CO₂ e posterior metalização com ouro. Com essa técnica, Champlin et al. (1981) estudaram a virulência de *B. bassiana* para larvas do besouro da noz pecã, *Curculio caryae*. Também 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, também utilizada por Gunnarsson (1988), no estudo da infecção de *Schistocerca gregaria* por *M. anisopliae*. Bidochka & Khachatourians (1992) após fixação e desidratação, deixaram os insetos em secagem ao ar por 24 horas, quando então estudaram o crescimento de *B. bassiana* nos componentes da cutícula de *Melanoplus sanguinipes*.

2.4 Interação entre entomopatógenos e produtos fitossanitários no controle de cupins

Entre as diversas estratégias para a utilização de entomopatógenos no controle de pragas, encontra-se o controle associado, ou seja, a utilização de produtos fitossanitários simultaneamente ao uso de entomopatógenos. Alguns desses produtos são altamente seletivos aos entomopatógenos e muitas vezes podem, quando associados a esses microrganismos, melhorar o seu efeito, contribuindo para o controle de uma determinada praga. A seletividade e o controle associado devem receber especial atenção em culturas nas quais o uso do controle químico seja indispensável, ou naquelas em que os problemas causados pelo ataque de pragas sejam considerados pontos-chave na sua condução, como é o caso dos cupins subterrâneos em cana-de-açúcar.

A ação dos produtos fitossanitários sobre os entomopatógenos pode variar em função da espécie e linhagem do patógeno, da natureza química dos produtos e das concentrações utilizadas. Esses produtos podem atuar inibindo o crescimento vegetativo, a conidiogênese e a esporulação dos microrganismos, e até mesmo causando mutações genéticas nesses entomopatógenos, as quais podem levar à diminuição da virulência a determinada praga (Alves et al., 1998). Se considerarmos a estratégia de controle do cupim *H. temis* por meio de iscas de papelão corrugado impregnadas com inseticidas e fungos entomopatogênicos, deve-se atentar para os possíveis efeitos fungitóxicos desses produtos fitossanitários a serem utilizados.

Boucias et al. (1996b) citaram que bioensaios têm demonstrado que o inseticida imidacloprid é inócuo ao fungo *B. bassiana* e não influencia na germinação e crescimento vegetativo do mesmo.

Com relação ao produto fipronil, Batista Filho et al. (1996) avaliaram sua eficiência no controle de *Cosmopolites sordidus* e a sua compatibilidade com o fungo *B. bassiana*, por meio da adição do produto em quantidades proporcionais às recomendadas para o controle da praga. Os autores concluíram que fipronil não provocou redução

significativa na produção de conídios, porém afetou ligeiramente o crescimento vegetativo, sem haver alteração na viabilidade do fungo entomopatogênico.

Outro fator a ser analisado é a capacidade estressora de produtos fitossanitários, o que favorece a utilização do controle associado, como já foi dito anteriormente, impregnando-se iscas com concentrações subletais de produtos químicos, os quais podem potencializar a ação do microrganismo patogênico.

No caso dos cupins, a capacidade de limpeza dos indivíduos mantém as colônias livres de patógenos, evitando a ocorrência de epizootias. Os cupins, assim como as formigas, evoluíram desenvolvendo mecanismos comportamentais bastante eficientes, dificultando a ação dos fungos entomopatogênicos que agem, principalmente, por contato.

Com base nessa característica, estudos conduzidos com o inseticida imidacloprid têm apontado a ocorrência de um sinergismo com entomopatógenos no controle de *R. flavipes*, provocando maiores e mais rápidos níveis de mortalidade (Zeck, 1992). Este autor observou que a utilização de *M. anisopliae*, em associação com imidacloprid, possibilitou o emprego de menores concentrações de conídios e do inseticida, com resultados de eficiência de controle semelhantes aos obtidos com a utilização de maiores quantidades dos princípios ativos isoladamente, baseado no fato de o imidacloprid atuar como um estressor para os cupins em concentrações subletais, afetando os seus mecanismos de defesa, de modo a facilitar a ação do entomopatógeno.

Também Boucias et al. (1996b) estudaram os efeitos do imidacloprid em *R. flavipes* e suas interações com *B. bassiana*. Os autores observaram que a aplicação de doses subletais de imidacloprid não provocaram alterações na cutícula nem no sistema imunológico dos insetos, e sim no seu comportamento de limpeza, possibilitando que um maior número de conídios germine e penetre nos insetos, causando a sua morte mais rapidamente.

2.5 Relações parasíticas e antagonísticas entre microrganismos

Segundo Jeffries & Young (1994), todos os fungos são heterotróficos e assim, requerem compostos orgânicos pré-sintetizados como fonte de energia para crescimento. Esta necessidade levou os fungos a se tornarem, durante a evolução, saprófitas e simbios por excelência. Fungos que crescem em matéria orgânica morta, como raízes de árvores, são exemplos de saprofitismo. Aqueles que obtêm nutrientes de hospedeiros vivos, por outro lado, são simbióticos, e vivem em uma associação fechada e freqüentemente permanente com uma ou mais espécies de organismos. O padrão desta relação pode ser vantajado (simbiose mutualística), sem efeitos (neutralismo ou comensalismo) ou compromissado (antagonismo ou parasitismo). A habilidade de um fungo antagonístico em inibir o desenvolvimento de outro fungo patogênico pode ser explorada no controle biológico, e isso vem sendo feito com algumas espécies de *Trichoderma*. O micoparasitismo é o parasitismo de um fungo por outro, e também algumas vezes é erroneamente citado como hiperparasitismo, pois isso é melhor usado quando há o parasitismo de um parasito sobre outro, e não necessariamente uma associação entre fungos.

Algumas espécies de *Trichoderma* têm sido estudadas com relação à sua habilidade em deslocar fungos fitopatogênicos de solos. No solo é difícil distinguir entre os efeitos do antagonismo direto envolvendo enrolamento de hifas e penetração, com secreção de antibióticos deletérios ao hospedeiro, e do antagonismo indireto, com a colonização de substratos no solo e ocupação de espaço disponível. Assim, o sucesso de *Trichoderma* como competidor é devido à combinação destes fatores descritos acima. *Trichoderma* é comumente encontrado em solos de todas as partes do mundo. *T. harzianum*, em particular, tem-se mostrado muito promissor no controle biológico. Esta espécie pode agir por micoparasitismo, juntamente com a produção de pironas voláteis antibióticas e enzimas de degradação de parede celular. Também produz uma celulase eficiente e é um colonizador dominante da palha, que é substrato para microrganismos em solos usados para cultivo. Em comparação com outros fungos relatados como tendo bom

potencial para controle biológico, um isolado de *T. harzianum* exibiu a maior atividade *in vitro*. Este fungo também mostrou potencial no campo, por exemplo, no controle de *Rhizoctonia solani*. O comportamento saprofítico competitivo de espécies de *Trichoderma* em solos não-rizosféricos parece ser devido a fatores como crescimento rápido do micélio, recolonização de solos fumigados, grande capacidade de formação de propágulos, rápida germinação de esporos, produção de antibióticos, produção de inibidores de crescimento voláteis e capacidade de parasitismo. O micélio também secreta uma série de enzimas hidrolíticas extracelulares que auxiliam o fungo a colonizar o substrato alimentar no solo e também a quebrar a parede celular e o citoplasma dos competidores. A ampla competência enzimática de *Trichoderma* (quitinases, β -1,3-glucanases e celulasas) habilita o fungo a colonizar substratos celulósicos no solo, especialmente palha, que oferece um alimento rico em energia. A secreção de antibióticos antifúngicos por *Trichoderma* é também aceita como participante do mecanismo de controle biológico. Assim, a antibiose pode ser o determinante principal, apesar de que alguns isolados não produzem antibióticos, ou as quantidades sejam muito pequenas para serem detectadas (Jeffries & Young, 1994)

Segundo Rai et al. (1980), *Trichoderma viride* é parasito de três espécies de *Aspergillus*. O micoparasitismo foi caracterizado pelo enrolamento e penetração freqüentes e crescimento de hifas do parasito nos conidióforos de *Aspergillus*, sendo que metabólitos voláteis e não-voláteis de *T. viride* inibiram o crescimento radial de todas as espécies testadas do hospedeiro. Bell et al. (1982) compararam *in vitro* as atividades antagonísticas de 77 isolados de *Trichoderma*, principalmente de *T. harzianum*, sobre fungos dos gêneros *Sclerotium*, *Ceratobasidium*, *Phytophthora*, *Pythium* e *Rhizoctonia*, todos patógenos de plantas, sendo que cada isolado dos fungos testados foi antagonizado por um ou mais isolados de *Trichoderma*. A grande diferença encontrada foi na interação entre *Trichoderma* e os outros fungos, pois um isolado de *Trichoderma* pode ser altamente efetivo sobre um isolado qualquer de outro fungo, mas causar efeitos mínimos em outros isolados da mesma espécie, sendo especialmente observado esse fato em *R. solani*. Também trabalhando com a interação entre *Trichoderma* e *R. solani*, Camporota

(1985) estudou a importância de três mecanismos de antagonismo existentes nessa interação: micoparasitismo, produção de metabólitos voláteis e produção de metabólitos não-voláteis. Dos 28 isolados de *Trichoderma* testados, houve grande variação em suas propriedades antagonísticas, sendo que o micoparasitismo foi o mecanismo mais eficiente na destruição das hifas de *R. solani*.

Por meio de técnicas de microscopia de fluorescência, utilizando diacetato de fluoresceína (FDA), Barak & Chet (1986) estudaram a viabilidade de *Trichoderma hamatum* e seu hospedeiro *R. solani* durante o processo de micoparasitismo. Quando os fungos foram cultivados isoladamente, pode-se observar a viabilidade até 4 dias. Quando cultivados conjuntamente, a viabilidade de *R. solani* decresceu rapidamente, enquanto a de *T. hamatum* se manteve. Essa técnica mostrou-se bem interessante, indicando que o ataque inicial do micoparasito ocorre enquanto o hospedeiro ainda está vivo.

Segundo De la Cruz et al. (1995), as enzimas de espécies de *Trichoderma* que degradam paredes celulares de fungos têm sido sugeridas como tendo um importante papel na ação micoparasítica sobre fungos patogênicos a plantas. *T. harzianum* produz pelo menos duas β -1,6-glucanases extracelulares, além de outras hidrolases. Uma destas enzimas extracelulares foi purificada, tendo um peso molecular aparente de 43.000, e ponto isoelétrico de 5,8. Caracterizações posteriores indicaram que a enzima degrada açúcares solúveis e produz halos hidrolíticos em paredes celulares de leveduras. Esta enzima, quando combinada com outras substâncias degradadoras de parede celular de *T. harzianum*, como β -1,3-glucanases e quitinases, permite ao fungo hidrolisar células de paredes de fungos filamentosos, inibindo, assim, o seu crescimento.

Inbar et al. (1996) investigaram interações hifais entre *T. harzianum* e *Sclerotinia sclerotiorum*, um fungo de solo, patógeno de plantas, por meio de técnicas de microscopia óptica e eletrônica de varredura em solo estéril e cultura dualística. As hifas de *T. harzianum* cresceram sobre as de *Sclerotinia*, sendo observada, nos estágios finais do parasitismo, uma degradação parcial da parede celular, além do crescimento de estruturas semelhantes a apressórios, facilitando o envolvimento e penetração de hifas e escleródios pelo fungo *T. harzianum*.

Segundo Krieg (1971), todos os tipos de interações têm sido observados com patógenos de insetos. O antagonismo é equivalente à redução na virulência e, em princípio, pode ocorrer entre diferentes microrganismos, bem como entre isolados de um mesmo patógeno. No caso de bactérias, os bacteriófagos podem causar conversão genética ou transdução. Isto é possível porque o material genético dos fagos e da bactéria hospedeira são derivados de ancestrais comuns (bactérias lisogênicas). Bacteriófagos têm sido relatados para *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*, assim como para *B. thuringiensis*. Preparações comerciais de *B. thuringiensis* frequentemente contém bactérias lisogênicas ou são contaminados por fagos, que causam durante a fase vegetativa do processo de fermentação uma redução de eficiência devido à esporulação incompleta e pequena produção de cristais parasporais. Outro problema é a possível proteção de insetos contra infecções bacterianas por competição com a microflora no trato digestivo. Ko et al. (1982) trabalharam com a incubação de *C. formosanus* em solos coletados de vários locais do Havai (EUA). Mais de 70% dos cupins morreram em duas semanas em sete de nove amostras coletadas de uma região conhecida como Kamella. Nas amostras testemunhas, permaneceram vivos por mais de quatro semanas. Dos cupins mortos foram isolados *E. coronata*, *M. anisopliae*, *Aspergillus flavus* e uma bactéria não identificada. Um solo que era inócuo aos cupins, da localidade de Hilo, tornou-se patogênico quando inoculado com *E. coronata* e *M. anisopliae*. Relataram que no Havai, *C. formosanus* é uma importante praga de estruturas de madeira nas regiões de Hilo e Kona, mas nunca foi observado em Kamella. A presença de fungos patogênicos nestes solos pode ser um dos fatores que previne contra o estabelecimento do cupim nestas áreas.

Fargues et al. (1983) estudaram a sobrevivência de blastósporos de *B. bassiana* puros e protegidos por uma capa de argila no solo por um método de biodegradação experimental usando uma técnica de armadilhas. Por vários tempos de incubação, as armadilhas foram coletadas para estudar mudanças na biomassa, potencial de inóculo e potencial de infecção dos blastósporos degradados e para investigar a colonização da biomassa de blastósporos por microrganismos antagônicos do solo. O potencial de

infecção foi testado em larvas de *Plutella maculipennis* e *Leptinotarsa decemlineata*. Os esporos puros foram inativados em três semanas, enquanto que os protegidos ficaram ativos por dois meses no solo a 20°C. Todos os estudos mostraram o papel da proteção da argila contra a biodegradação de propágulos do fungo por bactérias e protozoários do solo, gerando a indicação da utilização deste método para formulação destes fungos. Os antagonistas atuaram por meio da lise dos blastósporos, sendo considerados como uma importante parte da resposta ambiental à introdução massal de fungos no controle de insetos. Usou-se bentonita 1:1 com blastósporos em água. As bactérias causaram o decréscimo das reservas intracitoplasmáticas dos blastósporos, causando autólise. Este efeito foi mais tardio nos blastósporos protegidos, permanecendo o conteúdo celular não danificado por um longo período de tempo. Além disso, observou-se a presença de perfurações e depressões nas paredes dos esporos, causadas por bactérias e amebas.

Lytikova (1990) conduziu estudos na Turkmenia (ex-União Soviética), avaliando a influência de substratos do solo de um ninho de *Acanthotermes ahngerianus* no desenvolvimento de *B. bassiana*, *A. flavus* e *Penicillium verrucosum cyclopium*. O meio não promoveu o desenvolvimento dos fungos, indicando fungistase no ambiente do ninho. Isto pode afetar o possível uso dos fungos patogênicos no controle dos cupins. Markova (1991) citou que o ascomiceto hiperparasítico *Melanospora parasitica* é conhecido por atacar deuteromicetos que infectam insetos. Tem sido detectado colonizando *B. bassiana*, *P. farinosus*, *Isaria psychidae*, *Cephalosporium longisporum* e *Cordyceps militaris*, que se desenvolvem em vários insetos, como moscas brancas, cochonilhas etc. Houve a suspensão da esporulação e crescimento do fungo hospedeiro após três passagens em culturas infestadas no meio Czapeck Dox. Usando-se *Sitophilus oryzae* como inseto-teste, verificou-se decréscimo da atividade de *B. bassiana*, sem determinar se foi por efeitos de algum metabólito ou pela limitação do crescimento e esporulação pelo parasitismo do fungo na cutícula do inseto.

Krasnoff & Gupta (1994) extraíram, com o solvente diclorometano, extratos de culturas de três isolados do fungo entomopatogênico *Hirsutella thompsonii* var. *synnematos*, que foram tóxicos a *Rhagoletis pomonella* e *Ceratitis capitata* e inibiram a

germinação de conídios *in vitro* de vários outros fungos entomopatogênicos, incluindo *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Tolypocladium* sp. Um desses extratos, inibitório da germinação de conídios de *B. bassiana*, foi isolado e identificado como sendo o antibiótico fomalactona. Este é o primeiro ingrediente biologicamente ativo de baixo peso molecular isolado do gênero *Hirsutella*. Jeffries & Young (1994) citaram que *Syspastospora parasitica* parasita *Isaria farinosa* e *B. bassiana*, além de *P. farinosus*. Também citaram que, na Inglaterra, foi encontrado o ascomiceto *M. fusispora* parasitando *B. bassiana* e *P. farinosus*. Esse aspecto pode ter reflexos na eficiência de controle de insetos, quando, por exemplo, utiliza-se um fungo entomopatogênico para o controle de uma determinada praga de solo, no qual pode ocorrer a competição ou parasitismo com microrganismos antagônicos.

Bettiol & Ghini (1995), referindo-se ao controle biológico de doenças de plantas, citaram que doença, no contexto do controle biológico, é mais que uma íntima interação do patógeno com o hospedeiro influenciada pelo ambiente. É o resultado de uma interação entre o hospedeiro, o patógeno e diversos não patógenos que também habitam o sítio de infecção e que apresentam potencial para limitar a atividade do patógeno ou aumentar a resistência do hospedeiro. Apesar da utilização dos microrganismos antagônicos ter como objetivo o controle de fitopatógenos, diversos efeitos podem ser observados, após a sua aplicação, sobre outros organismos presentes no ambiente. Com relação a fungos entomopatogênicos, não são encontrados trabalhos que avaliem o potencial antagonístico de *Trichoderma*. No entanto, observações no Laboratório de Patologia de Insetos (Departamento de Entomologia - ESALQ/USP), têm instigado sobre os efeitos desse fungo no desenvolvimento, principalmente, de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, entre outros entomopatógenos.

Assim, há necessidade de estudos pormenorizados no sentido de avaliar os possíveis impactos causados pelo uso do agente de controle biológico no ambiente, inclusive sobre a influência de microrganismos antagônicos ou parasíticos na eficiência de agentes de controle microbiano de insetos.

3 EFEITO DA FLORA MICROBIANA DO SOLO SOBRE A EFICIÊNCIA DE *Beauveria bassiana* E *Metarhizium anisopliae* NO CONTROLE DE *Heterotermes tenuis*

3.1 Introdução

O solo, meio físico em que vivem os cupins, é de uma complexidade muito grande, podendo, em alguns casos, prejudicar o estabelecimento dos entomopatógenos como agentes de controle. Jeffries & Young (1994) ressaltaram o efeito antagônico ou parasítico de um grande número de espécies de fungos de solo. Alguns destes podem, sem dúvida, estabelecer relações de micoparasitismo ou competição com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, quando os últimos são adicionados ao solo visando ao controle de *H. tenuis*. A presença de fatores bióticos inibindo a ação do entomopatógeno sobre a praga-alvo deve ser considerada como ponto determinante na escolha da melhor estratégia de aplicação do agente de controle microbiano.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de *B. bassiana* e de *M. anisopliae* no controle de *H. tenuis* quando adicionados a dois tipos de solos, esterilizados ou não, visando detectar o efeito de agentes antagônicos presentes no solo sobre a atividade dos entomopatógenos.

3.2 Material e métodos

Foram utilizados neste estudo os isolados 634 de *B. bassiana*, proveniente de *Solenopsis invicta*, coletado em Cuiabá, MT, já anteriormente selecionado para o

controle de *H. temuis* (Almeida, 1994), e o isolado E-9 de *M. anisopliae*, oriundo de *Deois flavopicta*, coletado em Vitória, ES, sendo este último, um dos isolados mais estudados em programas de controle microbiano desenvolvidos no Laboratório de Patologia de Insetos, do Departamento de Entomologia (ESALQ/USP).

Inicialmente, os isolados, que se encontravam armazenados no banco de patógenos do referido laboratório, na forma de conídios em tubos plásticos do tipo Ependorff, mantidos a - 4°C, foram repicados por meio de semeadura com alça de platina e posterior espalhamento com alça de Drigalski, em placas de Petri com meio específico para esporulação (MC), com a seguinte composição:

Fosfato de potássio	0,36 g
Fosfato de sódio	1,05 g
Sulfato de magnésio	0,60 g
Cloreto de potássio	1,00 g
Glicose	10,00 g
Nitrato de sódio	1,58 g
Extrato de levedura.....	5,00 g
Ágar	20,00 g
Água destilada	1000,00 ml

As placas foram transferidas, após a repicagem, para estufas incubadoras B.O.D. (Fanem, modelo 347-G) a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas, nas quais foram mantidas por um período de 8 dias. Em seguida, o material obtido nas placas (micélio + conídios) foi retirado com alça de borracha e coado em tecido do tipo “voil”, com adição de água destilada estéril. As suspensões obtidas foram inoculadas em arroz pré-cozido e autoclavado para a produção dos fungos em maior escala, segundo o método Biomax®, descrito por Alves & Pereira (1989).

Os conídios produzidos foram então separados por meio de peneiramento do arroz, em aparato de plástico P.V.C. desenvolvido por Neves et al. (1991), e mantidos a

- 4°C. Esse material armazenado foi submetido à avaliação da viabilidade dos conídios, sempre que necessária a sua utilização para a execução dos experimentos. Essa avaliação foi feita por meio de plaqueamento em meio BDA (batata-dextrose-água) de alíquotas de 0,1 ml de uma suspensão de conídios de aproximadamente 1×10^8 conídios/ml. Decorrido um período de 20 horas após o plaqueamento, procedeu-se à contagem do número de conídios germinados ou não no campo obtido pela observação em ocular com aumento de 10 vezes e objetiva com aumento de 45 vezes, totalizando um aumento de 450 vezes, em microscópio óptico de fase (American Optical Phase Star, modelo 1043 A).

Os conídios dos fungos foram adicionados a dois tipos de solos. O primeiro, podzolizado, de textura arenosa, coletado na área de produção canavieira da Usina Costa Pinto, em Piracicaba, SP, e o segundo, latossólico, argiloso, proveniente de canavial da área experimental do Departamento de Entomologia (ESALQ/USP).

A esterilização dos solos foi feita por autoclavagem a 120°C por 20 minutos, com pressão de 1 atm, em sacos de poliestireno de 35,5 x 42,0 cm (Fischer Scientific, tipo 01-814 A). Os solos, esterilizados ou não, foram acondicionados em seguida, no interior de uma câmara asséptica de fluxo laminar (VECO, modelo VLFS-12), em sacos plásticos de polipropileno, em amostras de 1,0 kg, nas quais foram misturados os conídios, nas concentrações de 1×10^4 ; 1×10^5 ; 1×10^6 ; 1×10^7 e 1×10^8 conídios por grama de solo. Em seguida, após severa agitação manual, os solos inoculados e o tratamento testemunha (sem adição de fungo) foram divididos em alíquotas de 100 g em copos plásticos de poliestireno de 5 x 9 x 7,5 cm com gesso tipo pedra ao fundo. Os copos foram colocados em bandejas plásticas de 45 x 30 x 10 cm com placa de espuma umedecida ao fundo, e a manutenção da umidade foi feita com a pulverização de água destilada estéril diariamente, sendo as bandejas cobertas com plástico transparente.

Na superfície do solo, já nos copos plásticos, foram introduzidos pedaços de papelão corrugado de 3 x 3 cm para servir de abrigo e alimento aos operários de *H. temis*, os quais foram adicionados ao conjunto em número de 30 insetos por repetição. Esses insetos foram coletados no campo de produção da Usina Costa Pinto, em área

monitorada há cerca de 5 anos pela colocação de armadilhas de papelão corrugado (Termitrap®), desenvolvidas por Almeida & Alves (1995). Detalhes dessa metodologia podem ser visualizados na Figura 3.1.

As bandejas com os copos plásticos foram mantidas em sala escura, com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 10\%$. A avaliação foi feita diariamente, contando-se o número de indivíduos mortos, os quais, em seguida, foram lavados em álcool 96 GL e água destilada estéril, para desinfestação de possíveis contaminantes externos, e mantidos em placas de Petri com papel de filtro (marca Fischer Scientific Q8, de 9,0 cm de diâmetro) esterilizados em estufa a 150°C , umedecidos com água destilada estéril, para a confirmação da mortalidade causada pelos patógenos, por meio da observação da conidiogênese nos cadáveres.

Os experimentos constaram de 6 tratamentos para cada tipo de solo, sendo repetidos para amostras de solo esterilizado ou não (fatorial 2×6), com 5 repetições por tratamento em delineamento inteiramente casualizado. Os valores de mortalidade de operários de *H. tenuis* foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($P < 0,05$) para comparação entre as médias dentro do fator solo, e regressão polinomial para a determinação dos modelos aos quais se ajustaram os dados de mortalidade em função das concentrações utilizadas. Os dados originais foram transformados pela expressão $\arcsen \sqrt{x/100}$.

Paralelamente à execução dos experimentos, foi feito o plaqueamento de alíquotas de 0,1 g dos dois tipos de solos não-esterilizados, diluídas 10^3 e 10^4 vezes, em meio seletivo para isolamento de fungos entomopatogênicos (modificado de Chase et al., 1986), visando o isolamento de algum microrganismo antagônico aos entomopatógenos. O meio utilizado (Dodine) tinha a seguinte composição:

Aveia	20,00 g
Ágar	20,00 g
Dodine.....	1,10 g
Tetraciclina	200,00 mg
Água destilada	1000,00 ml

Figura 3.1 - A) Isca de papelão corrugado (Termitrap®) para monitoramento e controle de *H. tenuis*; B) Copo de poliestireno com solo e pedaço de papelão corrugado; C) Bandeja plástica para acondicionamento dos copos; D) Detalhe da conidiogênese de *B. bassiana* (isolado 634) em operário de *H. tenuis* no solo tratado

3.3 Resultados e discussão

De maneira geral, os insetos que ficaram no solo não-esterilizado permaneceram sadios por mais tempo, em comparação com aqueles mantidos no solo esterilizado, principalmente nas concentrações maiores, onde a mortalidade foi mais rápida. Os insetos mortos mostraram-se inicialmente com uma coloração rosada, característica devido à morte por *B. bassiana*, o que já não ocorreu com *M. anisopliae*. Os insetos, no caso dos dois fungos, mostravam-se menos móveis, permanecendo agrupados no papelão que servia de abrigo e alimentação, geralmente um dia antes de ocorrer a mortalidade, talvez fugindo da ação do fungo, já detectado no solo. Esse fato ocorreu mais frequentemente, como já ressaltado, nas concentrações mais elevadas (1×10^7 , 1×10^8). No caso específico dos experimentos com *M. anisopliae*, os insetos apresentaram os sintomas de perda da mobilidade e agregação, já nas concentrações menores (1×10^5 , 1×10^6), a partir, principalmente, do quarto dia.

Alguns insetos, mortos nas concentrações mais altas, apresentavam-se em início de conidiogênese, já no dia seguinte, o que permitiu a visualização deste evento, e, portanto, a confirmação da mortalidade pelo fungo, ainda dentro do copo plástico onde foi conduzido o experimento, sem necessidade de transferência dos insetos para a câmara úmida.

Nos isolamentos realizados com a utilização do meio Dodine, nas diluições de 10^{-3} e 10^{-4} , observou-se, nos dois tipos de solos, o aparecimento de uma grande quantidade de microrganismos, principalmente fungos e leveduras. Poucas colônias de bactérias foram isoladas, provavelmente porque esse meio é bem seletivo para fungos. Entre os fungos, pôde-se identificar colônias de alguns bem comuns, como os gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Neurospora*, além da presença bem freqüente de *Trichoderma* sp., reconhecido por seu potencial como antagonista em solos. Dessa forma, esse fungo foi isolado e purificado, sendo utilizado em experimentos posteriores neste estudo. Um trabalho mais profundo seria interessante e necessário, fazendo-se o isolamento da maioria dos microrganismos presentes nesses solos, bem como sua identificação,

avaliando-se o seu efeito antagônico sobre os entomopatógenos, pois esse efeito pode ser uma somatória de características dos diversos microrganismos, e não somente de *Trichoderma* sp., que foi utilizado nesse estudo (Capítulo 4) como um microrganismo-teste, para se avaliar a existência desse tipo de relação antagônica/parasítica com entomopatógenos utilizados para o controle de cupins subterrâneos.

Para o fungo *B. bassiana*, quando inoculado em solo arenoso não-esterilizado, notou-se que houve, ao longo do tempo, menor eficiência das concentrações mais baixas (1×10^4 a 1×10^6). Entretanto, ao final do décimo dia, a mortalidade esteve acima de 90% para todas as concentrações (Figura 3.3). No solo esterilizado, já no sexto dia após a inoculação, observou-se mortalidades próximas a 100% em todas as concentrações (Figura 3.3). Foram obtidas equações de regressão de segundo grau para o solo arenoso, em ambos os tratamentos (solo esterilizado ou não) (Figura 3.2). A maior diferença foi observada em torno da concentração de 1×10^5 (Tabela 3.1). As diferenças nessa concentração determinaram o efeito da interação entre os dois fatores, resultando nos dois modelos obtidos.

Tabela 3.1 - Porcentagens médias de mortalidade confirmada de operários de *Heterotermes tenuis* 4 dias após a inoculação de *Beauveria bassiana* (isolado 634) em solo arenoso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$)

Concentrações (g de conídios/g de solo)	Mortalidade (%)	
	Solo esterilizado	Solo não-esterilizado
Testemunha	$0,00 \pm 0,00$ a	$0,00 \pm 0,00$ a
1×10^4	$3,69 \pm 3,68$ a	$10,26 \pm 4,35$ a
1×10^5	$26,41 \pm 3,38$ a	$3,69 \pm 3,69$ b
1×10^6	$22,62 \pm 5,71$ a	$21,33 \pm 2,82$ a
1×10^7	$51,71 \pm 5,54$ a	$49,46 \pm 4,01$ a
1×10^8	$84,90 \pm 3,20$ a	$90,00 \pm 0,00$ a

Médias seguidas por letras distintas nas linhas, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey

Figura 3.2 - Equações de regressão para porcentagens médias de mortalidade confirmada de operários de *Heterotermes tenuis* 4 dias após a inoculação de *Beauveria bassiana* (isolado 634) em solo arenoso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$)

Figura 3.3 - Porcentagens de mortalidade confirmada diária de *Heterotermes tenuis* após a inoculação de *Beauveria bassiana* (isolado 634) em solo arenoso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$)

Para o solo argiloso, as diferenças foram mais consistentes nas concentrações maiores, a partir de 1×10^6 (Tabela 3.2). Resultaram duas regressões, de segundo grau para o solo esterilizado e de terceiro grau para o solo não-esterilizado (Figura 3.4). O efeito das concentrações menores só passou a ser significativo no sexto dia, no solo esterilizado (Figura 3.5), e no solo não-esterilizado o comportamento foi semelhante ao observado para o solo arenoso (Figura 3.5).

Tabela 3.2 - Porcentagens médias de mortalidade confirmada de operários de *Heterotermes tenuis* 4 dias após a inoculação de *Beauveria bassiana* (isolado 634) em solo argiloso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$)

Concentrações (g de conídios/g de solo)	Mortalidade (%)	
	Solo esterilizado	Solo não-esterilizado
Testemunha	$0,00 \pm 0,00$ a	$0,00 \pm 0,00$ a
1×10^4	$12,66 \pm 3,24$ a	$6,31 \pm 2,57$ a
1×10^5	$7,27 \pm 4,57$ a	$5,09 \pm 3,19$ a
1×10^6	$18,22 \pm 4,14$ a	$12,90 \pm 3,91$ a
1×10^7	$52,75 \pm 9,89$ a	$22,56 \pm 5,80$ b
1×10^8	$87,89 \pm 2,11$ a	$85,79 \pm 2,58$ a

Médias seguidas por letras distintas nas linhas, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey

Figura 3.4 - Equações de regressão para porcentagens médias de mortalidade confirmada de operários de *Heterotermes tenuis* 4 dias após a inoculação de *Beauveria bassiana* (isolado 634) em solo argiloso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$)

Figura 3.5 - Porcentagens de mortalidade confirmada diária de *Heterotermes tenuis* após a inoculação de *Beauveria bassiana* (isolado 634) em solo argiloso esterilizado ou não (Temperatura = 25 ± 1°C; Umidade Relativa = 70 ± 10%)

Quando o fungo *B. bassiana* foi inoculado em solo esterilizado, a mortalidade ocorreu mais rapidamente e em concentrações menores que no solo não-esterilizado, embora os índices de mortalidade nas concentrações mais elevadas tenha sido igualado nos dois tratamentos. Não se observaram grandes diferenças entre o solo arenoso e argiloso. Poder-se-ia esperar um efeito maior no solo argiloso, considerando-se que este fosse apresentar uma composição microbiana mais complexa e diversa que o solo arenoso, porém, isso não foi detectado. Como já dito, o material isolado nos plaqueamentos desses dois tipos de solos foi bem homogêneo, sem grandes variações na sua composição. Ko et al. (1982) coletaram solos de vários locais do Havai, nos EUA, nos quais introduziram indivíduos de *Coptotermes formosanus*. Mais de 70% dos cupins morreram em duas semanas em sete de nove amostras coletadas de uma determinada região, nas quais foi recuperado um grande número de fungos entomopatogênicos. Por outro lado, havia um solo que era inócuo aos cupins, provavelmente por haver, nesse solo, microrganismos que competiam com os entomopatógenos existentes. Mesmo assim, quando adicionados a esse solo os fungos *Entomophthora coronata* e *M. anisopliae*, ocorreu a mortalidade dos cupins.

Para o fungo *M. anisopliae*, em solo arenoso, não houve diferença entre os tratamentos esterilizado e não-esterilizado, que responderam a uma mesma regressão estimada do terceiro grau (Tabela 3.3 e Figura 3.6). Na concentração de 1×10^5 , por exemplo, a média reflete uma diferença numérica grande, mas a heterogeneidade dos dados obtidos não permite a diferenciação dos modelos (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Porcentagens médias de mortalidade confirmada de operários de *Heterotermes tenuis* 4 dias após a inoculação de *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) em solo arenoso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$)

Concentrações (g de conídios/g de solo)	Mortalidade (%)	
	Solo esterilizado	Solo não-esterilizado
Testemunha	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
1×10^4	$24,38 \pm 10,13$	$16,40 \pm 2,61$
1×10^5	$40,82 \pm 11,99$	$18,91 \pm 2,93$
1×10^6	$79,03 \pm 4,59$	$60,89 \pm 15,84$
1×10^7	$90,00 \pm 0,00$	$90,00 \pm 0,00$
1×10^8	$90,00 \pm 0,00$	$90,00 \pm 0,00$
Médias	54,04 a	46,03 a

Médias seguidas por letras distintas nas linhas, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey

Figura 3.6 - Equação de regressão para porcentagens médias de mortalidade confirmada de operários de *Heterotermes tenuis* 4 dias após a inoculação de *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) em solo arenoso (Temperatura = $25 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$)

Analisando as mortalidades diárias obtidas, no solo arenoso esterilizado, notam-se valores semelhantes aos obtidos para *B. bassiana*, com a diferença de que as concentrações mais altas (1×10^7 e 1×10^8) matam ainda mais rapidamente (Figura 3.7). No caso do solo arenoso não-esterilizado, isso também ocorre, ou seja, não existe muita diferença para as concentrações altas, sendo que as concentrações mais baixas (1×10^4 , 1×10^5) demoram a se estabelecer, resultando em índices muito baixos de mortalidade (Figura 3.7).

Figura 3.7 - Porcentagens de mortalidade confirmada diária de *Heterotermes tenuis* após a inoculação de *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) em solo arenoso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$)

Para o caso do solo argiloso, as concentrações de 1×10^5 e 1×10^6 diferiram significativamente, resultando em duas regressões, ambas de terceiro grau (Figura 3.8), Tabela 3.4). Pela análise gráfica, verifica-se valores bem semelhantes aos obtidos com *B. bassiana*, sendo que os níveis de mortalidade para as concentrações mais altas (1×10^7 e 1×10^8) são obtidos mais rapidamente, e o solo esterilizado, semelhantemente ao não-esterilizado, promove, no oitavo dia, altos níveis de mortalidade em todas as concentrações (Figura 3.9).

Tabela 3.4 - Porcentagens médias de mortalidade confirmada de operários de *Heterotermes tenuis* 4 dias após a inoculação de *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) em solo argiloso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$)

Concentrações (g de conídios/g de solo)	Mortalidade (%)	
	Solo esterilizado	Solo não-esterilizado
Testemunha	$0,00 \pm 0,00$ a	$0,00 \pm 0,00$ a
1×10^4	$14,79 \pm 4,48$ a	$14,73 \pm 7,02$ a
1×10^5	$20,95 \pm 3,65$ a	$0,00 \pm 0,00$ b
1×10^6	$53,41 \pm 3,86$ a	$67,27 \pm 6,44$ b
1×10^7	$90,00 \pm 0,00$ a	$90,00 \pm 0,00$ a
1×10^8	$90,00 \pm 0,00$ a	$90,00 \pm 0,00$ a

Médias seguidas por letras distintas nas linhas, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey

Figura 3.8 - Equações de regressão para porcentagens médias de mortalidade confirmada de operários de *Heterotermes tenuis* 4 dias após a inoculação de *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) em solo argiloso esterilizado ou não (Temperatura = $25 \pm 1^\circ\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$)

Figura 3.9 - Porcentagens de mortalidade confirmada diária de *Heterotermes tenuis* após a inoculação de *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) em solo argiloso esterilizado ou não (Temperatura = 25 ± 1°C; Umidade Relativa = 70 ± 10%)

Para *B. bassiana*, pode-se dizer que a mortalidade de *H. tenuis* ocorre mais rapidamente no solo esterilizado, e em menores concentrações que no solo não-esterilizado, o mesmo não podendo ser afirmado para *M. anisopliae*. Este fungo, em todos os casos estudados, mostrou-se mais virulento que *B. bassiana*, promovendo níveis superiores de mortalidade em menor tempo, independente do tratamento (solo esterilizado ou não).

Apesar da grande variação nos resultados obtidos, pôde-se observar que até o segundo dia após a inoculação de *B. bassiana*, não ocorreu mortalidade dos cupins, ou, no máximo, foram observados baixos níveis de mortalidade, principalmente nas concentrações mais elevadas (1×10^7 , 1×10^8). Já com relação a *M. anisopliae*, na concentração mais elevada (1×10^8), ocorreu 100% de mortalidade a partir do segundo dia, em solo arenoso esterilizado ou não. Porém, decidiu-se utilizar os dados obtidos no quarto dia para a comparação entre os tratamentos, já que a distribuição da mortalidade nesse dia foi bem regular, variando entre 0 e 100% nas diferentes concentrações estudadas. Quando se observam os dados diários de mortalidade, a partir do sexto e sétimo dias, principalmente, verifica-se que os maiores níveis de mortalidade já haviam sido atingidos, inclusive nas concentrações mais baixas.

Um fato a ser considerado é o de que as concentrações utilizadas nesse experimento são altas, mesmo as menores. Isso foi necessário devido à não praticidade de se trabalhar com quantidades muito pequenas do fungo. Por exemplo, para *B. bassiana*, considerando-se que 1 g de conídios tem aproximadamente 1×10^{10} conídios, têm-se 0,001 g de fungo a ser adicionado em 1 kg de solo, para se manter a proporção desejada (1×10^4 conídios/g de solo), o que revela que quantidades menores seriam impraticáveis. Isso também explica o porquê da inviabilidade da utilização de uma estratégia de introdução inundativa para o controle de *H. tenuis*. Por exemplo, para que a concentração de 1×10^7 conídios/g de solo seja eficiente para o controle, levando-se em conta a incorporação do fungo no sulco de plantio numa faixa de 10 cm de profundidade por 10 cm de largura, seria necessária a aplicação de cerca de 80 kg de conídios em 1 hectare.

Esse cálculo teórico indica que, no caso de insetos de solo, em especial no controle de cupins subterrâneos, a estratégia de introdução inoculativa, ou seja, o uso de iscas atrativas impregnadas com entomopatógenos, sejam esses associados ou não a algum outro ingrediente ativo, configura-se como a única estratégia aplicável.

Deve ser aqui lembrado que a análise de Probit é muito utilizada em patologia de insetos para a determinação de CL_{50} e TL_{50} , envolvendo o controle de determinada praga por um entomopatógeno. Algumas premissas básicas para que se utilize esse modelo são necessárias, tais como a ausência de sucesso ou fracasso total nos tratamentos utilizados, a homogeneidade da população utilizada, e a independência entre os dados obtidos. No caso do presente estudo, os dados obtidos não se ajustam ao modelo de Probit, como pôde-se verificar, observando-se a irregularidade das mortalidades diárias obtidas. Em alguns casos, até o segundo ou terceiro dia, não havia mortalidade alguma, verificando-se, em seguida, a ocorrência de mortalidade total, em um só dia. Essa situação gera valores de χ^2 significativos na comparação das regressões obtidas, o que invalida o modelo. Além disso, não se costuma fazer, em experimentos de controle microbiano de insetos, várias amostras de uma mesma repetição, para que sejam eliminadas após cada avaliação, o que garantiria a exigência de independência entre os dados obtidos. Assim, verifica-se que a maioria dos trabalhos sobre controle microbiano não obedece a esse preceito, seja pelo fato de o experimento tornar-se mais trabalhoso, seja pela dificuldade na obtenção de valores diários crescentes na relação concentração/resposta. Moorhouse (1993), selecionando isolados de *Metarhizium* spp. para o controle de *Otiorhynchus sulcatus*, citou que os valores obtidos utilizando-se a análise de Probit para a comparação entre os isolados deveriam ser observados com bastante cuidado, justamente por não serem independentes. Por essa razão, segundo o autor, os valores de TL_{50} obtidos foram estimados, sem ser possível o cálculo de erros-padrão e intervalos de confiança. Alguns programas até realizam esses cálculos, mas fora das exigências básicas do modelo. Dessa forma, o autor utilizou, na sua comparação, os valores estimados aliados à análise com teste “t”.

A utilização da regressão polinomial é um método que assegura que, no intervalo estudado, o fator analisado responde à equação estimada, sendo a prática mais usual na análise de variáveis contínuas, como é o caso das concentrações de fungo resultando na mortalidade de cupins. Outro fator a ser considerado é que, no caso dos cupins, como é difícil a criação em laboratório, os bioensaios foram realizados com insetos coletados no campo. Dessa forma, a heterogeneidade entre os indivíduos não pode ser controlada, embora possa-se assumir que insetos presentes numa mesma coleta pertençam a uma mesma colônia. Mesmo assim, a variabilidade natural da colônia no campo se expressa, o que seria bem mais controlado numa criação de laboratório.

4 EFEITO ANTAGÔNICO DE *Trichoderma* sp. NO DESENVOLVIMENTO DE *Beauveria bassiana* E *Metarhizium anisopliae*

4.1 Introdução

Algumas espécies de *Trichoderma* têm sido estudadas com relação à sua capacidade competitiva com fungos fitopatogênicos devida à sua rápida taxa de crescimento micelial e a um antagonismo direto, envolvendo enrolamento de hifas e penetração, com secreção de antibióticos deletérios ao hospedeiro (Jeffries & Young, 1994). *T. harzianum* produz pelo menos duas β -1,6-glucanases extracelulares, além de outras hidrolases (De la Cruz et al., 1995). Com relação a entomopatógenos, Markova (1991) citou que o fungo *Melanospora parasitica* tem sido detectado atacando *B. bassiana*, *P. farinosus*, *Isaria psychidae*, *Cephalosporium longisporum* e *Cordyceps militaris*, fungos patogênicos a vários insetos, como moscas brancas e cochonilhas. Em *B. bassiana*, esse fungo causou a suspensão da esporulação e crescimento micelial. Mesmo entre entomopatógenos distintos pode ocorrer competição, como no caso de *Hirsutella thompsonii* var. *synnematos*, cujos metabólitos tóxicos inibiram a germinação de conídios de vários outros fungos entomopatogênicos, incluindo *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Tolypocladium* sp. (Krasnoff & Gupta, 1994).

Fungos do gênero *Trichoderma* estão sendo utilizados em programas de controle de doenças de plantas. Considerando-se que fungos deste gênero são abundantes no solo e conhecendo-se essas características que o classificam como competidor e parasito de outros microrganismos, pode-se inferir sobre sua atuação como inibidor do

desenvolvimento de agentes microbianos de controle de insetos, quando estes localizam-se no solo, como é o caso dos cupins subterrâneos.

O objetivo do trabalho foi avaliar um possível efeito antagonístico de *Trichoderma* sp. no desenvolvimento de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, com o intuito de determinar as causas do efeito inibidor promovido pelo primeiro sobre os dois entomopatógenos.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Efeito de *Trichoderma* sp. no crescimento vegetativo de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* *in vitro*

Os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* (isolado 634) e *M. anisopliae* (isolado E-9) foram inoculados em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), com posterior inoculação de *Trichoderma* sp., em diferentes períodos de tempo decorridos após o plaqueamento dos entomopatógenos. A inoculação dos fungos foi feita por meio de uma alça de platina, sendo os entomopatógenos inoculados em 4 pontos equidistantes e *Trichoderma* sp. na região central das placas de Petri. O inóculo dos entomopatógenos foi obtido a partir de material armazenado no banco de patógenos do Laboratório de Patologia de Insetos e o de *Trichoderma* sp. a partir de isolamento feito das amostras de solos utilizadas em experimentos anteriores (Capítulo 3).

Os períodos entre a inoculação dos entomopatógenos e de *Trichoderma* sp. foram de 0, 48, 120 e 168 horas. Cada tratamento foi repetido 6 vezes (6 placas por tratamento), em delineamento inteiramente casualizado, sendo os seguintes: *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Trichoderma* sp. (inoculados isoladamente), *B. bassiana* x *Trichoderma* sp. e *M. anisopliae* x *Trichoderma* sp. (inoculados conjuntamente).

As avaliações foram feitas decorridas 48 e 120 horas após a inoculação do fungo *Trichoderma* sp. em cada tratamento, sendo medido o diâmetro médio das colônias. Os

dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($P < 0,05$) para comparação entre as médias.

4.2.2 Efeito de extrato de *Trichoderma* sp. sobre o desenvolvimento de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

O fungo *Trichoderma* sp. foi produzido em meio líquido Czapeck Dox (Markova, 1991), específico para a extração de toxinas, com a seguinte composição:

Fosfato dibásico de potássio.....	0,5 g
Sulfato ferroso	0,005 g
Glicose	10,0 g
Nitrato de sódio.....	1,0 g
Cloreto de potássio	0,25 g
Ágar	10,0 g
Água destilada	500,0 ml

Foram adicionados 50,0 ml do meio líquido em 16 frascos Erlenmeyer, nos quais foram colocados círculos de 0,5 cm de diâmetro, da cultura de *Trichoderma* sp. obtidas em placas com meio MC (ver Capítulo 3). Em seguida, os frascos, tampados com algodão hidrófobo, foram transferidos para incubadora com agitação (marca Marconi, modelo TE 420) com 184 rpm a 26°C, onde permaneceram por um período de 10 dias. Após esse período, o material contido nos frascos foi filtrado a vácuo, utilizando-se um funil de Büchner com papel de filtro, acoplado a um compressor de ar (marca Primar, modelo 141). Ao líquido filtrado foi adicionado o solvente orgânico diclorometano, na proporção de 2:1 em volume. A mistura (filtrado + solvente) permaneceu em processo de decantação por 24 horas em funil de separação. Após esse período, a fração dissolvida foi levada a um Rotavapor (marca Büchi, modelo 461 Water Bath), no Laboratório de

Toxicologia do Departamento de Entomologia (ESALQ/USP), sendo o material resultante após a evaporação do solvente utilizado para a experimentação.

O extrato foi lavado em água destilada estéril em balão volumétrico, visando o aproveitamento de todo o material. Assim, o volume obtido (extrato + água destilada estéril) totalizou 9 ml.

Esse material obtido foi adicionado nas proporções de 0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 ml por 100,0 ml de meio de cultura BDA, quando este ainda se encontrava liqüefeito, com temperatura em torno dos 40°C. Além desses tratamentos, foi feito um tratamento testemunha (BDA sem adição do extrato) e um tratamento branco (BDA mais 5,0 ml de diclorometano/100,0 ml de meio), visando detectar um possível efeito do solvente utilizado sobre o desenvolvimento dos entomopatógenos. Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram então inoculados no meio de cultura, após a sua solidificação, em 3 pontos equidistantes das placas, totalizando 12 colônias (4 placas por tratamento), das quais 6 colônias foram escolhidas aleatoriamente, totalizando 6 repetições por tratamento. Após a inoculação dos entomopatógenos, as placas foram mantidas em estufas incubadoras B.O.D. a $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$, e fotofase de 12 horas, por um período de 10 dias, quando então foram medidos os diâmetros médios das colônias. Posteriormente, as mesmas foram recortadas do meio de cultura e colocadas em tubos de vidro de 9,0 cm x 3,0 cm, nos quais foram feitas as diluições necessárias em água destilada estéril mais espalhante adesivo Tween 80, para a contagem do número de conídios produzidos por colônia, em câmara de Neubauer.

Para que se procedesse a contagem, as colônias recortadas foram pinceladas para facilitar o desprendimento dos conídios e, depois, passaram por agitação em equipamento agitador de tubos (marca Marconi, modelo 162), para o completo desprendimento e suspensão dos mesmos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($P < 0,05$) para a comparação entre as médias.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Efeito de *Trichoderma* sp. no crescimento vegetativo de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* *in vitro*

Quando o fungo *Trichoderma* sp. foi inoculado simultaneamente com *B. bassiana* ou *M. anisopliae* (intervalo = 0 horas), pode-se observar, na avaliação de 48 horas após a inoculação de *Trichoderma* sp., que este fungo tem uma taxa de crescimento micelial muito rápida. Tanto no tratamento em que foi inoculado isoladamente, como naqueles em que foi inoculado conjuntamente com os dois entomopatógenos, *Trichoderma* sp. já ocupava praticamente dois terços do espaço existente no meio de cultura, a partir da região central onde foi inoculado. Nessa avaliação ainda não havia diferenciação entre as colônias de *B. bassiana* inoculadas isoladamente ou em conjunto com *Trichoderma* sp., o mesmo acontecendo com relação a *M. anisopliae*. Na avaliação de 120 horas, ficou evidente o efeito de *Trichoderma* sp. sobre os entomopatógenos. As colônias de *B. bassiana* inoculadas isoladamente atingiram, em média, diâmetros de cerca de 16 mm, contrastando com aquelas inoculadas conjuntamente com *Trichoderma* sp., as quais permaneceram com o tamanho médio de 2,35 mm, semelhante ao obtido na avaliação de 48 horas. O mesmo ocorreu com *M. anisopliae*, que depois de 120 horas apresentou diâmetro médio de colônias próximo a 15 mm quando inoculado isoladamente, contra cerca de 2 mm quando inoculado conjuntamente com *Trichoderma* sp. (Tabela 4.1, Figura 4.1).

Tabela 4.1 - Diâmetro médio de colônias (mm) de *Beauveria bassiana* (isolado 634), *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) e *Trichoderma* sp. inoculados simultaneamente em meio de cultura BDA, com avaliações 48 e 120 horas após a inoculação de *Trichoderma* sp. (Temperatura = $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$; Fotofase = 12 horas)

Fungo (Tratamento)	Diâmetro médio (mm)	
	48 horas	120 horas
<i>Trichoderma</i> sp. (+ <i>B. bassiana</i>)	68,66 $\pm$ 1,05 A a	90,00 $\pm$ 0,00 B a
<i>Trichoderma</i> sp. (+ <i>M. anisopliae</i>)	65,66 $\pm$ 0,56 A b	90,00 $\pm$ 0,00 B a
<i>Trichoderma</i> sp. (isoladamente)	66,16 $\pm$ 1,58 A b	90,00 $\pm$ 0,00 B a
<i>B. bassiana</i> (+ <i>Trichoderma</i> sp.)	2,98 $\pm$ 0,10 A c	2,35 $\pm$ 0,13 A d
<i>B. bassiana</i> (isoladamente)	2,81 $\pm$ 0,32 A c	16,71 $\pm$ 0,15 B b
<i>M. anisopliae</i> (+ <i>Trichoderma</i> sp.)	2,46 $\pm$ 0,15 A c	1,94 $\pm$ 0,16 A d
<i>M. anisopliae</i> (isoladamente)	3,27 $\pm$ 0,17 A c	14,33 $\pm$ 0,31 B c

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ($P < 0,05$), nas linhas (maiúsculas) e nas colunas (minúsculas), pelo teste de Tukey

Figura 4.1 - Diâmetro médio de colônias (mm) de *Beauveria bassiana* (isolado 634), *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) e *Trichoderma* sp. inoculados simultaneamente em meio de cultura BDA, com avaliações 48 e 120 horas após a inoculação de *Trichoderma* sp.

Quando a inoculação de *Trichoderma* sp. foi realizada num intervalo de 48 horas decorrido após a inoculação de *B. bassiana* ou *M. anisopliae*, observou-se que *Trichoderma* sp., na avaliação das 48 horas, assim como no experimento anterior, já ocupava boa parte do espaço disponível na placa. Porém, naqueles tratamentos em que *B. bassiana* ou *M. anisopliae* haviam sido inoculados anteriormente, o fungo teve seu crescimento um pouco prejudicado. Com relação a *B. bassiana* e *M. anisopliae*, notou-se que não houve diferença entre as colônias crescidas isoladamente ou na presença de *Trichoderma* sp. Na avaliação de 120 horas, também como ocorrido anteriormente, o fungo *Trichoderma* sp. já dominava totalmente o espaço da placa, enquanto que *B. bassiana* e *M. anisopliae*, quando inoculados isoladamente, cresceram quase o dobro das colônias inoculadas na presença de *Trichoderma* sp., as quais permaneceram com diâmetros semelhantes àqueles obtidos na avaliação de 48 horas, aproximadamente 11 mm (Tabela 4.2, Figura 4.2).

Tabela 4.2 - Diâmetro médio de colônias (mm) de *Beauveria bassiana* (isolado 634), *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) e *Trichoderma* sp. inoculados com intervalo de 48 horas em meio de cultura BDA, com avaliações 48 e 120 horas após a inoculação de *Trichoderma* sp. (Temperatura = $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$; Fotofase = 12 horas)

Fungo (Tratamento)	48 horas	120 horas
<i>Trichoderma</i> sp. (+ <i>B. bassiana</i>)	$55,83 \pm 1,40$ A b	$90,00 \pm 0,00$ B a
<i>Trichoderma</i> sp. (+ <i>M. anisopliae</i>)	$56,66 \pm 0,76$ A b	$90,00 \pm 0,00$ B a
<i>Trichoderma</i> sp. (isoladamente)	$68,66 \pm 1,58$ A a	$90,00 \pm 0,00$ B a
<i>B. bassiana</i> (+ <i>Trichoderma</i> sp.)	$11,87 \pm 0,37$ A c	$11,75 \pm 0,33$ A c
<i>B. bassiana</i> (isoladamente)	$11,83 \pm 0,36$ A c	$21,71 \pm 0,36$ Bb
<i>M. anisopliae</i> (+ <i>Trichoderma</i> sp.)	$10,37 \pm 0,29$ A c	$11,66 \pm 0,43$ A c
<i>M. anisopliae</i> (isoladamente)	$10,83 \pm 0,27$ A c	$19,33 \pm 0,32$ B b

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ($P < 0,05$), nas linhas (maiúsculas) e nas colunas (minúsculas), pelo teste de Tukey

Figura 4.2 - Diâmetro médio de colônias (mm) de *Beauveria bassiana* (isolado 634), *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) e *Trichoderma* sp. inoculados com intervalo de 48 horas em meio de cultura BDA, com avaliações 48 e 120 horas após a inoculação de *Trichoderma* sp.

Com relação ao experimento em que a inoculação de *Trichoderma* sp. foi feita após um intervalo de 120 horas decorrido da inoculação de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, o fungo *Trichoderma* sp. apresentou maior crescimento quando inoculado isoladamente que quando inoculado na presença dos entomopatógenos, na avaliação de 48 horas. *B. bassiana* e *M. anisopliae* apresentaram crescimento semelhante quando inoculados isoladamente ou na presença de *Trichoderma* sp. Por outro lado, na avaliação de 120 horas, mais uma vez *Trichoderma* sp. ocupou todo o espaço da placa, enquanto *B. bassiana* e *M. anisopliae* cresceram de forma semelhante quando inoculados isoladamente ou na presença de *Trichoderma* sp., mantendo os diâmetros médios observados na avaliação de 48 horas. (Tabela 4.3, Figura 4.3).

Tabela 4.3 - Diâmetro médio de colônias (mm) de *Beauveria bassiana* (isolado 634), *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) e *Trichoderma* sp. inoculados com intervalo de 120 horas em meio de cultura BDA, com avaliações 48 e 120 horas após a inoculação de *Trichoderma* sp. (Temperatura = $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$; Fotofase = 12 horas)

Fungo (Tratamento)	48 horas	120 horas
<i>Trichoderma</i> sp. (+ <i>B. bassiana</i>)	$50,66 \pm 1,36$ A c	$90,00 \pm 0,00$ B a
<i>Trichoderma</i> sp. (+ <i>M. anisopliae</i>)	$55,16 \pm 0,95$ A b	$90,00 \pm 0,00$ B a
<i>Trichoderma</i> sp. (isoladamente)	$68,66 \pm 1,58$ A a	$90,00 \pm 0,00$ B a
<i>B. bassiana</i> (+ <i>Trichoderma</i> sp.)	$23,96 \pm 0,68$ A d	$24,50 \pm 0,49$ A b
<i>B. bassiana</i> (isoladamente)	$24,08 \pm 0,64$ A d	$25,50 \pm 0,21$ A b
<i>M. anisopliae</i> (+ <i>Trichoderma</i> sp.)	$21,79 \pm 0,29$ A d	$22,58 \pm 0,51$ A b
<i>M. anisopliae</i> (isoladamente)	$21,58 \pm 0,31$ A d	$24,58 \pm 0,16$ B b

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ($P < 0,05$), nas linhas (maiúsculas) e nas colunas (minúsculas), pelo teste de Tukey

Figura 4.3 - Diâmetro médio de colônias (mm) de *Beauveria bassiana* (isolado 634), *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) e *Trichoderma* sp. inoculados com intervalo de 120 horas em meio de cultura BDA, com avaliações 48 e 120 horas após a inoculação de *Trichoderma* sp.

Quando o fungo *Trichoderma* sp. foi inoculado após um intervalo de 168 horas decorrido da inoculação de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, notou-se, na avaliação de 48 horas, que houve, como nos dois experimentos anteriores (48 e 120 horas), uma diminuição no crescimento de *Trichoderma* sp. quando inoculado na presença dos entomopatógenos, em relação ao seu crescimento isoladamente. *B. bassiana* e *M. anisopliae* tiveram, nessa avaliação, um crescimento semelhante quando inoculados isoladamente ou na presença de *Trichoderma* sp. Na avaliação de 120 horas, novamente já havia o crescimento total de *Trichoderma* sp., sendo que não houve diferenças entre o crescimento de *B. bassiana* e *M. anisopliae* quando inoculados isoladamente ou na presença de *Trichoderma* sp. O resultado interessante nessa avaliação, ao contrário do que havia ocorrido em todas as anteriores, foi que os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* continuaram normalmente o seu crescimento entre as duas avaliações, tanto quando

inoculados isoladamente, quanto na presença de *Trichoderma* sp. (Tabela 4.4, Figura 4.4).

Tabela 4.4 - Diâmetro médio de colônias (mm) de *Beauveria bassiana* (isolado 634), *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) e *Trichoderma* sp. inoculados com intervalo de 168 horas em meio de cultura BDA, com avaliações 48 e 120 horas após a inoculação de *Trichoderma* sp. (Temperatura = $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$; Fotofase = 12 horas)

Fungo (Tratamento)	48 horas	120 horas
<i>Trichoderma</i> sp. (+ <i>B. bassiana</i>)	$34,33 \pm 3,24$ A b	$90,00 \pm 0,00$ B a
<i>Trichoderma</i> sp. (+ <i>M. anisopliae</i>)	$25,50 \pm 2,61$ A c	$90,00 \pm 0,00$ B a
<i>Trichoderma</i> sp. (isoladamente)	$68,66 \pm 1,58$ A a	$90,00 \pm 0,00$ B a
<i>B. bassiana</i> (+ <i>Trichoderma</i> sp.)	$32,00 \pm 0,39$ A b	$34,96 \pm 0,84$ B b
<i>B. bassiana</i> (isoladamente)	$32,12 \pm 0,31$ A b	$34,58 \pm 0,68$ B b
<i>M. anisopliae</i> (+ <i>Trichoderma</i> sp.)	$28,16 \pm 0,68$ A c	$31,83 \pm 0,75$ B b
<i>M. anisopliae</i> (isoladamente)	$28,25 \pm 0,55$ A c	$32,08 \pm 0,70$ B b

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ($P < 0,05$), nas linhas (maiúsculas) e nas colunas (minúsculas), pelo teste de Tukey

Figura 4.4 - Diâmetro médio de colônias (mm) de *Beauveria bassiana* (isolado 634), *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) e *Trichoderma* sp. inoculados com intervalo de 168 horas em meio de cultura BDA, com avaliações 48 e 120 horas após a inoculação de *Trichoderma* sp.

De maneira geral, notou-se que o fungo *Trichoderma* sp. mostrou uma alta taxa de crescimento micelial, ocupando, já na primeira avaliação, decorridas 48 horas de sua inoculação no meio de cultura, cerca de dois terços do espaço total da placa. Segundo Jeffries & Young (1994), algumas espécies de *Trichoderma* vêm sendo estudadas devido à sua característica de deslocamento competitivo, sendo que o antagonismo promovido por esse fungo pode ser direto, envolvendo enrolamento de hifas e penetração nas estruturas do hospedeiro, aliados à secreção de antibióticos, voláteis ou não, ou indireto, com a colonização de substratos e ocupação do espaço disponível.

Nos experimentos em que a inoculação de *Trichoderma* sp. foi feita simultaneamente ou decorridas 48 horas da inoculação de *B. bassiana* ou *M. anisopliae*, o efeito inibitório de *Trichoderma* sp. sobre os entomopatógenos foi claramente notado, comparando-se os diâmetros obtidos nas duas avaliações (48 e 120 horas). Nesses tratamentos, observou-se que o fungo *Trichoderma* sp. cresceu inclusive sobre as

colônias dos entomopatógenos, sem a ocorrência de halos de inibição, numa demonstração de seu alto poder de competição (Figura 4.5).

Figura 4.5 - Aspecto das colônias de *Beauveria bassiana* (isolado 634), *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) e *Trichoderma* sp. inoculadas simultaneamente. Fotografia obtida 48 horas após a inoculação

Nos experimentos em que a inoculação de *Trichoderma* sp. foi feita 120 e 168 horas após a inoculação dos entomopatógenos, o fungo *Trichoderma* sp., considerando-se a primeira avaliação (48 horas), teve alguma dificuldade em se estabelecer, comparando as colônias inoculadas isoladamente com aquelas inoculadas na presença de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Porém, quando feita a avaliação das 120 horas,

Trichoderma sp. já havia se estabelecido, e, como nos experimentos anteriores, dominava a placa em toda sua extensão. Nesses casos, observou-se a formação de halos de inibição entre as colônias de *Trichoderma* sp. e dos entomopatógenos, sendo que o crescimento de *B. bassiana* e *M. anisopliae* continuou ocorrendo entre as duas avaliações, principalmente no experimento em que a inoculação de *Trichoderma* sp. foi feita após 168 horas da inoculação dos entomopatógenos, no qual houve diferença entre o crescimento de *B. bassiana* e *M. anisopliae* nas duas avaliações, independentemente de as colônias estarem ou não na presença de *Trichoderma* sp.

Esses halos de inibição notados entre as colônias podem ser o resultado aparente da produção de enzimas hidrolíticas extracelulares utilizadas por *Trichoderma* para a colonização do substrato e quebra da parede celular e citoplasmática dos competidores (Jeffries & Young, 1994). Essas enzimas, segundo De la Cruz et al. (1995), já foram caracterizadas para *T. harzianum*, como sendo pelo menos duas β -1,6-glucanases extracelulares, que degradam açúcares solúveis e produzem halos hidrolíticos em paredes celulares de leveduras.

No caso de fungos entomopatogênicos, os poucos relatos de micoparasitismo e/ou competição indicam que há muitas semelhanças entre os mecanismos utilizados pelos parasitos/competidores, como é o caso de uma substância antibiótica extraída de *H. thompsonii* (fomalactona), que inibe a germinação de conídios de *B. bassiana* (Krasnoff & Gupta, 1994), ou mesmo o parasitismo de *B. bassiana*, entre outros entomopatógenos, por *Syspastospora parasitica* (Jeffries & Young, 1994).

Os resultados obtidos nesses experimentos confirmam a capacidade competitiva de *Trichoderma* sp. em relação aos dois entomopatógenos, *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Esse aspecto merece atenção, como discutido anteriormente, em vista dos possíveis efeitos negativos quando da utilização de entomopatógenos em programas de controle microbiano de insetos, principalmente no solo, ambiente onde o fungo *Trichoderma*, assim como outros antagonistas, ocorre em abundância. O fato de que *Trichoderma* sp. pouco afeta o desenvolvimento de *B. bassiana* e *M. anisopliae* decorridos períodos de tempo que permitam um crescimento inicial desses entomopatógenos, pode ser um

indicativo da adoção de técnicas que protejam o entomopatógeno da ação imediata do antagonista, como a utilização de iscas, preservando seu potencial como agente de controle biológico de pragas.

4.3.2 Efeito de extrato de *Trichoderma* sp. sobre o desenvolvimento de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

Foi possível observar, com relação a *B. bassiana*, que o extrato afetou o crescimento radial das colônias e a produção de conídios somente quando adicionado na maior concentração, ou seja, 5 ml de extrato/100 ml de meio de cultura BDA. Nas outras concentrações, que variaram de 0,1 a 1 ml de extrato/100 ml de meio de cultura, não houve qualquer efeito negativo do extrato (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 - Diâmetro médio de colônias e número médio de conídios produzidos por colônia de *Beauveria bassiana* (isolado 634) na presença do extrato do fungo *Trichoderma* sp. (Temperatura = $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$; Fotofase = 12 horas)

Tratamento	Diâmetro (mm)	Número de conídios/colônia ($\times 10^7$)
Testemunha	$30,33 \pm 0,61$ a	$20,14 \pm 1,25$ a
Diclorometano ¹	$32,00 \pm 0,45$ a	$21,91 \pm 1,33$ a
Extrato ²		
0,1	$30,16 \pm 0,60$ a	$23,33 \pm 2,14$ a
0,5	$29,66 \pm 0,42$ a	$18,35 \pm 1,50$ a
1,0	$29,16 \pm 0,31$ a	$22,20 \pm 2,40$ a
5,0	$11,00 \pm 1,50$ b	$1,31 \pm 0,96$ b

Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey

¹ Diclorometano (solvente) na concentração de 5 ml/100 ml de meio de cultura BDA

² Concentrações do extrato de *Trichoderma* sp. (ml/100 ml de meio de cultura BDA)

Quanto a *M. anisopliae*, ocorreu o mesmo efeito, com a única diferença de que, no parâmetro diâmetro de colônias, já se notou, com relação à testemunha, um pequeno efeito da adição de 1 ml do extrato, sendo que esta concentração não diferenciou das outras inferiores (Tabela 4.6).

De maneira geral, pode-se notar que a metodologia utilizada para extração foi adequada, pois o tratamento Branco (adição do solvente diclorometano na proporção de 5 ml/100 ml de meio de cultura) não causou efeito negativo sobre o desenvolvimento dos dois entomopatógenos.

Tabela 4.6 - Diâmetro médio de colônias e número médio de conídios produzidos por colônia de *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) na presença do extrato do fungo *Trichoderma* sp. (Temperatura = $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$; Fotofase = 12 horas)

Tratamento	Diâmetro (mm)	Número de conídios/colônia ($\times 10^7$)
Testemunha	$28,00 \pm 0,52$ a	$19,68 \pm 1,33$ a
Diclorometano ¹	$26,50 \pm 0,34$ ab	$19,27 \pm 1,77$ a
Extrato ²		
0,1	$26,50 \pm 0,34$ ab	$13,93 \pm 1,58$ a
0,5	$26,00 \pm 0,26$ ab	$17,43 \pm 0,58$ a
1,0	$24,83 \pm 0,54$ b	$17,14 \pm 2,26$ a
5,0	$13,66 \pm 0,66$ c	$4,91 \pm 1,17$ b

Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey

¹ Diclorometano (solvente) na concentração de 5 ml/100 ml de meio de cultura BDA

² Concentrações do extrato de *Trichoderma* sp. (ml/100 ml de meio de cultura BDA)

Os fungos são geralmente classificados, dentro da microbiologia, como secretores, já que normalmente liberam no ambiente que os envolve grandes quantidades de metabólitos. Na verdade, os fungos são conhecidos pela produção de compostos quimicamente diversos, alguns dos quais biologicamente muito potentes, causando reações adversas e severas em outros organismos. Exemplos desses compostos incluem antibióticos usados para tratar doenças causadas por bactérias, alcalóides de cogumelos usados como vasoconstritores e várias micotoxinas produzidas em cereais atacados por fungos, que causam mortalidade em seres humanos, assim como em animais domésticos (Roberts & Krasnoff, 1998).

Os metabólitos secundários dos fungos são geralmente moléculas de tamanho pequeno a médio (peso molecular geralmente < 2000). Esses materiais são derivados dos metabólitos primários e incorporam, na maioria das vezes, estruturas que são geralmente produzidas por reações biossintéticas não comuns, ocasionalmente envolvendo moléculas de multienzimas com multifunções capazes de participar de sínteses complexas. A produção de metabólitos secundários é uma propriedade genética herdada por um organismo, mas a produção total de um metabólito secundário, em particular, pode ser significativamente alterada pela otimização das condições de crescimento, tais como nutrientes, temperatura, pH etc. A biossíntese anormal de produtos não-naturais pode ser também induzida sob certas circunstâncias. Na maioria dos casos, ainda não é bem conhecida a importância da produção dos metabólitos secundários pelos fungos. Parece provável, no caso dos entomopatógenos, que normalmente produzem metabólitos secundários tóxicos ou antibióticos, que as toxinas secretadas no meio pelos fungos possam funcionar como agentes antimicrobianos e anti-sistema imunológico, eliminando assim a competição por nutrientes ou facilitando o estabelecimento do patógeno (Roberts & Krasnoff, 1998).

Segundo De la Cruz et al. (1995), as enzimas de espécies de *Trichoderma* que degradam paredes celulares de fungos têm sido sugeridas como tendo um importante papel na ação micoparasítica sobre fungos patogênicos a plantas. *T. harzianum* produz pelo menos duas β -1,6-glucanases extracelulares, além de outras hidrolases. Uma destas enzimas extracelulares foi purificada, tendo um peso molecular aparente de 43000, e ponto isoelétrico de 5,8. Caracterizações posteriores indicaram que a enzima degrada açúcares solúveis e produz halos hidrolíticos em paredes celulares de leveduras. Esta enzima, quando combinada com outras substâncias degradadoras de parede celular de *T. harzianum*, como β -1,3-glucanases e quitinases, permite ao fungo hidrolisar células de paredes de fungos filamentosos, inibindo, assim, o seu crescimento.

Krasnoff & Gupta (1994) extraíram, com o solvente diclorometano, extratos de culturas de três isolados do fungo entomopatogênico *H. thompsonii* var. *synnematosus*, que foram tóxicos a *Rhagoletis pomonella* e *Ceratitidis capitata* e inibiram a germinação

de conídios *in vitro* de vários outros fungos entomopatogênicos, incluindo *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Tolypocladium* sp. Um desses extratos, inibitório da germinação de conídios de *B. bassiana*, foi isolado e identificado como sendo o antibiótico fomalactona. Este é o primeiro ingrediente biologicamente ativo de baixo peso molecular isolado do gênero *Hirsutella*.

Para o estudo do efeito de metabólitos de fungos antagonistas sobre o desenvolvimento de seus hospedeiros, algumas metodologias específicas têm sido utilizadas. Camporota (1985) estudou a emissão de substâncias voláteis produzidas por *Trichoderma* sp. sobre o desenvolvimento de *Rhizoctonia solani*, por meio de um aparato que permitia a colocação de culturas dos dois fungos para crescer em ambiente hermeticamente fechado. Decorrido o período necessário ao desenvolvimento das culturas, fazia-se a mensuração do diâmetro das colônias de *R. solani*, determinando-se a taxa de inibição do crescimento causada por substâncias voláteis. Para a observação da inibição causada por metabólitos não-voláteis difundidos no meio de cultura, esse autor utilizou a técnica da membrana de celofane, que consiste na inoculação do fungo antagonico em meio de cultura sólido coberto por membrana de celofane, semi-permeável, a qual permite a difusão dos metabólitos não-voláteis para o meio de cultura, e, após a retirada dessa membrana, inocula-se o fungo a ser avaliado, medindo-se o seu crescimento na presença ou ausência de tais substâncias.

Também Rai et al. (1980) estudaram a ocorrência de metabólitos voláteis e não-voláteis de *Trichoderma* sp. sobre espécies de *Aspergillus*. A diferença, nesse estudo, foi a utilização do meio líquido Czapeck Dox, também utilizado no presente trabalho, visando, após filtragem, adicionar o filtrado a meio de cultura sólido, na proporção de 1:4, avaliando-se o efeito dos metabólitos contidos no filtrado sobre o fungo estudado. Turhan & Grossmann (1994) também utilizaram esta técnica, mantendo colônias de diversas espécies de *Myrothecium* sp. em frascos com meio líquido por 15 dias, adicionando, ao final desse período, o filtrado ao meio BDA na proporção de 1:7, avaliando o crescimento de vários fungos e bactérias antagonicas. Nesses três trabalhos foram encontradas diferenças na suscetibilidade das diversas espécies dos fungos

estudados quanto ao seu crescimento na presença de tais substâncias. Assim, torna-se evidente a existência de vários mecanismos pelos quais atua o fungo *Trichoderma* sp., dependendo do microrganismo a ser antagonizado.

No presente trabalho, a adição de um solvente orgânico ao filtrado visou a melhoria do método, já que a maioria das toxinas e enzimas produzidas pelo metabolismo secundário de fungos são solúveis em solvente orgânico. Isso foi feito no trabalho de Krasnoff & Gupta (1994), no isolamento da fomalactona de *H. thompsoni* var. *synnematosae*. Com esse solvente, pretendeu-se eliminar outras possíveis substâncias presentes no filtrado que pudessem mascarar o efeito do extrato tóxico.

Outro fato a ser comparado é a diluição à qual foram submetidos os diferentes filtrados aqui analisados. As proporções de 1:4 ou 1:7, utilizadas nos trabalhos anteriores, referem-se ao filtrado, misturado aos componentes do meio líquido, dos quais destaca-se a grande quantidade de água. No presente estudo, a fração tóxica extraída com a evaporação do solvente, teoricamente, estaria mais concentrada que o filtrado completo, porém, utilizou-se pequena quantidade de água na retirada do material do frasco de vidro utilizado no evaporador. Assim, também não se pode garantir a pureza absoluta desse material. O correto, também, deveria ser a execução de uma etapa de isolamento e caracterização de uma possível toxina. Isso já foi feito, no trabalho de Krasnoff e Gupta (1994), e já existem padrões comparativos para tal. Seria mais uma etapa a ser realizada.

No caso da ação de *Trichoderma* sp. sobre *B. bassiana* e *M. anisopliae*, pode-se inferir que há um efeito da combinação dos diferentes modos de ação de *Trichoderma* sp., já que, no item anterior, verificou-se a ação no antagonismo direto, ou seja, utilizando o espaço disponível no ambiente, competindo por nutrientes através da alta taxa de crescimento micelial. Esse fato, aliado à ação também detectada de metabólitos não-voláteis pode explicar a vantagem competitiva de *Trichoderma*. Seria interessante o complemento desse estudo para a verificação de metabólitos voláteis, por meio das técnicas já citadas, e também da tentativa de observação de micoparasitismo através de técnicas mais apuradas, como a microscopia eletrônica de varredura (Inbar et al., 1996) ou mesmo a microscopia de fluorescência (Barak & Chet, 1986).

5 CICLO DE DESENVOLVIMENTO DE *Beauveria bassiana* E *Metarhizium anisopliae* SOBRE *Heterotermes tenuis*

5.1 Introdução

Os estudos relacionados com a duração das diferentes fases das doenças fúngicas em cupins são relativamente escassos, porém, sua importância no contexto do controle microbiano deve ser levada em conta em função da estratégia que venha a ser empregada no controle destes insetos, limitada pelos hábitos comportamentais dos mesmos (Fernandes & Alves, 1992; Almeida & Alves, 1995). Esses estudos podem ser realizados pela execução de bioensaios e pela visualização das diferentes fases da doença usando-se técnicas de observação mais detalhadas, como o emprego da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

As metodologias utilizadas devem evitar uma possível perda de estruturas causada pela preparação, principalmente quando o objetivo é documentar as diferentes estruturas do fungo no seu processo de infecção (Quattlebaum & Carner, 1980; Hunt et al., 1984; Neves et al., 1996).

Este trabalho teve por objetivo estudar o ciclo de desenvolvimento de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre *H. tenuis*, utilizando-se duas técnicas de preparação para observação ao microscópio eletrônico de varredura, visando determinar a duração das diferentes fases da doença, bem como indicar a melhor metodologia a ser utilizada na observação das relações entre esses entomopatógenos e os cupins subterrâneos.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Observação do ciclo de desenvolvimento de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Heterotermes tenuis* ao microscópio eletrônico de varredura. 1. Fixação em vapor de tetróxido de ósmio

Operários de *H. tenuis*, coletados em armadilhas de papelão corrugado (Termitrap®), foram transferidos para placas de poliestireno de 6 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura, de tampa telada, com papel de filtro ao fundo, e inoculados com 0,1 ml de uma suspensão 1×10^9 conídios/ml de *B. bassiana* (isolado 634) e *M. anisopliae* (isolado E-9). Os fungos foram aplicados usando-se um compressor de ar à pressão de 15 kgf/cm², acoplado a um bico pulverizador marca Paasche, modelo Airbrush Set. Foram utilizadas 10 placas com cerca de 20 insetos para cada isolado, totalizando aproximadamente 200 insetos.

Os insetos foram retirados nos períodos de 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a inoculação, mortos em placas de Petri com algodão embebido em éter etílico e preparados em “stubs”, aparatos metálicos próprios para observação dos espécimes ao microscópio eletrônico de varredura. Foram preparados 2 “stubs” com 5 insetos cada um, por horário de retirada. Em seguida, os espécimes foram fixados em vapor de OsO₄ (tetróxido de ósmio), mantendo-se os “stubs” por 48 horas em câmara plástica hermética com placa de Petri contendo um filme líquido de OsO₄, o qual, ao volatilizar, promoveu a fixação dos espécimes. Após esse processo, o material foi deixado por 72 horas em dessecador de vidro com sílica-gel para manutenção da umidade relativa próxima a 0%. A última etapa da preparação do material foi a metalização com ouro em Evaporador Balzers, modelo MED 010, por 120 segundos.

A observação das preparações foi feita ao microscópio eletrônico de varredura da marca Zeiss, modelo DMS 940, no Laboratório do Núcleo de Apoio à Pesquisa - Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP-MEPA), da ESALQ/USP.

5.2.2 Observação do ciclo de desenvolvimento de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Heterotermes tenuis* ao microscópio eletrônico de varredura. 2. Fixação em glutaraldeído e OsO₄ com tampão de sódio-cacodilato

Os insetos foram preparados de maneira semelhante à descrita anteriormente para a técnica do vapor de tetróxido de ósmio. Porém, após a inoculação, os insetos mortos em éter etílico foram fixados por 6 horas em glutaraldeído a 4% com tampão de sódio-cacodilato 0,2 M a pH 7,2 e, em seguida, em OsO₄ a 1% em tampão de sódio-cacodilato 0,1 M a pH 7,2 por 1 hora. Essa etapa de fixação, por ser conduzida em meio líquido, foi feita passando-se os insetos por tubos plásticos do tipo Ependorff, que continham as substâncias utilizadas no processo.

Posteriormente, o material foi desidratado em série de acetona a 30, 50, 70, 90 e 100%, passando-se os espécimes sucessivamente por recipientes do tipo Ependorff contendo as diferentes concentrações de acetona, sendo que na concentração de 100% foram feitas três passagens do material. Em seguida, foi feita a secagem ao ponto crítico com CO₂ em aparelho da marca Balzers, modelo CPD 030. Após essa secagem, o material foi preparado nos “stubs”, como na técnica anterior, e, por último, passou por metalização com cobertura de ouro. Também foram preparados nessa técnica, 2 “stubs” com 5 insetos cada um, por horário de retirada.

Os insetos foram observados ao microscópio eletrônico de varredura, possibilitando a comparação entre os resultados obtidos pelas duas técnicas de preparação.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Observação do ciclo de desenvolvimento de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Heterotermes tenuis* ao microscópio eletrônico de varredura

Após a aplicação da suspensão de conídios, observou-se, para *B. bassiana*, a adesão dos mesmos ao tegumento dos insetos, no intervalo de 0 a 6 horas após a inoculação (Figura 5.1 A,B). O período de germinação dos conídios deu-se entre 12 e 48 horas (Figura 5.1 C,D), sendo os conídios observados principalmente nas pernas e na cabeça dos insetos. Algumas observações foram feitas também nos esternitos torácicos ou abdominais (Figura 5.1 B), mas em quantidade bem menor. A penetração deu-se entre as 48 e 96 horas (Figuras 5.1 E; 5.2 A,B,C,D).

Estudando o ciclo de doença do isolado 447 de *B. bassiana* sobre *H. tenuis*, Lopes et al. (1996) observaram a ocorrência de germinação de conídios entre as 12 e 24 horas, com penetração após as 48 horas, seguida da morte dos insetos por volta das 72 horas após a inoculação. Segundo Boucias et al. (1996a), *B. bassiana* formou tubos germinativos e estruturas de penetração entre as 12 e 24 horas após a inoculação em *Reticulitermes flavipes*.

Um fato que chamou a atenção, foi a formação de halos na cutícula dos insetos, a partir da adesão e germinação dos conídios, e principalmente durante o processo de penetração (Figuras 5.1 B; 5.2 A). Essa ocorrência parece estar relacionada com a intensa produção e excreção de exoenzimas pelo entomopatógeno durante o processo-doença. Nos conídios que apresentavam a atividade de penetração, observou-se um engrossamento da extremidade do tubo germinativo (Figura 5.1 E), caracterizando a ocorrência de apressórios, que são estruturas especializadas nesse processo.

A fase de colonização do hospedeiro deu-se entre as 72 e 120 horas, sendo que a maioria dos insetos morreu entre as 72 e 96 horas, apresentando uma coloração rósea, característica de insetos atacados por *B. bassiana* (Boucias et al., 1996a). Ainda segundo esses autores, durante a colonização de *R. flavipes* por *B. bassiana*, as células fúngicas

foram observadas invadindo vários tecidos do hospedeiro, tais como o epitélio da cutícula, músculos e corpos gordurosos. Já Bao & Yendol (1971), trabalhando com a mesma espécie de cupim, observaram o micélio do fungo invadindo corpos gordurosos, células sangüíneas, gânglios, glândulas salivares e tubos de Malpighi. Esses trabalhos foram conduzidos utilizando técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

A extrusão do micélio para o exterior do corpo dos insetos ocorreu no período entre as 96 e 120 horas, principalmente nas regiões intersegmentares, ocorrendo posteriormente, em locais mais quitinizados, com a completa degradação da cutícula (Figura 5.2 E).

O processo de conidiogênese deu-se entre as 120 e 144 horas (Figura 5.3 A a E), sendo que às 144 horas, todo o corpo do inseto encontrava-se tomado por conídios de *B. bassiana* (Figura 5.3 C, D e E). Segundo P. J. Neves (comunicação pessoal), quando um estudo semelhante foi realizado com *Cornitermes cumulans*, observou-se maior quantidade de pontos de extrusão do micélio e conidiogênese nas pernas e na cabeça dos insetos, inclusive na área membranosa localizada nos lábios, sendo que no abdome dos insetos pouco se verificou nesse sentido. Isso não foi observado para *H. temuis*, provavelmente devido ao fato de que *C. cumulans* possui no aparelho digestivo uma maior quantidade de microrganismos que competem com o patógeno, em função dos hábitos alimentares e comportamentais desse inseto, o que não ocorre com *H. temuis*.

Outro fato interessante foi a observação de cristais bipiramidais, possivelmente de oxalato duplo de magnésio e amônio, incrustados no tegumento de um inseto atacado, próximo à área de penetração dos tubos germinativos (Figura 5.2 C,D). Esses cristais já foram observados em *Bombyx mori* (Amaral & Alves, 1979), sendo o papel desse composto no modo de ação de certos fungos fitopatogênicos bem documentado na literatura (Roberts & Krasnoff, 1998). Cristais de oxalato foram encontrados também, segundo esses autores, na superfície de insetos mortos por *B. bassiana*. Possivelmente, o ácido oxálico seja uma toxina importante na hemolinfa de insetos atacados por *Beauveria* spp. Também é comum a presença de cristais, provavelmente de oxalato, na cavidade geral de ácaros tetraniquídeos infectados por isolados de *Beauveria* e *Metarhizium* spp.,

sendo mais freqüente em ácaros atacados por *Beauveria* (M.A.Tamai & S.B.Alves, dados não publicados).

Com relação a *M. anisopliae*, a observação do desenvolvimento do patógeno em *H. temuis* revelou uma grande similaridade com os eventos ocorridos com *B. bassiana*. A adesão dos conídios ocorreu entre 0 e 6 horas após a inoculação (Figura 5.4 A,B). A germinação deu-se entre as 12 e 24 horas (Figuras 5.4 C,D,E; 5.5 A).

O processo de penetração ocorreu entre 24 e 48 horas (Figura 5.4 C,D,E). Segundo Hanel (1982a), estudando o ciclo de doença de *M. anisopliae* sobre *N. exitiosus*, o tempo médio para a penetração foi de 48 horas. Lopes et al. (1996), trabalhando com *H. temuis*, observaram que a penetração do isolado E-9 de *M. anisopliae* deu-se entre 24 e 48 horas, ocorrendo, na seqüência, a morte dos insetos.

No presente estudo foi possível a visualização, assim como o que ocorreu com *B. bassiana*, de um processo de engrossamento da extremidade do tubo germinativo, caracterizando a ocorrência do apressório (Figura 5.4 C,D). Esse engrossamento é devido, provavelmente, à alocação do conteúdo citoplasmático do conídio para que o local de penetração seja hábil na síntese enzimática. Há, inclusive, um aparente esgotamento do conídio, em função do crescimento do tubo germinativo (Figura 5.5 A).

Notou-se também com *M. anisopliae* a formação de halos na cutícula dos insetos (Figura 5.4 C), quando dos processos de germinação e penetração. Roberts & Krasnoff (1998) citam uma enzima do grupo das quimoelastases (Pr1), como sendo responsável pela degradação da cutícula, sendo que o fungo *M. anisopliae*, quando em processo de penetração, destina até 78% da capacidade de síntese protéica para a produção dessa importante enzima.

A colonização deu-se entre 48 e 72 horas. Esse processo ocorre, segundo Hanel (1982a), com a produção de corpos hifais e liberação de toxinas na hemolinfa do inseto, concorrendo para o estabelecimento do patógeno, eliminando a competição nutricional, como já citado anteriormente para *B. bassiana*, bem como na suplantação dos mecanismos de ação antimicrobiana do sistema de defesa do inseto.

A morte dos insetos ocorreu entre 48 e 72 horas, e a extrusão do micélio entre 48 e 120 horas (Figura 5.5 B,C,D). Esse evento foi de melhor visualização, no presente estudo, para *M. anisopliae* que para *B. bassiana*, ocorrendo também, inicialmente, nas regiões intersegmentares (Figuras 5.5 B,C,D; 5.6 B), e depois em outras regiões, com o processo de degradação da cutícula (Figuras 5.5 E; 5.6 C).

A conidiogênese ocorreu entre 96 e 144 horas (Figuras 5.6 A,D; 5.7 A a E), e entre 120 e 144 horas, como ocorrido para *B. bassiana*, todo o corpo do inseto encontrava-se coberto por conídios de *M. anisopliae* (Figura 5.7 C,D,E). Segundo Lopes et al. (1996), a conidiogênese em *H. tenuis* deu-se entre 96 e 120 horas também para o isolado E-9.

A Figura 5.8 compara graficamente as diferentes fases do ciclo de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre *H. tenuis*. Deve-se atentar para o fato de que as fases são sobrepostas, não havendo, portanto, uma separação muito precisa entre os diferentes períodos de ocorrência. Analisando-se a duração das fases, percebe-se que o isolado E-9, de *M. anisopliae*, nas condições do estudo, provocou a morte dos insetos mais rapidamente, em consequência da maior velocidade de ocorrência das fases de penetração e colonização do inseto, quando comparado com o isolado 634, de *B. bassiana*. Almeida (1994), selecionando isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *H. tenuis*, concentrou seus esforços no gênero *Beauveria*, pois os isolados de *M. anisopliae* testados mostraram-se pouco patogênicos. O isolado E-9 mostrou-se bem patogênico a *H. tenuis* nos experimentos realizados no presente trabalho (Capítulo 3), e, em algumas condições, mostrou-se até mais virulento que o isolado 634 (*B. bassiana*). Também Alves et al. (1997) realizaram testes com o isolado 1037 de *M. anisopliae*, proveniente de *Solenopsis* sp., obtendo resultados promissores no controle de *H. tenuis* e *C. cumulans*. A busca por isolados mais interessantes no aspecto de patogenicidade e virulência deve ser contínua. O ideal é que se desenvolva, como no caso dos cupins, uma metodologia ou estratégia de controle à qual se adeque qualquer isolado do entomopatógeno. Assim, com uma estratégia definida, torna-se viável a substituição dos

ingredientes ativos, sejam biológicos ou químicos, de acordo com o desenvolvimento da pesquisa.

Ainda com relação à duração das diferentes fases, é importante salientar também o fato de que, apesar da padronização na condução do estudo, a quantidade de inóculo que atinge o inseto é variável. Essa variação, difícil de ser controlada, pode levar a uma quantidade maior ou menor de conídios que conseguem penetrar o inseto, gerando maior ou menor quantidade de corpos hifais que colonizarão o mesmo, e, conseqüentemente, interferindo na quantidade e velocidade dos processos de extrusão e conidiogênese, provocando a mortalidade dos insetos em épocas também variáveis. Como o objetivo desse estudo básico foi permitir a visualização das diferentes fases do ciclo da doença, deve-se ter em mente a importância desses fatores.

5.3.2 Comparação das duas metodologias utilizadas para observação do ciclo dos entomopatógenos ao microscópio eletrônico de varredura

A técnica de fixação em glutaraldeído e OsO_4 com tampão de sódio-cacodilato, como já salientado anteriormente (Capítulo 2), preservou mais eficientemente as características dos insetos e dos fungos, quando comparada à técnica de fixação em vapor de OsO_4 .

Observou-se que as estruturas dos fungos ficaram mais íntegras, pela técnica do glutaraldeído (Figuras 5.3 E; 5.6 D; 5.7 E), enquanto que pela técnica do vapor de ósmio, os conídios dos fungos, principalmente, apresentaram-se mais enrugados e murchos (Figuras 5.4 E; 5.6 B; 5.7 A). Com relação aos insetos, as regiões mais quitinizadas, como a cabeça, mostraram-se menos suscetíveis às modificações de acordo com a técnica utilizada.

Dessa forma, pode-se sugerir que, quando o objetivo do estudo é a quantificação ou visualização de alguma estrutura do patógeno em determinadas regiões do corpo do inseto, como no presente trabalho, a técnica do vapor de ósmio pode ser adotada, por ser menos onerosa e trabalhosa que a técnica do glutaraldeído, sem prejuízos na detecção

dos enventos estudados. Por outro lado, quando se deseja trabalhar com caracteres mais aprimorados, como estudos taxonômicos ou documentais, a técnica do glutaraldeído é preferível, pois os resultados estéticos são melhores.

Deve-se ressaltar que a maioria dos registros aproveitados para uso nesse trabalho, principalmente na verificação de germinação e penetração de conídios, foi obtida pela técnica do vapor de ósmio, pois o número de estruturas visualizadas foi sempre maior que pela outra técnica. Isso pode indicar que, apesar das vantagens estéticas, a técnica do glutaraldeído pode fazer com que ocorram algumas perdas de estruturas, causadas pela passagem do material a ser observado por diferentes substâncias, como a série de acetona, usada para desidratação, bem como o glutaraldeído, o tampão e o tetróxido de ósmio, todos líquidos, utilizados no processo de fixação.

Figura 5.1 - Desenvolvimento de *Beauveria bassiana* (isolado 634) sobre *Heterotermes tenuis*. Fotografias ao microscópio eletrônico de varredura. A) Conídios (1000 X, 0 horas após a inoculação). B) Conídios provocando halo na cutícula (1000 X, 6 horas). C) Conídio germinando (1000 X 2, 24 horas). D) Crescimento de vários tubos germinativos (1000 X, 24 horas). E) Penetração de tubo germinativo (1000 X 8, 72 horas)

Figura 5.2 - Desenvolvimento de *Beauveria bassiana* (isolado 634) sobre *Heterotermes tenuis*. Fotografias ao microscópio eletrônico de varredura. A) Conídio germinando, com formação de halo na cutícula (1000 X 4, 72 horas). B) Entrelaçamento de tubos germinativos (200 X 4, 72 horas). C) Tubos germinativos, com presença de cristais de oxalato (500 X 4, 96 horas). D) Detalhe dos cristais de oxalato (10000 X, 96 horas). E) Extrusão de hifas em operário (50 X 8, 120 horas)

Figura 5.3 - Desenvolvimento de *Beauveria bassiana* (isolado 634) sobre *Heterotermes tenuis*. Fotografias ao microscópio eletrônico de varredura. A) Início de conidiogênese em cabeça de operário, com degradação da cutícula (100 X 8, 120 horas). B, C, D e E) Detalhes da conidiogênese de *B. bassiana* (1000 X 4, 120 horas; 5000 X, 144 horas; 5000 X, 144 horas; 500 X 8, 144 horas, respectivamente)

Figura 5.4 - Desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) sobre *Heterotermes tenuis*. Fotografias ao microscópio eletrônico de varredura. A) Adesão de conídios no tarso de operário (500 X, 0 horas). B) Detalhe de conídio aderido em seta (1000 X 4, 0 horas). C e D) Conídio germinando e penetração do tubo germinativo (5000 X, 24 horas; 2000 X 2, 24 horas, respectivamente). E) Germinação e penetração de vários tubos germinativos (2000 X, 24 horas)

Figura 5.5 - Ciclo de *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) sobre *Heterotermes tenuis*. Fotografias ao microscópio eletrônico de varredura. A) Crescimento do tubo germinativo (3000 X, 24 horas). B) Extrusão do micélio em região intersegmentar (1000 X, 48 horas). C) Extrusão do micélio (2000 X, 72 horas). D) Formação de conidióforos (500 X 4, 72 horas). E) Micélio sobre a cabeça de operário (50 X 8, 72 horas)

Figura 5.6 - Desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) sobre *Heterotermes tenuis*. Fotografias ao microscópio eletrônico de varredura. A) Início da formação de conidióforos (1000 X 4, 96 horas). B) Extrusão do micélio em região intersegmentar (500 X 2, 96 horas). C) Extrusão do micélio com degradação da cutícula, na tíbia (500 X 2, 96 horas). D) Formação de conidióforos (500 X 8, 96 horas). E) Detalhe da extrusão do micélio, na cabeça de operário (1000 X 8, 120 horas)

Figura 5.7 - Desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) sobre *Heterotermes tenuis*. Fotografias ao microscópio eletrônico de varredura. A) Início de conidiogênese (1000 X, 120 horas). B) Detalhe de cadeia de conídios (1000 X 2, 120 horas). C) Conidiogênese na cabeça de operário (200 X 8, 144 horas). D) Massa de conídios (2000 X, 144 horas). E) Conidiogênese no fêmur de operário (200 X 4, 144 horas)

Beauveria bassiana (isolado 634)

	DURAÇÃO (HORAS)								
FASES	0	6	12	24	48	72	96	120	144
Adesão									
Germinação									
Penetração									
Colonização									
Morte									
Extrusão									
Conidiogênese									

Metarhizium anisopliae (isolado E-9)

	DURAÇÃO (HORAS)								
FASES	0	6	12	24	48	72	96	120	144
Adesão									
Germinação									
Penetração									
Colonização									
Morte									
Extrusão									
Conidiogênese									

Figura 5.8 - Duração, em horas, das diferentes fases do ciclo de infecção de *Beauveria bassiana* (isolado 634) e *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) sobre operários do cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis*

6 EFEITO DE IMIDACLOPRID E FIPRONIL SOBRE *Beauveria bassiana* E *Metarhizium anisopliae*

6.1 Introdução

O controle associado, que é a utilização de produtos fitossanitários altamente seletivos em conjunto com o uso de entomopatógenos, pode contribuir no combate a uma determinada praga. A interação dos aspectos relacionados à seletividade e ao controle associado deve ser bem estudada, principalmente no caso dos cupins subterrâneos em cana-de-açúcar, onde se aplica a estratégia de controle de *Heterotermes tenuis* por meio de iscas de papelão corrugado impregnadas com inseticidas e fungos entomopatogênicos. A ação dos produtos fitossanitários sobre os entomopatógenos pode variar desde a inibição do crescimento vegetativo e da conidiogênese nos microrganismos, até a ocorrência de mutações genéticas nesses entomopatógenos, alterando as características de virulência (Alves et al. 1998). Se considerarmos a estratégia do controle associado, deve-se atentar para os possíveis efeitos fungitóxicos dos produtos fitossanitários a serem utilizados.

A capacidade estressora de alguns produtos fitossanitários favorece a utilização do controle associado, atuando em mecanismos comportamentais, como no caso dos cupins. Nesses insetos, a capacidade de limpeza dos indivíduos mantém as colônias livres de patógenos, dificultando o controle microbiano, sendo que a utilização de inseticidas em concentrações subletais pode alterar esse comportamento, agindo de forma sinérgica (Zeck, 1992; Boucias et al., 1996b). Também outros hábitos comportamentais como trofalaxia, lambimento, tigmotropismo e canibalismo podem contribuir para o

estabelecimento de epizootias nas colônias, facilitando a disseminação dos patógenos dos indivíduos infectados para os sadios, sendo relevantes no aspecto de defesa do inseto contra o estabelecimento de agentes patogênicos (Almeida & Alves, 1996; Boucias et al., 1996a).

O presente estudo teve por objetivos avaliar o efeito fungitóxico dos produtos fitossanitários imidacloprid e fipronil sobre *B. bassiana* e *M. anisopliae*, bem como o efeito desses inseticidas na alteração da capacidade de limpeza de *H. temuis* quando inoculados com os dois fungos entomopatogênicos.

6.2 Material e métodos

6.2.1 Avaliação do efeito fungitóxico de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

Foram utilizados os isolados 634 (*B. bassiana*) e E-9 (*M. anisopliae*), repicados em placas de Petri com meio de cultura MC a partir do material armazenado, como descrito anteriormente (Capítulo 3).

Testaram-se duas formulações comerciais já registradas para o controle de cupins na cultura da cana-de-açúcar, sendo imidacloprid (Confidor 700 GrDA, Bayer) e fipronil (Regent 800 WG, Rhodia Agro Ltda.). Considerando-se a utilização de concentrações subletais dos inseticidas para associação com fungos entomopatogênicos no controle de *H. temuis*, as formulações foram testadas na concentração média recomendada e a uma concentração 70% inferior.

Os fungos foram inoculados em placas de Petri com meio BDA (batata-dextrose-água), acrescido das duas concentrações de cada produto, e de um tratamento testemunha (sem adição dos produtos), totalizando 5 tratamentos para cada fungo. Foram feitas 4 placas por tratamento, sendo a inoculação realizada por meio de uma alça de platina, em 3 pontos equidistantes por placa, totalizando 12 colônias de fungo, das

quais 6 colônias foram aleatoriamente selecionadas, resultando em 6 repetições por tratamento.

A adição dos produtos ao meio de cultura foi feita com o mesmo ainda líquido, a uma temperatura próxima dos 40°C, após o que, o meio foi vertido nas placas, sendo feita a inoculação dos entomopatógenos após a sua solidificação.

Para o cálculo das concentrações proporcionais dos produtos, considerou-se um volume médio de aplicação de 300 litros/ha. Assim, os seguintes tratamentos foram obtidos: testemunha (sem adição de produto); imidacloprid: 33,3 mg p.c./100 ml BDA (concentração média recomendada de 100 g p.c./ha); imidacloprid (-): 9,9 mg p.c./100 ml BDA (concentração 70% inferior); fipronil: 83,3 mg p.c./100 ml BDA (concentração média recomendada de 250 g p.c./ha); fipronil (-): 24,9 mg p.c./100 ml BDA (concentração 70% inferior).

Após a inoculação dos entomopatógenos, as placas foram mantidas em estufas incubadoras B.O.D. a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas, por um período de 10 dias, quando então foram medidos os diâmetros médios das colônias e procedida a contagem do número de conídios produzidos por colônia, em câmara de Neubauer, de forma semelhante à citada anteriormente (Capítulo 4).

Também foi avaliada a viabilidade dos conídios produzidos na presença ou não dos produtos químicos através do plaqueamento em meio BDA dos conídios provenientes das colônias avaliadas (6 repetições), como já descrito no Capítulo 3, utilizando-se alíquotas das suspensões que foram quantificadas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($P < 0,05$) para comparação entre as médias, além do cálculo de um fator de compatibilidade (valor “T”) proposto por Alves et al. (1998).

6.2.2 Estudo do comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* na eliminação do inóculo de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sob o efeito de imidacloprid e fipronil

Os inseticidas foram impregnados em papel de filtro (discos de 6,0 cm de diâmetro) nas proporções de 0,01 e 0,001% (peso/peso), por meio de imersão em solução aquosa, utilizando-se um volume de 100,0 ml de água destilada estéril por tratamento. No tratamento testemunha o papel foi imerso somente em água destilada.

Os discos de papel de filtro impregnados foram colocados em placas plásticas de poliestireno de 6,0 cm x 1,5 cm, cobertas com tampa telada, e mantidos para secagem por 24 horas, sendo feitas 3 placas por tratamento.

Em seguida, operários de *H. tenuis*, coletados por armadilhas de papelão corrugado, foram inoculados com 0,1 ml de uma suspensão de 10^9 conídios/ml dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* para cada 20 insetos, aproximadamente, como descrito anteriormente (Capítulo 5). Os insetos foram então transferidos para as placas com papel de filtro previamente impregnado com os inseticidas ou com água destilada. Dessa forma, resultaram os seguintes tratamentos: *B. bassiana* (634), *M. anisopliae* (E-9), *B. bassiana* x imidacloprid (0,01%), *B. bassiana* x imidacloprid (0,001%), *B. bassiana* x fipronil (0,01%), *B. bassiana* x fipronil (0,001%), *M. anisopliae* x imidacloprid (0,01%), *M. anisopliae* x imidacloprid (0,001%), *M. anisopliae* x fipronil (0,01%) e *M. anisopliae* x fipronil (0,001%).

Foram retirados 10 insetos de cada tratamento, preparando-se dois “stubs” com 5 insetos cada um para observação ao microscópio eletrônico de varredura, pela técnica do vapor de tetróxido de ósmio, citada anteriormente (Capítulo 5), nos períodos de 0, 6, 12 e 24 horas após a inoculação com os entomopatógenos.

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Avaliação do efeito fungitóxico de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

O efeito causado pelo produto imidacloprid sobre *B. bassiana* foi menor, principalmente no caráter diâmetro de colônias, no qual as médias dos tratamentos imidacloprid e imidacloprid (-) foram semelhantes às do tratamento testemunha. Quando comparados os valores do número de conídios produzidos por colônia, percebe-se que o tratamento imidacloprid (-) foi o que provocou menor efeito, como no parâmetro anterior, sendo que a concentração recomendada do produto provocou efeito semelhante aos tratamentos com fipronil, reduzindo a produção de conídios de *B. bassiana* em comparação com a testemunha. O produto fipronil causou maior efeito, tanto no número de conídios produzidos como no diâmetro das colônias do fungo (Tabela 6.1).

Tabela 6.1 - Diâmetro médio de colônias e número médio de conídios produzidos por colônia de *Beauveria bassiana* (isolado 634), sob o efeito de imidacloprid e fipronil (Temperatura = $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$; Fotofase = 12 horas)

Tratamento	Diâmetro (mm)	Número de conídios/colônia ($\times 10^8$)
Testemunha	$15,66 \pm 0,99$ a	$11,87 \pm 1,13$ a
Fipronil	$10,91 \pm 0,37$ b	$7,12 \pm 0,23$ b
Fipronil (-) ¹	$11,16 \pm 0,38$ b	$8,14 \pm 0,68$ b
Imidacloprid	$17,00 \pm 0,58$ a	$8,80 \pm 0,53$ b
Imidacloprid (-) ¹	$16,75 \pm 0,68$ a	$14,30 \pm 0,65$ a

¹ Concentrações dos produtos 70% inferiores às recomendadas

Médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey

Para *M. anisopliae*, foi obtido um efeito semelhante a *B. bassiana* com relação ao diâmetro de colônias, porém, analisando o número de conídios produzidos por colônia, não houve diferença entre os tratamentos, mostrando um menor efeito dos produtos sobre este entomopatógeno (Tabela 6.2).

Tabela 6.2 - Diâmetro médio de colônias e número médio de conídios produzidos por colônia de *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9), sob o efeito de imidacloprid e fipronil (Temperatura = $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa = $70 \pm 10\%$; Fotofase = 12 horas)

Tratamento	Diâmetro (mm)	Número de conídios/colônia ($\times 10^8$)
Testemunha	$16,58 \pm 0,76$ a	$6,77 \pm 0,45$ a
Fipronil	$12,25 \pm 0,50$ b	$5,78 \pm 0,39$ a
Fipronil (-) ¹	$12,75 \pm 0,28$ b	$6,08 \pm 0,66$ a
Imidacloprid	$17,25 \pm 0,11$ a	$6,35 \pm 0,23$ a
Imidacloprid (-) ¹	$16,92 \pm 0,33$ a	$6,91 \pm 0,44$ a

¹ Concentrações dos produtos 70% inferiores às recomendadas

Médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey

Admitindo-se um índice relativo = 100 para a testemunha (sem aplicação dos produtos), observa-se que imidacloprid não reduziu o crescimento vegetativo e a conidiogênese do fungo *B. bassiana*, quando comparado ao produto fipronil (Figura 6.1). Já para *M. anisopliae*, os dois produtos pouco alteraram os dois parâmetros avaliados (Figura 6.2). Nota-se, nessa avaliação gráfica, que alguns tratamentos proporcionaram índices relativos superiores a 100, ou seja, houve, nesses casos, médias de número de conídios produzidos por colônia e/ou diâmetro médio de colônias superiores aos obtidos no tratamento testemunha. Aparentemente conflitantes, esses números reforçam um

aspecto que tem sido comum em trabalhos que seguem essa metodologia de avaliação do efeito tóxico de produtos fitossanitários sobre entomopatógenos *in vitro* (Alves et al., 1998). Uma hipótese a ser levantada é o fato de que o microrganismo, ao metabolizar os princípios tóxicos do ingrediente ativo, num mecanismo de resistência/seletividade fisiológica, provoque a liberação no substrato (meio) de moléculas as quais possa vir a utilizar como nutrientes secundários, promovendo seu crescimento vegetativo e conidiogênese. Outra hipótese é de que o fungo, numa atividade comparável ao que ocorre com outros seres vivos de uma maneira geral, utilize todo o esforço reprodutivo quando em presença de um princípio tóxico que altere o ambiente de forma a prejudicar o seu desenvolvimento, resultando assim, em maiores níveis de crescimento vegetativo e conidiogênese.

Figura 6.1 - Índices relativos (Testemunha = 100) de diâmetro médio de colônias e número de conídios produzidos por colônia de *Beauveria bassiana* (isolado 634), sob o efeito de imidacloprid e fipronil

Figura 6.2 - Índices relativos (Testemunha = 100) de diâmetro médio de colônias e número de conídios produzidos por colônia de *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9), sob o efeito de imidacloprid e fipronil

Alves et al. (1998) desenvolveram um modelo de classificação de produtos químicos quanto à sua toxicidade sobre fungos entomopatogênicos. Esse sistema baseia-se em valores médios de porcentagem de conidiogênese e crescimento vegetativo das colônias dos fungos, para testes *in vitro*, efetuados em meio de cultura sólido. O índice estabelecido é interessante, pois leva em conta a produção de conídios como fator mais importante quando comparado com o crescimento vegetativo, já que são os propágulos do fungo que vão atuar no desenvolvimento da doença. Assim, se uma colônia cresce pouco, mas produz muitos conídios, a taxa de disseminação da doença tende a ser maior que no caso de uma colônia bem desenvolvida, mas com menor nível de conidiogênese. Outro aspecto relevante desse modelo é a tentativa de padronização dos testes de avaliação do efeito de produtos fitossanitários sobre fungos entomopatogênicos *in vitro*.

No modelo proposto, calculam-se valores percentuais com relação à testemunha (100%), aplicando-se, em seguida, para cada produto testado, a seguinte fórmula:

$$T = \frac{20(CV) + 80(ESP)}{100}, \text{ onde:}$$

T = valor corrigido para classificação do produto;

CV = porcentagem de crescimento vegetativo com relação à testemunha;

ESP = porcentagem de esporulação (conidiogênese) com relação à testemunha.

Os valores calculados de “T” são comparados com os seguintes limites estabelecidos: 0 a 30 = muito tóxico; 31 a 45 = tóxico; 46 a 60 = moderadamente tóxico; > 60 = compatível.

Os estudos *in vitro* têm a vantagem de expor ao máximo o microrganismo à ação do produto químico, fato que não ocorre em condições de campo, onde vários fatores servem de obstáculo a essa exposição, “protegendo” o entomopatógeno. Assim, constatada a inocuidade de um produto em laboratório, não há dúvidas sobre a sua seletividade em condições de campo. Por outro lado, a alta toxicidade de um produto *in vitro* nem sempre sugere a sua elevada toxicidade em campo, mas sim a possibilidade da ocorrência de danos dessa natureza (Alves et al., 1998).

No caso dos produtos imidacloprid e fipronil, a despeito de haver diferenças médias de até cerca de 30% no crescimento vegetativo e conidiogênese de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, pode-se considerar as duas formulações como compatíveis com esses entomopatógenos, quando utilizadas nas concentrações médias recomendadas ou em concentrações consideradas subletais (Tabela 6.3).

Tabela 6.3 - Valores calculados do índice “T” e classificação dos produtos imidacloprid e fipronil em relação ao efeito fungitóxico sobre *Beauveria bassiana* (isolado 634) e *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9)

Tratamentos	Valores de “T” ¹		Classificação ¹	
	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>
Fipronil	61,92	83,07	Compatível	Compatível
Fipronil (-) ²	69,12	87,22	Compatível	Compatível
Imidacloprid	81,02	95,85	Compatível	Compatível
Imidacloprid (-) ²	117,77	102,05	Compatível	Compatível

¹ Segundo Alves et al. (1998)

² Concentrações dos produtos 70% inferiores às recomendadas

A utilização de iscas atrativas com patógenos associados a produtos fitossanitários compatíveis é uma estratégia que pode viabilizar o uso desses microrganismos, tornando as aplicações mais eficientes e econômicas. Assim, Almeida & Alves (1996) estudaram a utilização de imidacloprid em associação com *B. bassiana* para o controle do cupim *H. tenuis* com iscas atrativas. Foram utilizadas concentrações subletais do produto químico, com a finalidade de provocar um estresse na praga, tornando-a mais sensível à ação do patógeno, visando diminuir e racionalizar o número de aplicações e a quantidade do produto necessária ao controle da praga. Nesse trabalho, os autores constataram a compatibilidade entre o fungo *B. bassiana* e o imidacloprid, de forma indireta, pois a presença do produto nas iscas não afetou a mortalidade dos cupins causada pelo entomopatógeno. Boucias et al. (1996b) afirmaram que bioensaios realizados visando o controle do cupim *Reticulitermes flavipes* demonstraram que o produto imidacloprid é inócuo a *B. bassiana*, não interferindo nos diversos aspectos do desenvolvimento desse fungo.

Batista Filho et al. (1995; 1996) avaliaram a compatibilidade do produto fipronil com os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*, respectivamente. Os resultados obtidos mostraram que fipronil não provocou redução significativa na produção de conídios, e nem alterou a viabilidade dos conídios produzidos, apesar de ter afetado ligeiramente o diâmetro médio da colônia quando comparado à testemunha. Na comparação dos resultados obtidos por esses autores com aqueles obtidos no presente trabalho, alguns pontos devem ser ressaltados. Além do efeito do ingrediente ativo (no caso, fipronil), pode haver um efeito secundário, ou em alguns casos, até mais significativo, causado pelo inerte adicionado à formulação comercial. Assim sendo, algumas restrições devem ser feitas na comparação referida, pois no trabalho de Batista Filho et al. (1996) foi usada a formulação 20 G do produto fipronil, enquanto que no presente estudo, utilizou-se a formulação 800 WG (grânulos dispersíveis em água) do mesmo ingrediente ativo.

Com relação à viabilidade dos conídios, todos os tratamentos resultaram em colônias que permaneceram com seus conídios 100% viáveis após as 20 horas decorridas do plaqueamento. No trabalho de Batista Filho et al. (1996) o teste de viabilidade foi conduzido a 27°C e fotofase de 14 horas, sendo a realização da contagem de conídios germinados feita após 15 horas. No presente estudo, em condições de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, com fotofase de 12 horas, a viabilidade foi lida após um período de 20 horas. Assim, apesar de não haver diferenças significativas no trabalho de Batista Filho et al. (1996), a viabilidade, inclusive na testemunha, foi de valores próximos a 100% (97,5 e 96,5% para a testemunha e fipronil, respectivamente), e não exatamente 100%, como no presente estudo. A compatibilidade pode variar com a linhagem do entomopatógeno avaliado, no que também diferem os dois trabalhos.

Torna-se importante, também, a realização de testes de patogenicidade com o microrganismo que cresceu no meio de cultura sob a influência do produto químico, com vistas à detecção de alterações que levem a perdas de patogenicidade e virulência do patógeno quando da aplicação do defensivo. Isso pode ser feito com qualquer inseto-teste, dando-se preferência a espécies suscetíveis ao patógeno e de fácil criação em

laboratório, como *Diatraea saccharalis* e *Galleria mellonella*, para que seja possível a realização de bioensaios padronizados.

6.3.2 Estudo do comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* na eliminação do inóculo de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sob o efeito de imidacloprid e fipronil

O efeito do comportamento de limpeza de *H. tenuis* pode ser observado comparando-se a quantidade de conídios depositada na superfície do tegumento dos insetos logo após a inoculação com *B. bassiana* (Figuras 6.3 A a F, 6.4 A a E) ou *M. anisopliae* (Figuras 6.4 F, 6.5 A a F) com a quantidade presente no tegumento dos insetos decorridas 6 e 12 horas após a inoculação (Figuras 6.3 B,C e 6.5 A,B, respectivamente).

A assepsia é feita pelos operários de *H. tenuis*, provavelmente, por meio do mecanismo conhecido por “grooming”, ou lambimento, e também pela remoção utilizando os tarsos e garras, fato que pode explicar a grande quantidade de conídios observada nessas estruturas das pernas, tanto nesse experimento, como naqueles analisados no Capítulo 5.

Considerando-se a hipótese da assepsia feita pelo lambimento, pode-se inferir que ocorre a ingestão e desativação dos conídios no aparelho digestivo dos cupins. Boucias et al. (1996a), trabalhando com *R. flavipes*, verificaram que os conídios que foram ingeridos pelos cupins não causaram infecção, além do que, em estudos complementares, esses autores detectaram que a flora microbiana existente em *R. flavipes* possui alta atividade fungistática para *B. bassiana*, promovendo a inibição da germinação de conídios. Também Bao & Yendol (1971) verificaram que conídios de *B. bassiana* haviam perdido sua integridade no aparelho digestivo de *R. flavipes*, porém, em alguns deles, em pequena quantidade, foi observada a ocorrência de germinação e penetração no epitélio do mesêntero.

Levando-se em conta a segunda hipótese, a da remoção dos conídios sem ingestão dos mesmos, pode-se afirmar que esses devem ser depositados em outros lugares, evitando assim a contaminação do resto da colônia. Para *R. flavipes*, segundo Boucias et al. (1996a), observou-se a utilização das galerias e túneis característicos desses cupins subterrâneos, para a desativação dos conídios, provavelmente pela atividade antimicrobiana existente no solo, bem como pela adição de substâncias pelos próprios cupins, através da saliva, contendo microrganismos antagônicos presentes no seu aparelho digestivo.

Quando se utilizou o produto imidacloprid, no presente trabalho, pode-se observar, nas duas concentrações estudadas, uma grande alteração no comportamento de limpeza dos cupins. As concentrações utilizadas mostraram-se subletais, ocorrendo a morte dos insetos somente após um período de mais de 24 horas após o contato com o produto, sendo que Almeida & Alves (1996) já haviam selecionado essas duas concentrações para testes com a utilização associada de imidacloprid e *B. bassiana* em iscas de papelão para o controle de *H. tenuis*. Essa alteração no comportamento de limpeza pode ser observada tanto para *B. bassiana* (Figuras 6.3 D,F) como para *M. anisopliae* (Figuras 6.5 C,E), comparando-se os insetos nos tratamentos imidacloprid (0,01%) (Figuras 6.3 F, 6.5 C) e imidacloprid (0,001%) (Figuras 6.3 D, 6.5 E), com a testemunha (Figuras 6.3 B, 6.5 A), logo às 6 horas após a inoculação.

Segundo Boucias et al. (1996b), 72% dos conídios de *B. bassiana* foram removidos, logo nas 2 horas após a inoculação, em *R. flavipes*, sendo que às 24 horas, praticamente não havia conídios sobre os insetos. Isso pode ser observado nesse estudo, comparando-se as Figuras 6.3 C e 6.5 B, as quais retratam a pequena ou quase nula quantidade de conídios de *B. bassiana* ou *M. anisopliae* presentes nos cupins decorridas 12 horas após a inoculação, o que não ocorre nos tratamentos com imidacloprid (Figuras 6.3 E; 6.4 A; 6.5 D,F).

Dessa forma, o produto imidacloprid alterou a resistência comportamental observada naturalmente nos cupins. Aliado ao entomopatógeno, esse produto pode agir de forma sinérgica, permitindo que uma maior quantidade de conídios germine e inicie o

processo de doença. Essa associação pode assegurar que tanto o produto como o patógeno possam ser utilizados em pequenas concentrações, levando à redução de custos e aumentando a segurança e a eficiência do controle.

Além disso, deve-se considerar o aspecto positivo estudado no item anterior, que confere ao produto características de compatibilidade com o entomopatógeno, favorecendo a sua utilização nessa estratégia de controle associado.

Com relação ao produto fipronil, não se verificou alteração no comportamento de limpeza dos insetos, nas duas concentrações utilizadas. Comparando-se a quantidade de conídios de *B. bassiana* depositados sobre os insetos decorridas às 6 e 12 horas após a inoculação, com a testemunha, percebe-se que houve a retirada quase total dos conídios (Figura 6.4 B,C,D,E). Não foram feitos registros com relação ao fungo *M. anisopliae*, pois não havia conídios depositados na superfície dos insetos, já nas 6 horas após a inoculação, sendo o material idêntico à testemunha.

Essa diferença entre os dois produtos pode estar ligada ao modo de ação de cada um sobre o inseto. Imidacloprid é um inseticida sistêmico do grupo das nitroguanidinas, com ação de contato e ingestão, e, segundo Boucias et al. (1996b), atua como uma neurotoxina, ligando-se ao receptor nicotínico da acetilcolina. Fipronil é um inseticida do grupo fenil pirezol, que também atua sobre o sistema nervoso central, porém como um inibidor reversível do receptor GABA (ácido gama-aminobutírico) (Andrei, 1996). Analisando-se bioensaios preliminares, e observando-se o comportamento dos insetos após o contato com os dois inseticidas, foi possível observar que, nas concentrações utilizadas, fipronil foi bem mais tóxico, alterando rapidamente a mobilidade dos insetos e provocando mortalidade mais rápida. Porém, esse efeito não se notabilizou por alterar o comportamento de limpeza dos insetos na presença desse produto, ao contrário do que ocorreu com imidacloprid. Dessa forma, não se pode considerar o produto fipronil, nas concentrações analisadas, como sendo um estressor, que venha a ser utilizado na estratégia preconizada, em associação ao entomopatógeno para o controle de *H. temis*, como foi constatado para imidacloprid. Assim, é recomendável a realização de estudos que definam mais precisamente as concentrações

subletais de fipronil, e que se façam experimentos para verificar a capacidade de limpeza dos insetos, visando melhor conhecer o comportamento de *H. tenuis* frente a esse ingrediente ativo.

Figura 6.3 - Alterações no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* inoculados com *Beauveria bassiana* (isolado 634). Fotografias ao microscópio eletrônico de varredura. A, B e C) Testemunha às 0, 6 e 12 horas após a inoculação (1000 X 4, 500 X 2 e 500 X 4, respectivamente). D e E) Imidacloprid (0,001%) às 6 e 12 horas (500 X 4 e 500 X 8, respectivamente). F) Imidacloprid (0,01%) às 6 horas (1000 X 2)

Figura 6.4 - Alterações no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* inoculados com *Beauveria bassiana* (isolado 634) (de A a E) e *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) (F). Fotografias ao microscópio eletrônico de varredura. A) Imidacloprid (0,01%), às 12 horas (2000 X). B e C) Fipronil (0,001%), às 6 e 12 horas (1500 X e 1000 X 2, respectivamente). D e E) Fipronil (0,01%), às 6 e 12 horas (1000 X 4 e 1000 X, respectivamente). F) Testemunha, 0 horas (1000 X 2)

Figura 6.5 - Alterações no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* inoculados com *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9). Fotografias ao microscópio eletrônico de varredura. A e B) Testemunha, às 6 e 12 horas (500 X 4 e 500 X, respectivamente). C e D) Imidacloprid (0,01%), às 6 e 12 horas (1000 X 2 e 500 X 4, respectivamente). E e F) Imidacloprid (0,001%), às 6 e 12 horas (1000 X e 500 X, respectivamente)

7 CONCLUSÕES

Beauveria bassiana (isolado 634) e *Metarhizium anisopliae* (isolado E-9) têm sua eficiência no controle de *H. tenuis* afetada pela ação de microrganismos do solo.

O fungo *Trichoderma* sp. afeta o desenvolvimento de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, inibindo o crescimento micelial, quando inoculado simultaneamente ou num intervalo de 48 horas após a inoculação destes entomopatógenos.

B. bassiana e *M. anisopliae* desenvolvem-se normalmente quando inoculados 168 horas antes da inoculação de *Trichoderma* sp.

O extrato de *Trichoderma* sp. altera o crescimento micelial e a conidiogênese de *B. bassiana* quando adicionado na concentração de 5 ml de extrato/100 ml de meio de cultura. Para *M. anisopliae* o extrato atua a partir da concentração de 1 ml de extrato/100 ml de meio de cultura.

As fases de penetração, colonização e conidiogênese são mais rápidas para *M. anisopliae* que para *B. bassiana*, o que reflete em maior rapidez na mortalidade de *H. tenuis*.

A técnica de fixação com vapor de tetróxido de ósmio é adequada para estudos de acompanhamento do ciclo de infecção de fungos entomopatogênicos através de microscopia eletrônica de varredura.

Os produtos imidacloprid e fipronil são compatíveis com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. *M. anisopliae* é menos suscetível aos produtos testados que *B. bassiana*.

O produto imidacloprid altera o comportamento de limpeza dos operários de *H. tenuis*, enquanto o produto fipronil não provoca alteração nesse mecanismo de proteção do inseto.

A utilização de concentrações subletais de imidacloprid em associação com *B. bassiana* ou *M. anisopliae* é viável numa estratégia de introdução inoculativa para o controle de *H. tenuis*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos realizados demonstram a importância de microrganismos antagônicos presentes na flora microbiana do solo, os quais atuam na diminuição da eficiência dos agentes de controle microbiano. Dessa forma, a utilização de iscas para o controle do cupim subterrâneo pode promover proteção ao entomopatógeno, permitindo sua atuação efetiva, causando a infecção de indivíduos que transmitirão a doença para o restante da colônia, caracterizando a introdução inoculativa do agente entomopatogênico. Além disso, deve-se ressaltar o aspecto ecológico, sendo essa estratégia de controle muito mais segura, na medida em que direciona o agente de controle para o inseto-alvo, com menor ação do mesmo sobre organismos não-alvo e sobre o ambiente como um todo.

A característica de seletividade aos fungos apresentada pelos produtos fitossanitários analisados favorece a utilização do controle associado, promovendo o aproveitamento do efeito estressor do inseticida, que altera a capacidade de limpeza dos insetos, permitindo a persistência de uma maior quantidade de inóculo para o início da doença.

A utilização de iscas atrativas impregnadas com fungos entomopatogênicos, associados ou não a produtos fitossanitários compatíveis é, dessa forma, a estratégia mais viável para o controle do cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.E.M. Avaliação de fungos entomopatogênicos visando ao controle do cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858) (Isoptera, Rhinotermitidae). Piracicaba, 1994. 105p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. Seleção de armadilhas para a captura de *Heterotermes tenuis* (Hagen). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.24, n.3, p.619-624, dez. 1995.
- 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, dez. 1996.
- ALTSON, R.A. A fungus parasitic on *Coptotermes curvignathus*, Holmgr. **Nature**, n.160, p.120, July 1947.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (ed.) **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Fealq, 1998. /No prelo/
- ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO JR., A.; STIMAC, J.L.; PEREIRA, R.M. Uso de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* no controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) em pastagens. **Ecossistema**, v.20, p.50-57, out. 1995.

- ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO JR., A.; PEREIRA, R.M.; SILVEIRA NETO, S. Control of termites using entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. In INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 20., Firenze, 1996. **Abstracts**. Firenze, 1996, p.691.
- ALVES, S.B.; MOINO JR., A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo: Fealq, 1998. /No prelo/
- ALVES, S.B.; ALVES, L.F.A.; LOPES, R.B.; VIEIRA, S.A. 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.
- ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em bandejas. **Ecossistema**, v.14, p.188-192, 1989.
- AMARAL, E.; ALVES, S.B. Insetos úteis. Piracicaba: Livroceres. 192p., 1979.
- ANDREI. Compêndio de defensivos agrícolas. 5a. edição. São Paulo: Organização Andrei Editora Ltda. 506p., 1996.
- ARRIGONI, E.B.; ALMEIDA, L.C.; KASTEN JR., P.; PRECETTI, A.A.C.M. Distribuição de espécies de cupins em cana-de-açúcar, em unidades cooperativas das regiões de Jau e Sertãozinho. **Boletim Técnico Copersucar**, n.48, p.38-47, 1989.
- 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.

- BARAK, R.; CHET, I. Determination, by fluorescein diacetate staining, of fungal viability during mycoparasitism. **Soil Biology and Biochemistry**, v.18, n.3, p.315-319, 1986.
- BATISTA FILHO, A.; LEITE, L.G.; ALVES, E.B. Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* com fipronil e carbofuran. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.62 (supl.), p.1-98, 1996.
- BATISTA FILHO, A.; LEITE, L.G.; ALVES, E.B.; AGUIAR, J.C. Controle de *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae) por fipronil e seu efeito sobre *Beauveria bassiana*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.63, n.2, p.47-51, jul./dez. 1996.
- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v.72, n.4, p.379-382, 1982.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L., ed. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap.36, p.717-728.
- 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.
- 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.
- BLACKWELL, M.; MALLOCH, D. Similarity of *Amphoromorpha* and secondary capilliconidia of *Basidiobolus*. **Mycologia**, v.81, n.5, p.735-741, 1989.
- 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.; FARIA, M.R. Insect defense mechanisms against microorganisms. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6. Foz do Iguaçu, 1996. **Anais: conferências e palestras**. Foz do Iguaçu: Embrapa/CNPSo. 1996a. p.249-257.
- BOUCIAS D. G.; STOKES, C.; STOREY, G.; PENDLAND, J. C. 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, 1996b.
- CAMPOROTA, P. Antagonisme *in vitro* de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Kühn. **Agronomie**, v.5, n.7, p.613-620, 1985.
- CHAI, Y.Q. Preliminary studies on the pathogenicity of some entomogenous fungi to *Coptotermes formosanus*. **Chinese Journal of Biological Control**, v.11, n.2, p.68-69, 1995. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-Rom**, 1995/

- 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.
- CHASE, A.R.L.; OSBORNE, S.; FERGUSON, V.M. Selective isolation of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, and *Metarhizium anisopliae*, from an artificial potting medium. **Florida Entomologist**, v.69, p.285-292, 1986.
- COPPEL, H.C.; LIANG, M.C. Rhabditoid nematodes associated with subterranean termites. **Forestry research notes**. Department of Forestry, University of Wisconsin, 1987. n.274, 5p. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-Rom**, 1990-91/
- 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.
- DE LA CRUZ, J.; PINTOR-TORO, J. A.; BENÍTEZ, T.; LLOBELL, A. Purification and characterization of an endo- β -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.7, p.1864-1871, Apr. 1995.
- 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.
- FARGHAL, A.I.; DARWISH, Y.A.; GALIL, F.A. Relative susceptibility of four insect species to some bacterial insecticides. **Assiut Journal of Agricultural Sciences**, v.18, n.2, p.21-30, 1987. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-Rom**, 1987-1989/

FARGUES, J.; ROBERT, P.H.; AUBART, C. Biodegradation of entomopathogenic hyphomycetes: influence of clay coating on *Beauveria bassiana* blastospore survival in soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.41, n.2, p.131-142, 1983.

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. 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, 1992.

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.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S. et al. **Manual de Entomologia Agrícola**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1988. 649p.

GITONGA, N.; EILENBERG, J.; MANIANIA, N.K.; OCHIEL, G.R.S. 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.

- GRACE, J.K. Protocol for testing effects of microbial pest control agents on nontarget subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Economic Entomology**, v.87, n.2, p.269-274, 1994.
- GRACE, J.K.; YAMAMOTO, R.T.; EBESU, R.H. Laboratory evaluation of the novel soil insecticide silafluorfen against *Coptotermes formosanus* Shikari (Isoptera, Rhinotermitidae). **Journal of Applied Entomology**, v.113, n.5, p.466-471, 1992.
- 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. The life cycle of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the termite *Nasutitermes exitiosus*. **Mycopathologia**, v.80, p.137-145, 1982a.
- 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, 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.
- HUNT, D. W. A.; BORDEN, J. H.; RAHE, J. E. Nutrient-mediated germination of *Beauveria bassiana* conidia on the integument of the Bark beetle *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.44, p.304-314, 1984.
- INBAR, J.; MENENDEZ, A.; CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. **Soil Biology and Biochemistry**, v.28, n.6, p.757-763, 1996.
- JEFFRIES, P.; YOUNG, T.W.K. **Interfungal parasitic relationships**. Cambridge: University Press, 1994. 296p.
- JONES, W.E.; GRACE, K.; TAMASHIRO, M. Virulence of seven isolates of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Environmental Entomology**, v.25, n.2, p.481-487, Apr. 1996.
- KAKALIEV, K.; SAPARLIEV, K. A study of the pathogenicity of Entobaktrin to termite in nature. **Biologicheskikh Nauk**. v.6, p.39-41, 1975. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1976-78/
- KALAVATI, C. A new cephaline gregarine, *Steinina coptotermi* n.sp. from *Coptotermes heini*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PROTOZOOLOGY, 5., New York, 1977. **Abstracts**. p. 404. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1976-78/

- KHAN, S.R.; ALDRICH, H.C. The haustoria of *Termitaria snyderi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.25, n.2, p.247-260, 1975.
- KHAN, H.K.; JAYARAJ, S; GOPALAN, M. Testing of entomopathogenic fungi against agro-forestry termite, *Odontotermes wallonensis* (Wassmann). **Indian Journal of Forestry**, v.15, n.4, p.342-345, 1992. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-Rom**, 1993-94/
- KIMBROUGH, J.W.; MORALES, M.I. A new species of *Dimeromyces* (Laboulbeniales) on subterranean termites. **Mycologia**, v.64, p.388-393, 1972.
- KO, W.H.; FUJII, J.K.; KANEGAWA, K.M. The nature of soil pernicious to *Coptotermes formosanus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.39, n.1, p.38-40, 1982.
- KRAMM, K.R.; WEST, D.F. Termite pathogens: effects of ingested *Metarhizium*, *Beauveria* and *Gliocladium* conidia on worker termites (*Reticulitermes* sp.). **Journal of Invertebrate Pathology**, 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.
- KRASNOFF, S.B.; GUPTA, S. Identification of the antibiotic phomalactone from the entomopathogenic fungus *Hirsutella thompsonii* var. *synnematos*. **Journal of Chemical Ecology**, v.20, n.2, p.293-302, 1994. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1995/

- KREJZOVÁ, R. Experiments with *Entomophthora* species against termites. **Entomophaga**, v.16, n.2, p.221-231, 1971.
- KREJZOVÁ, R. Ultrastructure of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown et Smith isolated from *Zoothermopsis* sp. **Ceska Mycologie**, v.30, n.2, p.110-114, 1976. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1976-78/
- KRIEG, A. Interactions between pathogens. In: BURGESS, H.D.; HUSSEY, N.W., ed. **Microbial control of insects and mites**. London: Academic Press, 1971. p.459-468.
- 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.; MYLES, T.G. Host specificity and molecular characterization of the entomopoxvirus of the Lasser migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.62, n.3, p.241-247, 1993.

- LOECK, A.E.; NAKANO, O. Persistência de dois inseticidas piretróides num solo barro-areno-argiloso em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.23, n.7, p.709-715, jul. 1988.
- LOGAN, J.W.M.; CONIE, R.H.; WOOD, T.G. Termite (Isoptera) control in agriculture and forestry by non-chemical methods: a review. **Bulletin of Entomological Research**, v.80, n.3, p.309-330, 1990.
- LOPES, R. B.; VIEIRA, S. A.; ALVES, S.B. et al. Infecção e conidiogênese de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Heterotermes tenuis*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6., Foz do Iguaçu, 1996. **Anais: Sessão de Pôsteres**. Foz do Iguaçu: Embrapa/CNPSo, 1996. p.362.
- LUND, A.E. Microbial control of termites. In: BURGESS, H.D.; HUSSEY, N.W., ed. **Microbial control of insects and mites**. London: Academic Press, 1971. p.385-386.
- LYUTIKOVA, L.I. The influence of soil substrates of the nest of the large Transcaspian termite *Anacanthotermes ahngerianus* Jac. on the development of entomopathogenic fungi. **Mikologiya i Fitopatologiya**, v.24, n.6, p.520-528, 1990. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1992/
- MACEDO, N. Atualização no controle de cupins subterrâneos em cana-de-açúcar. In: BERTI FILHO, E.; FONTES, L.R., ed. **Alguns aspectos atuais da biologia e controle de cupins**. Piracicaba: Fealq, 1995. p.121-126.

- MACEDO, N.; BOTELHO, P.S.M.; CASALI, I.J.; RIBEIRO, L.D. Controle de *Heterotermes tenuis* (Isoptera: Rhinotermitidae) em dois cortes de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., Salvador, 1997. **Resumos**. Salvador: SEB, 1997a. p.190.
- MACEDO, N.; CAMPOS, M.B.S.; BOTELHO, P.S.M. Iscas no controle de *Heterotermes tenuis* (Isoptera: Rhinotermitidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., Salvador, 1997. **Resumos**. Salvador: SEB, 1997b. p.190.
- MARKOVA, G. *Melanospora parasitica* attacking *Beauveria bassiana* on ash weevil *Stereonychus fraxini* in Bulgaria. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.58, n.3, p. 450-452, 1991.
- 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.
- MILL, A.E. Termite as agricultural pests in Amazonia, Brazil. **Outlook on Agriculture**, v.21, n.1, p.41-46, 1992.
- MILNER, R.J. Selection and characterization of strains of *Metarhizium anisopliae* for control of soil insects in Australia. In: BIOLOGICAL CONTROL OF LOCUSTS AND GRASSHOPPERS, 1., Cotonou, 1991. **Abstracts**. Cotonou: International Institute of Tropical Agriculture, 1992. p.200-207.
- MOORHOUSE, E.R.; GILLESPIE, A.T.; CHARNLEY, A.K. Laboratory selection of *Metarhizium* spp. isolates for control of vine weevil larvae (*Otiorhynchus sulcatus*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.62, n.1, p.15-21, July 1993.

- MYLES, T.G. The trap-treat-releax technique for control of subterranean termites. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 19. Beijing, 1992. **Resumos**. Beijing, 1992. p.VII W-1.
- NEVES, P.M.O.J.; FERNANDEZ, F.B.; ALVES, S.B. Equipamento de fácil construção, para a coleta de esporos de fungos entomopatogênicos produzido em meio de arroz ou similares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 13. Recife, 1991. **Resumos**. Recife: SEB, 1991. p.249.
- 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 Pôsteres**. 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.
- NOVARETTI, W.R.T. Controle de cupins em cana-de-açúcar através do emprego de inseticidas de solo. **Boletim Técnico Copersucar**, v.33, p.39-44, 1985.
- 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.

- PASSOS JR., N.C.; ALVES, S.B. Controle de *Heterotermes tenuis*, cupim subterrâneo da cana-de-açúcar, com *Steinernema carpocapsae*. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 3. 1995. **Resumos**. Piracicaba, 1995. p.380.
- PIZANO, M.A. Cupins em área canavieira. In: BERTI FILHO, E.; FONTES, L.R., ed. **Alguns aspectos atuais da biologia e controle de cupins**. Piracicaba: Fealq, 1995. p.103-114.
- PIZANO, M.A.; FONTES, L.R. Ocorrência de *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858) e *H. longiceps* (Snyder, 1924) (Isoptera, Rhinotermitidae) atacando cana-de-açúcar no Brasil. **Brasil Açucareiro**, v.104, n.3/4, p.29, 1986.
- POINAR JR., G.O.; GEORGIS, R. Characterization and field application of *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP 88 (Heterorhabditidae: Rhabditida). **Revue de Nematologie**, v.13, n.4, p.387-393, 1990. /Resumos em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1990-91/
- 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.
- RAI, B.; SINGH, V.N.; SINGH, D.B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. **Plant and Soil**, v.57, p.131-135, 1980.
- ROBERTS, D.; KRASNOFF, S.B. Toxinas e enzimas de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (ed.). **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Fealq, 1998. /No prelo/

- SAJAP, A.S.; KAUR, K. Histopathology of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus, infection on the termite, *Coptotermes curvignathus*. **Pertanika**, v.13, n.3, p.331-334, 1990.
- SMITH, J.L.; RUST, M.K. Vapor activity of insecticides used for subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) control. **Journal of Economic Entomology**, v.84, n.1, p.181-184, 1991.
- SMITH, J.L.; RUST, M.K. Activity and water-induced movement of termiticides in soil. **Journal of Economic Entomology**, v.85, n.2, p.430-434, 1992.
- 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.
- STAPLES, J.A.; MILNER, R.J.; LENZ, M. *Metarhizium anisopliae* as a mycotermicide - laboratory behavioural bioassay. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 20. Firenze, 1996. **Proceedings**. Firenze: p.571.
- SU, N.Y.; SCHEFFRAHN, R.H. Comparison of eleven soil termiticides against the Formosan Subterranean Termite and Eastern Subterranean Termite (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Economic Entomology**, v.83, n.5, p.1918-1924, 1990.

- SU, N.Y.; SCHEFFRAHN, R.H.; BAN, P.M. Barrier efficacy of pyrethroid and organophosphate formulations against subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Economic Entomology**, v.86, n.3, p.772-776, 1993.
- TURHAN, G.; GROSSMANN, F. Antagonistic activity of five *Myrothecium* species against fungi and bacteria *in vitro*. **Journal of Phytopathology**, v.140, p.97-113, 1994.
- 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, n.4, p.1027-1029, Aug. 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.
- ZECK, W.M.; MONKE, B.J. Synergy in soil and bait applications of imidacloprid with entomogenous fungi in termite control. In: ANNUAL MEETING OF THE ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA, 25, Baltimore, 1992. Bayer, Germany, 1992, p.1-17.
- ZOBERI, M.H. *Metarhizium anisopliae*, a fungal pathogen of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Mycologia**, v.87, n.3, p.354-359, 1995.