AÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS SOBRE CUPINS XILÓFAGOS

Nasutitermes globiceps (Holmgren)

(ISOPTERA: TERMITIDAE: NASUTITERMITINAE)

ADRIANA DONIZETTI CARVALHO COSTA

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. **EVONEO BERTI FILHO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Madeiras.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Dezembro - 2000

ERRATA

Página 16 – 6ª linha: onde se lê “constrói”, leia-se “construídos”.

Página 26 – 3º parágrafo incluir: “O teste teve duração de duas semanas”.

Página 28 – 4ª linha: onde se lê “entretanto, não são patógenos obrigatórios”, leia-se “sendo patógenos oportunistas”.

Página 35 – 6º parágrafo: eliminar “e ligeiramente inferior”.

Página 36 – Item 4.3.1.2, 1º parágrafo: onde se lê “A (Tirando os cupins mortos) e B (Não tirando os cupins mortos)” leia-se “A (Eliminando os cupins mortos) e B (Não eliminando os cupins mortos)”.

Página 37 – Tabela 5, coluna “Grupos” onde se lê “A-tirando os cupins mortos diariamente e B-não tirando os cupins mortos” leia-se “A-eliminando os cupins mortos diariamente e B-não eliminando os cupins mortos”.

Página 39 – Tabela 6, excluir a coluna “Grupos” A (Tirando os cupins mortos).
Na coluna Média de mortalidade (%) de *N. globiceps* após 7 dias, onde se lê “55,1 b”, leia-se “55,1 c” e onde se lê “42,1c” leia-se “42,1 b”.

Página 41 – substituir o primeiro parágrafo por: “Os fungos isolados e identificados como *Aspergillus* sp. 1, *Aspergillus* sp. 4 e *Gliocladium* sp. foram patogênicos ao cupim da espécie *Nasutitermes globiceps*”.

Página 42 – 3ª referência: onde se lê “20”, leia-se “2º”.

Página 58 – Tabela 9: onde se lê “uma semana”, leia-se “duas semanas”.

Página 59 – Apêndice 3: onde se lê “transmissibilidade”, leia-se “repelência”.

Página 60 – Tabela 10: onde se lê “transmissibilidade”, leia-se “repelência”.

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

Costa, Adriana Donizetti Carvalho

Ação de isolados de fungos sobre cupins xilófagos *Nasutitermes globiceps*
(Holmgren) (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae) / Adriana Donizetti Carvalho
Costa. - Piracicaba, 2000.

60 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Controle biológico 2. Cupim xilófago 3. Fungo entomopatogênico 4. Relação
fungo-inseto I. Título

CDD 634.96736

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS SOBRE CUPINS XILÓFAGOS

***Nasutitermes globiceps* (Holmgren)**

(ISOPTERA: TERMITIDAE: NASUTITERMITINAE)

ADRIANA DONIZETTI CARVALHO COSTA

Aprovada em:

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Evoneo Berti Filho

Prof. Dr. Ivaldo Pontes Jankowski

Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken

Prof. Dr. Evoneo Berti Filho

orientador

Para meus pais

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Tadeu de Lelis, cuja orientação, paciência e auxílio permitiram a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Evoneo Berti Filho, que aceitou a orientação na fase final do trabalho contribuindo para que este fosse concluído.

Ao Prof. Dr. Marcio Augusto Rabelo Nahuz, Sérgio Brazolin, e Geraldo José Zenid do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT, pelo apoio e incentivo.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo auxílio financeiro.

Aos professores do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT e da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ, pelas informações prestadas ao longo do Curso.

À Dra. Rosely Ana Piccolo Grandi, do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, pela identificação dos fungos.

Aos amigos Reginaldo do Laboratório de Micologia, Décio, Gilson, Daniel e toda a equipe do Laboratório de Entomologia, do IPT pelo auxílio na coleta e manutenção dos cupins e fungos.

Ao amigo Antonio Carlos Franco Barbosa, pelo estímulo de sempre com suas filosofias.

Aos colegas do curso pelo estímulo e hospitalidade demonstrados durante o curso.

Aos amigos e companheiros de todo o dia, Cristiane Tabarelli Barillari, Ricardo Ramos Cabrera, Graziela Cury, muito obrigada pela convivência que fazia nossos dias sempre felizes.

Aos meus colegas de origem do Agrupamento de Preservação de Madeiras, Maria Beatriz Bacellar Monteiro, João Luis, Gonzalo Lopes Caballera, Lígia Ferrari e Raquel Dias pelo incentivo e auxílio.

A todos os colegas do Agrupamento de Propriedades Básicas da Madeira do IPT.

Ao Carlo Mazza Brito Melfi e a todos os meus familiares que compreenderam as minhas ausências nos finais de semana e sempre me apoiaram.

Aos amigos que estavam sempre à procura de um ninho de cupim.

Aos meus pais sem os quais nada disso seria possível.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	x
SUMMARY	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Biodeterioração da madeira	3
2.2 Fungos Entomopatogênicos	4
2.2.1 Classificação Taxonômica	4
2.2.2 Isolamento	6
2.2.3 Manutenção	7
2.2.4 Identificação	8
2.2.5 Desenvolvimento dos fungos no hospedeiro	9
2.2.6 Patogenicidade a animais vertebrados	12
2.3 Cupins	13
2.3.1 Classificação Taxonômica	13
2.3.2 Biologia dos Cupins	13
2.3.3 Problemática dos Cupins em Edificações	15
2.4 Testes de Patogenicidade	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Organismos	21
3.1.1 Fungos	21
3.1.2 Cupins	22
3.2 Isolamento e Manutenção dos Microrganismos	22
3.3 Identificação dos Microrganismos	23
3.4 Testes de Patogenicidade	23
3.4.1 Seleção de Substratos para a Manutenção dos Cupins	23

3.4.2 Confirmação da Patogenicidade	24
3.4.3 Teste de Repelência	25
3.4.4 Análise Estatística	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Isolamento, Manutenção e identificação dos Microrganismos	27
4.1.1 Fungos	27
4.2 Seleção de Substratos para a Manutenção dos Cupins	32
4.3 Testes de Patogenicidade	33
4.3.1 Fungos	33
4.3.1.1 Teste com duração de uma semana	33
4.3.1.2 Teste com duração de duas semanas	36
4.3.2 Teste de Repelência	38
5 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
APÊNDICE 1	52
APÊNDICE 2	54
APÊNDICE 3	59

AÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS SOBRE CUPINS XILÓFAGOS

Nasutitermes globiceps (Holmgren)

(ISOPTERA: TERMITIDAE: NASUTITERMITINAE)

Autora: ADRIANA DONIZETTI CARVALHO COSTA

Orientador: Prof. Dr. EVONEO BERTI FILHO

RESUMO

Os fungos entomopatogênicos têm sido estudados para o controle de cupins xilófagos em substituição aos pesticidas químicos que são nocivos ao ambiente. Com o objetivo de detectar fungos patogênicos a cupins xilófagos foram isoladas 21 espécies de fungos mitospóricos (Subdivisão Deuteromycotina) presentes em ninhos e no exoesqueleto de cupins mortos, pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Gliocladium*. Em testes laboratoriais para determinar a potencial patogenicidade dos fungos, uma suspensão pura aquosa de conídios foi inoculada em cupins da espécie *Nasutitermes globiceps* mantidos em placas de Petri com meio de cultura ágar-água e papel-filtro. O fungo *Aspergillus* sp. 1 apresentou patogenicidade superior e significativamente diferente do controle inoculado com água esterilizada e inferior à apresentada pelo fungo utilizado como padrão *Metarhizium anisopliae*. Em testes de repelência constatou-se que os fungos *Aspergillus* sp. 1 e *Metarhizium anisopliae* não foram repelentes ao cupim *Nasutitermes globiceps* podendo ser usados em futuros testes de campo para avaliar sua eficiência.

ACTION OF ISOLATED FUNGI IN WOOD TERMITES *Nasutitermes*
***globiceps* (Holmgren)**
(ISOPTERA: TERMITIDAE: NASUTITERMITINAE)

Author: ADRIANA DONIZETTI CARVALHO COSTA

Adviser: Prof. Dr. EVONEO BERTI FILHO

SUMMARY

In a survey to detect fungi pathogenic to termites, 21 species of fungi were isolated from nests and the body of dead termites. Isolates were identified as *Aspergillus*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Paecilomyces* and *Trichoderma*. To determine the potential pathogenicity of fungi, aqueous suspensions at 10^7 conidia/ml were applied to *Nasutitermes globiceps* maintained in Petri dishes filled with water-agar and filter paper. The fungus *Aspergillus* sp. 1 was pathogenic to termites showing significant difference compared to the control inoculated with sterilized water, but were less virulent than *Metarhizium anisopliae* used as standard. Repellency tests indicated that *Aspergillus* sp. 1 and *Metarhizium anisopliae* did not show repellency to *Nasutitermes globiceps*, holding promise for further development in field tests.

1 INTRODUÇÃO

As interações entre fungos e cupins têm sido estudadas por vários autores e foram revisadas por Amburgey (1979) e Sands (1969). Entretanto, a natureza dessas relações ainda tem sido discutida. Os fungos podem atuar de modo benéfico, servindo de alimento aos cupins e digerindo parcialmente a madeira utilizada por eles ou podem atuar como agentes prejudiciais, no caso dos fungos entomopatogênicos (Zoberi & Grace, 1990a). O interesse no desenvolvimento de estratégias de controle biológico dos cupins tem crescido pois a aplicação de inseticidas químicos, tradicionalmente o principal método de controle utilizado, é um problema que pode ser agravado pelo uso indiscriminado desses produtos, gerando riscos à saúde humana e ao ambiente (Lelis, 1994). Os fungos entomopatogênicos são os candidatos mais indicados como agentes biológicos controladores, constituindo uma alternativa promissora ao uso de inseticidas químicos, pois podem ocorrer nos mesmos ambientes dos térmitas, multiplicam-se naturalmente, são patogênicos apenas aos organismos alvo e não são repelentes aos insetos (Zoberi, 1995).

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de isolar, identificar, conhecer o modo de desenvolvimento dos fungos e avaliar a patogenicidade destes organismos aos cupins.

Entre as décadas de 30 e 90 foram publicados no Brasil cerca de 700 trabalhos na área de patologia e controle microbiano de insetos, sendo aproximadamente 56% dos trabalhos relacionados aos fungos entomopatogênicos e 60% desse total com o fungo *Metarhizium anisopliae*. Os vírus entomopatogênicos representam 15%, as bactérias 12% e o restante são trabalhos com outros patógenos e sobre aspectos gerais da patologia e controle

microbiano (Alves, 1990).

Para o desenvolvimento de estratégias e programas eficazes de manejo, é importante que se conheça e entenda os processos que envolvem o controle como um todo, desde a ecologia dos organismos envolvidos até o modo de ação dos patógenos sobre os insetos.

O objetivo deste estudo foi detectar fungos patogênicos a cupins xilófagos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biodeterioração da madeira

A madeira é um material utilizado pelo homem desde os tempos pré-históricos, contribuindo nos diversos avanços alcançados pelo homem, como na construção dos navios e na fabricação de papel. Mesmo nos dias atuais, onde o desenvolvimento da ciência e tecnologia propicia o surgimento de materiais sofisticados, a madeira ainda desempenha um papel muito importante em vários segmentos econômicos, como os da construção civil e de mobiliário (Zenid, 1997).

A madeira, apesar de ser um dos materiais mais utilizados na construção, apresenta algumas desvantagens, dentre as quais a biodeterioração, que ocorre principalmente devido ao fato dos seus polímeros naturais, presentes na parede celular, serem fonte de nutrição para vários grupos de organismos, capazes de metabolizá-los e digerí-los (Oliveira et al., 1986).

Cerca de um terço da madeira produzida mundialmente não é aproveitada devido a problemas causados por agentes biodeterioradores (fungos apodrecedores, cupins e brocas). Em regiões tropicais e subtropicais os térmitas são um dos maiores responsáveis por danos causados na madeira e pelos elevados prejuízos econômicos decorrentes desses danos (Edwards & Mill, 1986).

Os cupins se alimentam fundamentalmente de celulose, e a madeira, devido ao alto teor desse polímero, é o alimento preferido por um grande número de espécies. Entretanto são poucos os animais capazes de

digerir a celulose por seus próprios meios. No caso dos cupins, em particular as espécies que se alimentam de madeira, pode ocorrer uma associação com protozoários ou bactérias, que vivem no seu intestino e que possuem um sistema enzimático capaz de degradar a celulose, fornecendo ao inseto os produtos dessa degradação (Oliveira et al., 1986).

2.2 Fungos Entomopatogênicos

Há, aproximadamente, 150 anos foi observado que os fungos causavam doenças em insetos. A primeira demonstração experimental dessa interação foi realizada não com o objetivo do controle de pragas, mas sim para controlar os danos causados por doenças em insetos comercialmente importantes como o bicho-da-seda *Bombix mori* (Lepidoptera: Bombycidae). O responsável por esse estudo foi Agostino Bassi, que em 1834, demonstrou experimentalmente a natureza da infecção com o fungo *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) (Van Driesche & Bellows Jr., 1996).

Desde então, cerca de 750 espécies de fungo foram identificadas como causadoras de doenças em insetos, constituindo o maior grupo de organismos entomopatogênicos (Soper & Ward, 1981).

Define-se como fungos entomopatogênicos aqueles que causam morte prematura em insetos hospedeiros. Eles têm sido isolados de insetos, tanto aquáticos como terrestres, em regiões tropicais, subtropicais, temperadas e até no deserto (Glare & Milner, 1992).

2.2.1 Classificação Taxonômica

Os fungos entomopatogênicos, descritos até o momento, pertencem principalmente à morfodivisão Deuteromycetes, mais recentemente denominados fungos mitospóricos (Alexopoulos et al., 1996).

Os fungos mitospóricos possuem representantes em 40 gêneros, dos quais os mais freqüentes e mais estudados são *Aschersonia*, *Beauveria*, *Culicinomyces*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Tolypocladium* e *Verticillium*. O gênero mais comum, da classe Ascomycetes, e o mais freqüente em florestas tropicais é *Cordyceps* (Clavicipitales). A ordem Entomophthorales é a única dentro da classe Zygomycetes que possui representantes entomopatogênicos, existindo atualmente, por volta de 200 espécies conhecidas. As poucas espécies da classe Oomycetes que são patogênicas aos insetos, estão representadas em 2 gêneros, *Lagenidium* (Lagenidiales) e *Leptolegnia* (Saprolegniales) (Glare & Milner, 1992).

Na classe Chytridiomycetes, um maior número de espécies está contido no gênero *Coelomomyces* (Blastocladales), existindo aproximadamente 70 espécies desse fungo aquático como patógeno de alguns grupos de insetos (Lucarotti et al., 1985).

Poucas associações entre Basidiomycetes e insetos são conhecidas, e estas são tidas como associações mutualísticas. As espécies de Trichomycetes não são consideradas patogênicas aos insetos, entretanto Sweeney (1981) descreveu uma nova espécie, *Smittium morbosum*, como patógeno de larva de mosquito.

É muito provável que a maioria dos fungos entomopatogênicos, que abrange cerca de 750 espécies reunidas em 85 gêneros, ocorre no Brasil. Mais de 20 gêneros já foram constatados atacando insetos de importância agrícola (Alves, 1990).

No Brasil, os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem relatados. Pestana em 1923 fez referência ao *Metarhizium anisopliae*, o qual chamou de *Penicillium anisopliae*, para o controle de *Tomaspis* sp. (Hemiptera: Cercopidae). Em 1934 foi relatada a ocorrência de fungos entomopatogênicos em pragas de citros e em 1939 foi observado ataque de *Aschersonia aleyrodis* (Coelomycetes - Phialidales) sobre *Aleurothrixus floccosus* (Hemiptera: Aleyrodidae) (Robbs, 1962; Alves, 1986 citados por

Alves, 1990).

Fungos patogênicos de insetos economicamente importantes na agricultura, estão sendo estudados e usados no controle destas pragas com sucesso, como demonstram os trabalhos desenvolvidos pelo Departamento de Entomologia da ESALQ com o fungo *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) uma praga da cana-de-açúcar e do cupim *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae) (Alves, 1990).

Beauveria bassiana e *Metarhizium anisopliae* têm sido os fungos mais citados em trabalhos envolvendo cupins como insetos hospedeiros.

2.2.2 Isolamento

Para a realização de estudos que necessitem o uso de microrganismos específicos, como identificação e utilização para ensaios, é necessário que eles estejam em culturas puras, ou seja, que tenham se originado de um único indivíduo (Pelczar et al., 1996).

No caso de fungos entomopatogênicos, existem diversas técnicas de isolamento e purificação da colônia fúngica, por exemplo a transferência de partes do micélio ou de esporos, encontrados em cadáveres de insetos, para placas de Petri com meio de cultura não seletivo como Batata Dextrose Ágar - BDA; ou a transferência direta do cadáver para o meio de cultura (Gams et al., 1987).

Onions et al. (1981) citaram a transferência de pequenos fragmentos ou partículas do material de onde se deseja isolar o fungo, para meios de cultura sólidos ou líquidos e manutenção em temperatura semelhante à original. Assim que se iniciar o desenvolvimento do fungo a partir do material depositado no meio de cultura, é necessária a transferência de pequenos fragmentos, desta colônia que se inicia, para uma nova placa de Petri com meio de cultivo estéril. Com a obtenção da subcolônia, esta deve permanecer em

condições de temperatura e umidade adequadas para seu desenvolvimento e maturação visando a identificação e utilização futuras.

Para o isolamento do fungo *Metarhizium anisopliae*, Zoberi (1995) utilizou a técnica de “slide culture”, que consiste em colocar o cadáver do inseto em uma lâmina de vidro e manter em temperatura de 22-24°C até que fosse observado o desenvolvimento do micélio a partir do corpo do inseto. Este micélio é então cuidadosamente transferido para placas de Petri estéreis com diferentes meios de cultivos, tendo sido obtido o melhor crescimento e esporulação em meio malte-água.

Entretanto, Roddam & Rath (1997) isolaram os fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, suspendendo amostras do solo em uma solução e adicionando em placas de Petri com meio ágar seletivo. Após 4 semanas de incubação à 15°C as colônias que se desenvolveram nas placas foram identificadas.

Milner et al. (1998) isolaram *Metarhizium anisopliae* de ninhos de cupins, triturando pedaços do ninho e suspendendo em solução adicionada em placas de Petri com meio de cultura de “Veen”, que consiste no meio ágar-água com antibióticos para evitar o desenvolvimento de bactérias.

Em todos os casos foram obtidas culturas puras dos fungos, mostrando a viabilidade da utilização de diversos métodos de isolamento para esta finalidade.

2.2.3 Manutenção

Por meio do uso de diferentes técnicas de preservação, coleções de microrganismos podem ser mantidas para utilização futura (Smith & Waller citados por Piccini & Pascholati, 1996).

O método mais utilizado para a manutenção de culturas fúngicas consiste em usar tubos de ensaio com meio de cultura baseado em ágar colocados em refrigerador à temperatura de 2-4°C. Neste método as

culturas devem ser repicadas periodicamente, aproximadamente a cada 4 meses, devido ao ressecamento, que pode ocorrer com o tempo, no meio de cultura (Gams et al., 1987).

Outros métodos de manutenção podem ser utilizados, permitindo a preservação da cultura e sua viabilidade por longos períodos de tempo. Alguns métodos mais sofisticados permitem manter as culturas por anos, como é o caso da liofilização que consiste na desidratação e posterior manutenção do organismo em refrigerador, apresentando como vantagens a armazenagem por longos períodos, oferecendo baixos índices de contaminação e emprego em larga escala; entretanto nem todo laboratório possui infraestrutura para a condução deste método e alguns organismos são incapazes de sobreviver a esta técnica (Pelczar et al., 1996).

Outro método, mais viável em laboratórios que não possuem infraestrutura tão sofisticada e que também permite a manutenção de fungos por períodos de anos, é o método de Castellani, no qual pequenos discos de fungos retirados de um meio nutritivo são adicionados em frascos de vidro contendo água estéril. Este método representa um baixo custo, ocupa pouco espaço, apresenta pequeno risco de contaminação e a execução é fácil. Uma desvantagem é que nem todos os microrganismos se adaptam a este método (Piccini & Pascholati, 1996).

Outros métodos como a manutenção de fungos em sílica-gel, solo e óleo mineral também podem ser utilizados, cada um apresentando vantagens e desvantagens que devem ser levadas em conta na escolha, sendo que o cuidado maior a ser tomado é o da adaptação do organismo ao método de manutenção, permitindo a conservação da viabilidade e, no caso dos fungos entomopatogênicos, a conservação da patogenicidade (Pelczar et al., 1996).

2.2.4 Identificação

Para a identificação de um fungo, algumas características

macroscópicas devem ser observadas como, por exemplo, o modo de desenvolvimento em um meio de cultura padrão. Alguns dados podem ser observados a olho nu, como a taxa de crescimento, a cor da colônia, a alteração da cor do meio de cultivo, a textura da colônia e odor e exsudação de líquidos. Outros aspectos só podem ser observados sob microscópio, como características da hifa (cor, presença de septos ou estruturas especiais), estágio de maturação das estruturas de reprodução, disposição e características dos órgãos de reprodução (cor, tamanho, morfologia, etc), detalhes dos esporos como cor, morfologia, septação, tamanho, etc. Com estas informações, consegue-se a identificação de fungos até o nível de gênero; a identificação precisa da espécie pode ser conseguida baseando-se em boas monografias do gênero ou então utilizando-se de técnicas bioquímicas e moleculares (Onions et al., 1981).

2.2.5 Desenvolvimento dos fungos no hospedeiro

O integumento dos insetos é uma estrutura composta de uma camada contínua de células epidérmicas cobertas pela cutícula, a qual se constitui na primeira barreira contra infecção. A camada mais externa dessa estrutura é a epicutícula, que consiste de várias camadas secretadas direta ou indiretamente pelas células epidérmicas. Uma delas consiste de cera que possui papel fundamental na prevenção da infecção, como demonstram os trabalhos de Sussman (1952) e Koldsumi (1957) citados por Sannasi (1969).

Abaixo da epicutícula se encontra a procutícula que é uma camada composta pela exocutícula e endocutícula formadas por quantidades diferentes de quitina associada com proteínas e outros compostos complexos (Gallo et al., 1988).

A partir de uma investigação sobre o modo de ação do fungo *Aspergillus flavus*, em rainhas de *Odontotermes obesus* (Isoptera: Termitidae: Macrotermitinae), Sannasi (1969) observou que no ponto de entrada da hifa a

epicutícula havia sido afetada, mas aparentemente a exocutícula permanecia inalterada e a endocutícula apresentava rompimentos causados por pressão da hifa para dentro do corpo. Com a continuidade do crescimento, a hifa perfura essas camadas penetrando na cavidade do corpo.

Em *Nasutitermes exitiosus* a penetração do fungo é observada em qualquer região do exoesqueleto devido a pequena espessura da cutícula. A penetração inicial na epicutícula ocorre por ação de quitinases e por pressão da hifa, podendo ou não haver formação de apressório. Entretanto, na procutícula a penetração ocorre por separação mecânica das lâminas que a formam. Este estágio de penetração pode durar de 18 a 66 horas e pode ser detectado pela presença de hifas na hemolinfa. Hänel (1982) descreveu o desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae* em *N. exitiosus* da seguinte maneira: As hifas se desenvolvem e dão origem a um denso crescimento micelial na camada lipídica e muscular com exceção da musculatura do aparelho digestivo; nesta fase os diferentes tecidos ainda podem ser distinguidos. O crescimento micelial se torna generalizado na cavidade do corpo e em algumas áreas as hifas alcançam o exterior ocorrendo esporulação. O tecido nervoso e as pernas são invadidos. O fungo se espalha sobre a superfície do inseto e o aparelho digestivo é invadido. Externamente o animal é coberto por uma densa camada de conídios.

Roberts & Humber (1981) descreveram, de modo semelhante, o desenvolvimento dos fungos entomopatogênicos no organismo dos insetos que abrange seguintes fases: fixação do conídio na cutícula, germinação, penetração, crescimento na hemocèle, produção de toxinas, morte do hospedeiro, invasão de todos os órgãos do hospedeiro, crescimento externo do fungo, produção de esporos e sua dispersão.

Hänel (1982) observou que os relatos sobre o ciclo de vida do fungo *Metarhizium anisopliae* em diferentes espécies de insetos não apresentavam um padrão uniforme e descreveu o modo de ação desse fungo no cupim *Nasutitermes exitiosus* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae). Ele

observou que o tegumento e a camada lipídica da cutícula do inseto não impediram a penetração do fungo e que o cupim não foi afetado pela ingestão dos conídios. A estratégia de penetração do fungo no cupim foi a seguinte: máxima dispersão das hifas no interior do inseto enquanto este ainda está vivo, produção de toxinas no trato digestivo com a conseqüente morte do inseto, utilização dos tecidos do hospedeiro para a produção de conídios e no caso de haver infecção por outros organismos ocorre a formação de estruturas em estado latente.

Roberts (1990) mostrou que algumas proteases e lipases, produzidas como metabólitos, são indispensáveis no processo de invasão da cutícula do inseto. Esses fungos são capazes de hidrolisar moléculas da cutícula e produzem proteases que são fundamentais para a penetração do fungo na epicutícula protéica. Quitinases também estão envolvidas, embora tenham importância secundária no mecanismo de penetração.

Yendol & Paschke (1965), citados por Fernandes & Alves (1992), estudando o processo de infecção de *Entomophthora coronata* em *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae: Heterotermitinae), sugerem que a mortalidade de cupins durante os primeiros estágios de penetração do fungo, ocorra possivelmente devido à produção de micotoxinas.

Bao & Yendol (1971), citados por Fernandes & Alves (1992), estudando o processo de infecção de *Reticulitermes flavipes* por *Beauveria bassiana*, observaram que os cupins morreram 24 a 36 horas após a inoculação do fungo e afirmaram que a ausência de crescimento micelial antes da morte dos cupins, leva a crer que a morte tenha sido causada pela ação de micotoxinas.

Kramm & West (1982) obtiveram 100% de mortalidade de *Reticulitermes*, inoculados com dois isolados de *Metarhizium anisopliae* e observaram por meio de estudos histológicos que o fungo não penetrou na cutícula antes da morte do inseto e lançaram a hipótese de que os cupins não foram mortos por ação direta do fungo invadindo seu corpo, mas por outras

causas como metabólitos tóxicos, ou uma possível abrasão da cutícula levando o inseto à desidratação.

Fernandes & Alves (1992), em um trabalho de seleção de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de *Cornitermes cumulans*, observaram sintomas típicos de intoxicação como tremores e paralisia, sugerindo que a morte está associada a alguma enzima ou toxina produzida durante a penetração do fungo. Sugeriram que quanto mais conídios penetrarem, mais toxina ou enzima será liberada e mais rapidamente ocorre a morte do inseto. Entretanto advertem que são necessários estudos mais detalhados para elucidar definitivamente as causas deste fenômeno.

Roberts (1990) sugeriu que o desenvolvimento do fungo na hemocele envolve várias enzimas hidrolíticas que podem levar à formação de pequenos compostos de efeitos deletérios no hospedeiro e que em alguns casos esses compostos atuam de modo a desarranjar o sistema imunológico do hospedeiro facilitando o estabelecimento da doença.

2.2.6 Patogenicidade a animais vertebrados

Em princípio, microrganismos entomopatogênicos apresentam especificidade aos insetos hospedeiros e não deveriam causar doenças em vertebrados. Quanto ao fungo *M. anisopliae* ainda não foram reportadas evidências de infecção em vertebrados, entretanto doenças como alergias, intoxicação e infecções em animais causadas pelos fungos *B. bassiana*, *Entomophthora coronata* e *Aspergillus* sp. foram relatadas por vários autores citados em El-Kadi et al. (1983). Estes autores, investigando os efeitos do fungo *M. anisopliae* em mamíferos, não encontraram evidências do desenvolvimento do fungo nos órgãos dos animais testados, entretanto observaram que os esporos injetados via subcutânea sobreviveram nos tecidos animais durante o período do ensaio causando lesões tissulares. Estes resultados não são conclusivos, apenas indicam que os estudos devem prosseguir para viabilizar

uma produção industrial e uso em larga escala a qual deve estar associada ao grau de risco à saúde animal.

2.3 Cupins

2.3.1 Classificação taxonômica

Os cupins, também conhecidos como térmitas, são insetos que formam a ordem Isoptera. Grassé (1986) adota a classificação proposta por Sands que subdivide a ordem em sete famílias, Mastotermitidae, Termopsidae, Hodotermitidae, Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae e Termitidae, as quatro últimas ocorrendo no Brasil.

2.3.2 Biologia dos cupins

A celulose, alimento universalmente utilizado pelos cupins, é digerida principalmente por microrganismos simbiontes (flagelados ou bactérias) que vivem no aparelho digestivo desses insetos. Os térmitas são insetos paurometábolos, eussociais e predominantemente tropicais. Sua sociedade é formada por diferentes categorias de indivíduos ou castas. Uma colônia típica possui: a casta reprodutora (alada) e duas castas neutras (ápteras), a dos soldados e a dos operários (Oliveira, et al. 1986).

Uma colônia se inicia, geralmente por ocasião da revoada quando os reprodutores alados (machos e fêmeas), também chamados primários, que saem da colônia mãe, se encontram, procuram um local para estabelecer a colônia e posteriormente, quando já instalados no novo local, copulam. A partir da fundação da colônia o casal é chamado de casal real, portanto rei e rainha. A fêmea é fecundada periodicamente efetuando postura dos ovos ao longo de toda sua vida. No início da colônia, os jovens cupins se transformam apenas em operários e soldados. Depois de algum tempo, com o desenvolvimento da colônia, parte dos jovens se diferencia na linhagem

reprodutiva, que originará os reprodutores alados. Esses jovens da linha reprodutiva são chamados de ninfas. Os operários são encarregados de todos os trabalhos da colônia, tais como: construção do ninho, alargamento da câmara nupcial, coleta de alimento e alimentação da prole, enquanto os soldados se encarregam de defender a colônia de possíveis inimigos. (Grassé, 1986; Alves & Almeida, 1995).

O alargamento da câmara nupcial se faz necessário devido ao crescimento do abdome da rainha que pode, em várias espécies, chegar a 2000 vezes o volume do resto do corpo. Este fenômeno, conhecido como fisogastria, deve-se ao aumento dos ovários, decorrente do aumento do número de ovários e à pressão exercida pela massa de ovos (Alves & Berti-Filho, 1995). Em muitas espécies de cupins, uma nova colônia pode se desenvolver com reprodutores de substituição; indivíduos imaturos, geralmente ninfas, que adquirem a capacidade de se reproduzir, portanto precocemente, e por essa razão também chamados de reprodutores neotênicos. Esses reprodutores surgem geralmente, quando da morte de um ou ambos os reprodutores primários, ou por se distanciarem muito da colônia mãe e com isso saírem do controle inibidor exercido pelo casal real, por meio de feromônios (Grassé, 1984).

Na natureza, os térmitas são insetos extremamente benéficos pois participam no processo de degradação e reciclagem de compostos celulósicos, contribuindo para o enriquecimento do solo (Edwards & Mill, 1986). Esse enriquecimento se dá pela devolução ao solo dos componentes resultantes da decomposição de polissacarídeos vegetais, utilizados como principal fonte de nutrição desses insetos, pelo revolvimento de camadas de solo, trazendo solo de camadas inferiores para a superfície e pela melhoria da permeabilidade do solo, resultante da deposição de matéria orgânica, dos ninhos e da rede de galerias subterrâneas (Boyer 1971; Lee & Wood, 1971). Entretanto, quando danificam produtos e estruturas de interesse humano, são considerados pragas (Jones & Bordereau, 1994).

2.3.3 Problemática dos cupins em edificações

Os cupins são uma das principais pragas em edificações (Harrys, 1961; Hickin, 1971; Kofoed, 1934).

Além de móveis e madeiramento das edificações, eles podem atacar ainda outros materiais não celulósicos como o revestimento plástico de cabos elétricos subterrâneos e de cabos telefônicos, entre outros (Peters et al., 1996).

Alves e Berti-Filho (1995) justificam a problemática dos cupins devido à expansão da área urbana, com a conseqüente invasão dos espaços nativos ocupados por esses insetos e diminuição dos alimentos disponíveis naturalmente, levando os cupins a exercerem maior pressão de ataque sobre as construções e residências, buscando ocupar o espaço perdido e os alimentos indispensáveis à sua manutenção.

Os cupins que atacam as construções são os cupins de madeira seca, subterrâneos e arbóreos. Os primeiros vivem exclusivamente dentro da madeira da qual se alimentam. As colônias são pouco populosas e as galerias são apenas escavadas na madeira, não tendo ligação com o solo. Os cupins subterrâneos constroem os ninhos geralmente no solo, mas também em peças de madeira em contato com o solo ou nos locais úmidos das construções. Os cupins arbóreos, como o próprio nome diz, constroem seus ninhos acima do solo, em algum suporte, geralmente árvores, quando na natureza, mas também em forros e telhados de edificações, nos meios urbano e rural (Lelis, 1997).

Na cidade de São Paulo, as duas espécies mais freqüentes são o cupim subterrâneo *Coptotermes havilandi* (Isoptera: Rhinotermitidae: Coptotermitinae), uma espécie introduzida, e o cupim de madeira seca *Cryptotermes brevis* (Isoptera: Kalotermitidae), espécie cosmopolita. O cupim subterrâneo *C. havilandi*, é particularmente prejudicial pela intensidade dos danos que causa. Além dos diferentes tipos de madeira disponíveis nas

edificações também pode danificar materiais não celulósicos como couro, tecidos e plásticos de cabos de instalações elétricas. Podem também atacar e comprometer a sanidade de árvores ornamentais urbanas (Lelis, 1994; 1999). O cupim subterrâneo se caracteriza por seu grande poder de dispersão tanto horizontal como vertical, podendo se propagar pelo solo, madeira, tubulações, fissuras nas paredes e por túneis constrói, podendo infestar vários pavimentos de um edifício (Lelis, 1999). Já o cupim de madeira seca, *Cryptotermes brevis*, se dispersa de uma peça infestada para outra, com a qual esteja em contato, ou por revoada dos reprodutores alados. Apesar das colônias serem menores, as peças atacadas por esses térmitas podem abrigar várias colônias, de modo que o prejuízo se torna gradualmente mais grave. A infestação por térmitas muitas vezes apenas se torna visível quando os estragos já são consideráveis (Fontes, 1995; Lelis, 1997).

De 1973 a 1993 foram inspecionados 240 edifícios na cidade de São Paulo pelo corpo técnico do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT. A espécie *C. havilandi* estava presente em 47% dos edifícios e *C. brevis* em 15%. Ambas estavam simultaneamente presentes em 38% dos edifícios inspecionados. Deste total, 120 foram submetidos a tratamento curativo. O custo para o tratamento curativo das 240 edificações foi estimado em US\$ 3.350.000,00, entretanto o dano real causado pelos térmitas em São Paulo é ainda desconhecido. Um outro gênero de cupim, *Heterotermes* sp. (Rhinotermitidae - Heterotermitinae) foi registrado em 1993, atacando edifícios na cidade de São Paulo. Diversas condições favorecem o ataque de cupins em edificações na cidade, e estão relacionadas à falta de medidas preventivas e ao mau uso da madeira na construção (Lelis, 1994).

Edwards & Mill (1986) estimaram em 1,92 bilhões de dólares o valor gasto em tratamentos preventivos e curativos, principalmente nos Estados Unidos, Índia e China. Entretanto, somente no Japão, as perdas causadas por ataques, principalmente dos cupins *Coptotermes formosanus* e *Reticulitermes speratus*, foram estimadas em mais de 1 bilhão de dólares por ano (Yoshimura

& Tsunoda, 1994).

Os cupins de ninho arbóreo, como é o caso de várias espécies de *Nasutitermes* (Termitidae, Nasutitermitinae), também se caracterizam pela grande capacidade de dispersão. Em edificações, tal como os cupins subterrâneos, essa dispersão é feita por meio de túneis construídos pelos insetos, que fazem a ligação entre a colônia e a fonte de alimento. Os ninhos arbóreos estão localizados sobre algum suporte, geralmente árvores, mas também sobre postes, mourões de cerca e não menos freqüentes nos forros/telhados das edificações. Os cupins arbóreos são menos freqüentes nos grandes centros urbanos da região sudeste, mas bastante freqüentes nas regiões norte e nordeste onde causam grandes danos ao madeiramento das edificações (Lelis¹). Na região sudeste eles ocorrem geralmente em pequenas aglomerações urbanas, ou construções rurais, como é o caso verificado no distrito de Ártemis, próximo à cidade de Piracicaba, onde foram coletados os insetos para esse estudo. A presença desses cupins nesses casos carece de estudos mais profundos mas, entre outros fatores deve-se, com certeza, ao menor adensamento urbano, portanto menor interferência no seu habitat natural, e/ou a presença de matas nativas próximas a essas localidades (Lelis¹).

2.4 Testes de Patogenicidade

Em 1992 Fernandes e Alves publicaram um trabalho sobre a seleção de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, para o controle de *Cornitermes cumulans*, importante praga das pastagens no Brasil. Este trabalho foi realizado em campo com a aplicação de esporos desses dois fungos em cupinzeiros. Após dez dias, observaram 100% de mortalidade e altos níveis de conidiogênese sobre os cadáveres dentro dos cupinzeiros, apresentando grande potencial para utilização como inseticida microbiano no

¹ Lelis, A.T. Comunicação pessoal, 1999.

controle desta praga.

Alves e Almeida (1995) testaram um tipo de isca, denominada Termitrap®, como uma nova alternativa para o controle de *Cornitermes cumulans* em pastos e *Heterotermes tenuis* em plantações de cana-de-açúcar. Os fungos utilizados nas iscas foram *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* obtendo sucesso na redução de populações de cupins em ensaios de campo.

Malagodi e Veiga (1995) avaliaram a patogenicidade de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, em três diferentes concentrações (esporos/ml), sobre cupins do gênero *Nasutitermes*, uma importante praga da cana-de-açúcar em Pernambuco. Os resultados indicaram que a concentração $1,0 \times 10^8$ conídios/ml foi considerada a mais eficiente, face a mortalidade observada e a quantidade do produto biológico utilizado.

Hänel (1983) comprovou a eficiência de *M. anisopliae* em infectar colônias de *Nasutitermes exitiosus* em laboratório. Mostrou também a facilidade da propagação do fungo em campo, em colônias de 1 a 2 milhões de cupins, deixando quase metade das colônias moribundas, tendo sugerido o seu uso para tratamento em edificações, onde o acesso ao ninho pode ser dificultado.

Zoberi & Grace (1990b) isolaram o fungo *Beauveria bassiana* de *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae: Heterotermitinae) e realizaram 4 ensaios envolvendo estes organismos. No primeiro ensaio, operários expostos ao fungo isolado morreram em 3 dias. No segundo ensaio, cupins saudáveis ficaram 24 horas em contato com o fungo. Em seguida, eles foram transferidos para placas de Petri estéreis com meio ágar onde o fungo se desenvolveu e causou a morte de outros cupins saudáveis, em doze dias. Outro ensaio consistiu em colocar partes do micélio do fungo em túneis de areia construídos por cupins saudáveis mantidos em pequenas colônias de laboratório, obtendo como resultado, a morte dos cupins em 15 dias. Entretanto, ao se colocar cupins mortos nos túneis, não houve mortalidade significativa,

mostrando que cupins saudáveis evitam o contato com cupins mortos infectados com o fungo.

Khan et al. (1992) testaram 8 espécies de fungo, tidos como entomopatogênicos, contra o cupim *Odontotermes wallonensis* (Termitidae - Macrotermitinae). Cinco deles, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *M. flavoviridae* var. *minus*, *Paecilomyces lilacinus* (Hyphomycetes) e *P. fumosoreus*, foram patogênicos, sendo *Beauveria bassiana* o mais eficaz. Os outros 3 *Verticillium lecanii* (Hyphomycetes), *Paecilomyces farinosus* e *Nomuraea rileyi* (Hyphomycetes) não foram patogênicos a essa espécie de cupim testada.

Wells et al. (1995) testaram a patogenicidade de 4 espécies de fungos contra *Coptotermes formosanus* (Rhinotermitidae – Coptotermitinae). Cinco isolados de *Beauveria bassiana* e 3 de *Metarhizium anisopliae* se mostraram patogênicos ao cupim. *Metarhizium flavoviridae* apresentou baixa patogenicidade e todos os cupins que ficaram em contato com o micélio de *Conidiobolus coronatus*, morreram em dois dias.

O fungo *Metarhizium anisopliae* isolado de *Reticulitermes flavipes* foi utilizado por Zoberi (1995) para avaliar a transmissibilidade desse fungo entre cupins. Ele observou que cupins vivos e contaminados são capazes de disseminar a doença entre cupins saudáveis causando 100% de mortalidade em 48 horas.

Chai (1995) testou 12 espécies de fungos entomopatogênicos contra *Coptotermes formosanus* e obteve sucesso apenas com 4 espécies que apresentaram alta virulência, foram elas: *Metarhizium anisopliae*, *Aspergillus fumigatus* (Hyphomycetes), *Paecilomyces fumosoroseus* e *Paecilomyces cicadae*.

Delate et al. (1995) usaram *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para avaliar o potencial desses fungos para utilização como iscas no controle de *Coptotermes formosanus*. Eles sugeriram que culturas vivas desses dois fungos se mostraram promissoras para o desenvolvimento de iscas.

Jones et al. (1996) também avaliaram a patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* ao cupim *Coptotermes formosanus*. Foram testadas 3 cepas de *M. anisopliae* e 4 de *B. bassiana*. A cepa 787 de *B. bassiana* se mostrou a mais eficaz, possuindo o maior potencial como agente de controle contra *C. formosanus*, apresentando valor de LT (tempo letal) moderadamente baixo e um valor baixo de LC (concentração letal), assim como boa transmissibilidade e desempenho em ninhos dessa espécie de térmita.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Micologia e Entomologia da Divisão de Produtos Florestais do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. - IPT.

3.1 Organismos

3.1.1 Fungos

Os fungos utilizados para avaliação da patogenicidade aos cupins foram os isolados obtidos de ninhos em decadência e de cupins mortos das espécies *Coptotermes havilandi* e *Nasutitermes globiceps*.

O fungo utilizado como padrão nos ensaios de patogenicidade foi *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin - isolado E9, proveniente de *Mahanarva posticata* Stal. (Hemiptera - Cercopidae) do Espírito Santo, fornecido pelo Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ-USP.

Este fungo foi escolhido por ser um agente entomopatogênico já conhecido e bastante testado, que causa a morte de cupins em poucos dias, em testes realizados, em laboratório, por vários autores (Alves & Almeida, 1995; Chai, 1995; Delate et al., 1995; Fernandes & Alves, 1992; Hanel, 1983; Jones et al., 1996; Khan et al., 1992; Malagodi & Veiga, 1995; Wells et al., 1995; Zoberi, 1995).

3.1.2 Cupins

A espécie de cupim escolhida para este estudo foi *Nasutitermes globiceps* Snyder 1949 (Termitidae - Nasutitermitinae) identificada pelo Prof. Dr. Reginaldo Constantino da Universidade de Brasília. Este cupim, de ninho arbóreo, pertence à maior subfamília da ordem Isoptera, Nasutitermitinae, com 28 gêneros e 219 espécies ocorrendo na região Neotropical (Fontes, 1981).

Os ninhos utilizados nos testes foram coletados nas imediações do Município de Ártemis, SP, onde se encontram facilmente sobre árvores, mourões e muros das casas. Eles foram retirados de uma árvore de flamboyant (*Delonix regia*) e de uma árvore de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) e levados ao Laboratório de Entomologia do IPT onde foram mantidos em sala climatizada a temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $75\% \pm 5\%$.

3.2 Isolamento e Manutenção dos microrganismos

Os fungos foram isolados de cupins doentes ou mortos, e de ninhos de cupins das espécies *Coptotermes havilandi* e *Nasutitermes globiceps*.

Os corpos dos cupins mortos e pedaços dos ninhos foram colocados em placas de Petri, sobre meio de cultura nutritivo Batata Dextrose Ágar - BDA e mantidos em estufa de cultura a 28°C . O micélio do fungo que se desenvolveu a partir do material foi transferido para o centro de placas de Petri com o mesmo meio de cultivo após 2 a 3 dias do início do desenvolvimento do organismo, e mantidos nas mesmas condições.

Apresentando crescimento homogêneo, os microrganismos foram transferidos para tubos de ensaio com o meio de cultura e mantidos em refrigerador a 5°C .

3.3 Identificação dos microrganismos

A identificação dos fungos foi realizada no Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, Seção de Micologia. Esta identificação foi feita com base na morfologia dos fungos utilizando-se chaves de identificação descritas por Barnett & Hunter (1987) e Barron (1972).

Para a identificação utilizou-se a técnica de microcultivo descrita por Brazolin (1997) na qual um pequeno bloco de meio de cultura BDA foi colocado sobre uma lâmina de vidro esterilizada, inoculado com esporos do fungo e coberto com uma lamínula de vidro. Este conjunto foi transferido para uma placa de Petri contendo papel-filtro umedecido com água esterilizada e incubado a 28°C e 70% de umidade relativa por cerca de 14 dias. Após este período, retirou-se o meio de cultura da lâmina e foram montadas, com lâmina de vidro e com a lamínula, 2 lâminas para análises microscópicas.

Essas lâminas foram observadas a fresco e/ou coradas com azul de algodão. As lâminas coradas foram lutadas com esmalte de unha para a conservação do material.

3.4 Testes de Patogenicidade

3.4.1 Seleção de substratos para a manutenção dos cupins

A seleção do substrato para os cupins foi baseada em uma adaptação do método descrito por Almeida (1994) para o controle do cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis*. Como recipiente foram utilizadas placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Os substratos testados foram serragem, papelão e celulose. Como fonte de umidade, colocou-se nas placas um chumaço de algodão umedecido.

A serragem de *Eucalyptus grandis* foi fornecida pela Seção de Processamento Mecânico e Químico de Madeiras do Agrupamento Indústrias de Base Florestal - IPT.

O papelão tipo couro, fabricado pela Heidrich Industrial Mercantil e Agrícola S/A., e a celulose de eucalipto, da indústria Celulose Nipo-Brasileira S/A. - CENIBRA, foram cedidos pelo Laboratório de Papel e Revestimento do Agrupamento de Papel e Celulose - IPT.

Outro substrato testado foi baseado no método empregado por Zoberi (1995) no qual cupins da espécie *Reticulitermes flavipes* são mantidos em placas de Petri com meio de cultura ágar e papel-filtro como alimento.

Foram realizadas 10 repetições para cada substrato e 100 cupins por placa na proporção de 75% de grandes operários, 15% de pequenos operários e 10% de soldados, baseado na proporção de castas em outros *Nasutitermes* (Haverty, 1977; Lefeuvre, 1991). As placas de Petri foram mantidas em câmara climatizada à temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $90\% \pm 5\%$ de umidade relativa por 20 dias.

O substrato que apresentou melhor desempenho foi utilizado para os testes de patogenicidade dos fungos isolados.

3.4.2 Confirmação da Patogenicidade

Após a escolha do melhor substrato os fungos foram testados para a avaliação da patogenicidade. Foram realizadas 10 repetições para cada fungo e 100 cupins por placa.

Para que houvesse uma aclimação dos cupins eles foram mantidos por 1 dia nas placas de Petri com o substrato antes da inoculação.

A inoculação foi realizada por pulverização de 1 ml de uma suspensão padronizada de 10^7 conídios/ml sobre o meio de cultura.

A avaliação do número de indivíduos mortos foi feita diariamente.

3.4.3 Teste de repelência

Para o teste de repelência foi feita uma adaptação do método de transmissibilidade de Zoberi (1995), descrita a seguir.

Cada unidade de teste consistiu em duas pequenas caixas plásticas, com tampa, (55 mm de diâmetro e 20 mm de altura), contendo ambas uma camada de meio de cultura ágar-água, de 5 mm de altura, e sobre o meio um pedaço de madeira de eucalipto, como alimento. Essas caixas foram previamente perfuradas na lateral e ligadas por um tubo de borracha transparente, de 150 mm de comprimento por 2 mm de diâmetro interno. (Figura 1)

Em uma das caixas foram colocados 50 cupins saudáveis e na outra 10 cupins contaminados pelos fungos, inoculados por aspersão de uma suspensão de esporos (10^7 conídios/ml).

Figura 1 Unidade do teste de repelência.

Para distinguir os cupins saudáveis dos contaminados, e assim acompanhar o trânsito dos insetos de um recipiente para outro, os cupins contaminados foram previamente corados com Vermelho Neutro, fornecido no alimento.

Como controle foram utilizados 50 cupins saudáveis em um recipiente e 10 cupins saudáveis corados com Vermelho Neutro no outro recipiente.

Foram realizadas 10 repetições para cada situação. A mortalidade e o comportamento foram avaliados diariamente.

3.4.4 Análise estatística

Os resultados de mortalidade dos cupins, expressos em porcentagem, foram analisados estatisticamente utilizando-se o aplicativo STATISTICA (Statsoft, Inc., 1995).

A análise estatística foi realizada adotando-se o nível de significância (α) de 5%. Optou-se pela análise de variância não-paramétrica, devido à não homogeneidade de variância entre os valores.

O teste de Mann-Witney - "Mann-Witney U Test" - foi utilizado para a comparação das médias em cada teste.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento, manutenção e identificação dos microrganismos

O plaqueamento de partes dos ninhos de cupins e de corpos de cupins mortos, em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) propiciou o isolamento de várias espécies de fungos (tabela 1).

4.1.1 Fungos

Dos fragmentos de ninho e dos cupins mortos foram isolados 21 fungos. Desses fungos isolados 12 foram utilizados nos testes de patogenicidade, pois apresentaram esporulação suficiente para manter a concentração de 10^7 esporos/ml na preparação de soluções de inoculação.

Quanto aos outros fungos isolados, alguns perderam a viabilidade durante a fase de isolamento e manutenção, possivelmente devido ao meio de cultura não oferecer certos nutrientes, que seriam essenciais ao seu desenvolvimento. Em outros casos não foi possível a obtenção de uma cultura pura.

Foram registradas as espécies de fungos pertencentes aos gêneros isolados neste trabalho e os respectivos cupins em que foram testados ou estavam associados (tabela 2). Na bibliografia consultada não foi encontrado nenhum trabalho relacionado a este tema com o cupim *Nasutitermes globiceps*.

Todos os fungos isolados e identificados pertencem ao grupo dos fungos mitospóricos (Subdivisão Deuteromycotina) e são organismos comumente encontrados em ninhos de cupins e no solo (Amburgey, 1979;

Barnett & Hunter, 1972; Griffin, 1972; Sands, 1969; Zoberi, 1979; Zobery & Grace, 1990a).

Todos os gêneros de fungos isolados foram citados na literatura associados aos cupins ou outros insetos, entretanto não são patógenos obrigatórios. Várias espécies são decompositoras de material vegetal podendo apresentar uma associação benéfica com os cupins no sentido de digerir a celulose.

Os gêneros *Paecilomyces* e *Aspergillus* foram os mais freqüentes, seguidos por *Fusarium*, *Trichoderma* e *Gliocladium* e foram encontrados tanto em *Nasutitermes globiceps* quanto em *Coptotermes* sp.

Os fungos *Fusarium* e *Gliocladium* foram isolados apenas em *N. globiceps* e o gênero *Trichoderma* foi encontrado apenas em *Coptotermes* sp.

O gênero *Paecilomyces* é facilmente encontrado na natureza e está associado a um grande número de hospedeiros, principalmente em larvas de Lepidoptera (Tanada & Kaya, 1993).

P. fumosoroseus e *P. marquandii* são parasitas de insetos nos quais formam uma estrutura denominada sinemata. Também podem ocorrer no solo. *P. carneus* e *P. lilacinus* ocorrem em uma grande variedade de substratos, principalmente no solo (Onions et al., 1981).

O gênero *Fusarium* é mais conhecido como patógeno de plantas (Onions et al. 1981). Entretanto, alguns podem ser patógenos de insetos como *F. solani* e *F. lateritium* (Tanada & Kaya, 1993).

Alguns fungos que ocorrem no solo podem ser encontrados em ninhos de cupins já que estes, ao forragearem, podem carregar conídios de vários fungos comuns no solo (Zoberi & Grace, 1990a). O gênero *Gliocladium* é um exemplo típico de fungo que ocorre no solo (Onions et al. 1981) e que já foi encontrado em ninhos de cupins das espécies *Coptotermes amarii*, *Macrotermes natalensis* e *Reticulitermes flavipes* (Amburgey, 1979; Zoberi, 1979; Zoberi & Grace, 1990a).

O gênero *Trichoderma* é um fungo comum em madeira, produtos à base de madeira e no solo. Apresenta enorme capacidade de decompor a celulose (Onions et al. 1981). Hendee (1934) isolou o gênero *Trichoderma* de ninhos de *Kaloterme minor*, *Reticulitermes hesperus* e *Zootermopsis angusticollis* e o classificou como um dos fungos mais freqüentemente encontrados.

Este fungo também foi isolado no ninho de *Kaloterme flavicollis*, *Macrotermes natalensis* e *Reticulitermes flavipes* (Amburgey, 1979; Zoberi, 1979; Zoberi & Grace, 1990a).

O gênero *Aspergillus* é primariamente saprófita mas algumas espécies como *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. tamari*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus*, *A. repens* e *A. versicolor* podem apresentar patogenicidade a uma grande variedade de insetos (Tanada & Kaya 1993). Várias espécies de *Aspergillus* foram isoladas do ninho de *Macrotermes natalensis* (Zoberi, 1979), de *Heterotermes indicola*, *Kaloterme flavicollis* e *Reticulitermes flavipes* (Zoberi & Grace, 1990a).

Tabela 1 Fungos isolados, local do isolamento e cupins aos quais se encontraram associados.

	Espécies de fungos	origem	cupim
isolado 1	†	corpo	<i>Coptotermes havilandi</i>
isolado 2	<i>Trichoderma</i> sp.	frasco de criação	<i>Coptotermes havilandi</i>
isolado 3	†	frasco de criação	<i>Coptotermes havilandi</i>
isolado 4	<i>Paecilomyces</i> sp. 1	ninho decadente	<i>Nasutitermes globiceps</i>
isolado 5	<i>Fusarium</i> sp. 1	ninho decadente	<i>Nasutitermes globiceps</i>
isolado 6	†	ninho decadente	<i>Nasutitermes globiceps</i>
isolado 7	<i>Aspergillus</i> sp. 1	corpo	<i>Coptotermes havilandi</i>
isolado 8	†	frasco de criação	<i>Coptotermes havilandi</i>
isolado 9	<i>Gliocladium</i> sp.	ninho decadente	<i>Nasutitermes globiceps</i>
isolado 10	não identificado	ninho	<i>Coptotermes havilandi</i>
isolado 11	†	corpo	<i>Nasutitermes globiceps</i>
isolado 12	não identificado	corpo	<i>Coptotermes havilandi</i>
isolado 13	<i>Paecilomyces</i> sp. 2.	corpo	<i>Coptotermes havilandi</i>
isolado 14	<i>Paecilomyces</i> sp. 3	corpo	<i>Coptotermes havilandi</i>
isolado 15	não identificado	corpo	<i>Coptotermes havilandi</i>
isolado 16	<i>Paecilomyces</i> sp. 4	corpo	<i>Coptotermes havilandi</i>
isolado 17	<i>Aspergillus</i> sp. 2	corpo	<i>Coptotermes havilandi</i>
isolado 18	<i>Aspergillus</i> sp. 3	corpo	<i>Coptotermes havilandi</i>
isolado 19	<i>Aspergillus</i> sp. 4	corpo	<i>Nasutitermes globiceps</i>
isolado 20	†	frasco de criação	<i>Nasutitermes globiceps</i>
isolado 21	<i>Fusarium</i> sp. 2	frasco de criação	<i>Nasutitermes globiceps</i>

† Fungo que perdeu a viabilidade

Tabela 2 Fungos associados a diferentes espécies cupins e referência pesquisada.

Espécies de fungos	Situação	Espécies de Cupins	Autores
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	teste	<i>Coptotermes formosanus</i>	Chai, 1995
	teste	<i>Odontotermes wallonensis</i>	Khan et al., 1992
<i>Paecilomyces cicadae</i>	teste	<i>Coptotermes formosanus</i>	Chai, 1995
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	teste	<i>Odontotermes wallonensis</i>	Khan et al., 1992
<i>Aspergillus flavus</i>	-	<i>Heterotermes indicola</i>	Lenz, 1969 in Amburgey, 1979
	isolado	<i>Macrotermes natalensis</i>	Zoberi, 1979
<i>Aspergillus fumigatus</i>	teste	<i>Coptotermes formosanus</i>	Chai, 1995
<i>Aspergillus niger</i>	isolado	<i>Macrotermes natalensis</i>	Zoberi, 1979
	isolado	<i>Reticulitermes flavipes</i>	Zoberi & Grace, 1990a
	-	<i>Kaloterms flavicolis</i>	Lenz, 1969 in Amburgey, 1979
<i>Aspergillus ustus</i>	isolado	<i>Macrotermes natalensis</i>	Zoberi, 1979
<i>Aspergillus oryzae</i>	isolado	<i>Macrotermes natalensis</i>	Zoberi, 1979
<i>Aspergillus terreus</i>	isolado	<i>Reticulitermes flavipes</i>	Zoberi & Grace, 1990a
<i>Aspergillus</i> sp.	isolado	<i>Reticulitermes flavipes</i>	Zoberi & Grace, 1990a
<i>Fusarium equiseti</i>	isolado	<i>Macrotermes natalensis</i>	Zoberi, 1979
<i>Fusarium</i> sp.	isolado	<i>Macrotermes natalensis</i>	Zoberi, 1979
<i>Fusarium oxysporum</i>	isolado	<i>Reticulitermes flavipes</i>	Zoberi & Grace, 1990a
<i>Fusarium solani</i>	isolado	<i>Reticulitermes flavipes</i>	Zoberi & Grace, 1990a
<i>Thichoderma</i> sp.	isolado	<i>Macrotermes natalensis</i>	Zoberi, 1979
<i>Trichoderma viridae</i>	-	<i>Kaloterms flavicolis</i>	Schultze-Dewitz, 1971 in Amburgey, 1979
	isolado	<i>Reticulitermes flavipes</i>	Zoberi & Grace, 1990a
<i>Trichoderma coningii</i>	isolado	<i>Reticulitermes flavipes</i>	Zoberi & Grace, 1990a
<i>Trichoderma harzianum</i>	isolado	<i>Reticulitermes flavipes</i>	Zoberi & Grace, 1990a
<i>Gliocladium virens</i>	-	<i>Coptotermes amanii</i>	Lenz, 1969 in Amburgey, 1979
	teste	<i>Reticulitermes</i> sp.	Kramm & West, 1982
<i>Gliocladium roseum</i>	isolado	<i>Macrotermes natalensis</i>	Zoberi, 1979

4.2 Seleção de substratos para a manutenção dos cupins

Foram calculadas as porcentagens das médias de sobrevivência dos cupins em 20 dias nos 4 substratos avaliados (tabela 3).

Dos substratos avaliados, o que apresentou melhor desempenho foi o ágar / papel-filtro que permitiu a sobrevivência de mais de 50% dos cupins em 20 dias. Este substrato foi o mais adequado porque facilitou a observação e manipulação dos cupins durante as avaliações diárias. Ao longo do teste observou-se que os cupins cavaram túneis na camada de ágar e/ou utilizaram fragmentos do papel-filtro e ágar para a construção de câmaras (que impediram a entrada de luz), onde se mantiveram agrupados. Este comportamento também foi observado por Fernandes (1991).

A sobrevivência dos cupins no substrato celulose não apresentou diferença significativa em relação ao substrato ágar/papel-filtro, apesar da porcentagem de sobrevivência ter sido menor neste último. Entretanto não se mostrou adequado porque, assim como no papelão, foi observada a ocorrência de contaminação por diversos microrganismos e a morte dos cupins por tentarem se proteger sob esses substratos.

O substrato serragem apresentou a maior média de sobrevivência, entretanto, não se mostrou prático para a realização dos testes por ter inviabilizado a observação e manipulação diárias dos cupins, que se camuflaram entre os fragmentos da serragem.

Tabela 3 Sobrevivência de *Nasutitermes globiceps* em diferentes substratos.

Substrato	Média de sobrevivência (%) após 20 dias
papelão	19,4 a
celulose	42,4 b
Ágar/papel-filtro	51,7 b
serragem	84,3 c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Mann-Withney U test (5%).

4.3 Testes de patogenicidade

4.3.1 Fungos

4.3.1.1 Teste com duração de uma semana

Foram calculadas as médias de mortalidade (%) de *N. globiceps* inoculado com os diferentes fungos (tabela 4).

O fungo *Metarhizium anisopliae*, utilizado como padrão nos ensaios, apresentou patogenicidade ao cupim da espécie estudada e causou a mortalidade de mais de 95% dos indivíduos, diferindo estatisticamente do controle. A concentração de 10^7 esporos/ml foi adequada e suficiente para causar a morte de mais de 50% dos cupins após 24 horas da contaminação, corroborando vários trabalhos publicados sobre a patogenicidade desse fungo. (Fernandes & Alves, 1992; Chai, 1995; Delate et al., 1995; Fernandes, 1991; Hänel (1981); Hänel, 1982; Hänel & Watson, 1983; Jones et al. 1996; Khan et al., 1992; Kramm & West, 1982; Leong, 1966 citado por Hänel, 1982; Malagodi & Veiga, 1995; Milner et al., 1997; Milner et al. 1998; Wells et al., 1995, Zoberi, 1995).

Os fungos *Aspergillus* sp. 1 e *Aspergillus* sp. 4 apresentaram média de mortalidade acima da média dos outros fungos (43,1% e 24,3% respectivamente) e estatisticamente diferente do controle.

Várias espécies desse fungo já foram avaliadas em testes de patogenicidade e apresentaram resultados positivos.

O gênero *Aspergillus* é primariamente saprófita mas pode atuar como patógeno em uma larga variedade de insetos. Algumas espécies são capazes de produzir diversas toxinas fatais a várias espécies de insetos (Tanada & Kaya, 1993).

Beal & Kais (1962) observaram a patogenicidade de *Aspergillus flavus* em cupins subterrâneos e Chai (1995) testou a espécie *A. fumigatus* contra *Coptotermes formosanus* conseguindo uma alta mortalidade.

Tabela 4 Mortalidade de *Nasutitermes globiceps* após 7 dias de contato com os fungos.

Espécie de fungo	Média de mortalidade (%) de <i>N. globiceps</i> após 7 dias	Desvio Padrão
<i>Trichoderma</i> sp.	13,9	4,38
Controle	14,4	7,01
<i>Paecilomyces</i> sp. 1	14,5	7,93
<i>Fusarium</i> sp. 2	15,4	5,23
<i>Fusarium</i> sp. 1	16	5,68
<i>Paecilomyces</i> sp. 3	16,4	6,70
<i>Aspergillus</i> sp. 3	16,4	6,17
<i>Paecilomyces</i> sp. 2	18,8	3,36
<i>Aspergillus</i> sp. 2	20,7	5,27
<i>Aspergillus</i> sp. 4	24,3*	10,46
<i>Paecilomyces</i> sp. 4	28,6	21,21
<i>Gliocladium</i> sp.	30,6*	18,44
<i>Aspergillus</i> sp. 1	43,1*	24,05
<i>Metarhizium anisopliae</i>	98,3 *	3,74

Médias seguidas por asterisco diferem estatisticamente do controle pelo teste Mann-Withney U test (5%).

O fungo *Gliocladium* também apresentou média de mortalidade maior e estatisticamente diferente do controle. Kramm & West (1982) já haviam confirmado a patogenicidade de *Gliocladium virens* em operários de *Reticulitermes* sp.

O gênero *Paecilomyces* abrange várias espécies de fungos consideradas patógenas a insetos, entretanto as espécies isoladas neste trabalho não se destacaram como tal pois as médias de mortalidade não diferiram estatisticamente do controle.

A espécie isolada como *Paecilomyces* sp. 4 apresentou média de mortalidade de 28,6% e não diferiu estatisticamente do controle.

Chai (1995) avaliou a patogenicidade de *Paecilomyces cicadae* e *P. fumosoroseus* e em ambos conseguiu média de mortalidade acima de 80%.

Khan et al. (1992) corroboraram a patogenicidade de *P. fumosoroseus* e incluíram *P. lilacinus* como patógeno a *Odontotermes wallonensis*. Estes autores também verificaram que a espécie *P. farinosus* não foi patogênica a este cupim.

O gênero *Trichoderma* apresentou média de mortalidade estatisticamente igual ao controle e ligeiramente inferior. Becker (1969) constatou a patogenicidade de *Trichoderma viridae* a cupins afirmando que esta espécie produz alguns compostos tóxicos. Hendee (1934), ao contrário, sugeriu que a espécie *Trichoderma lignorum* atuou de forma benéfica na alimentação de *Zootermopsis angusticolis*. Esse autor afirma que a sobrevivência desses cupins foi maior na madeira onde havia um crescimento superficial desse fungo do que na madeira sadia. Ele observou também que com o desenvolvimento mais abundante desse fungo na madeira os cupins ganharam peso.

Quanto ao *Trichoderma* isolado neste trabalho pode-se especular que pode ter havido uma associação benéfica desse fungo na dieta dos cupins. Já que se trata de um fungo decompositor de celulose, ele poderia estar auxiliando na decomposição da celulose presente no papel-filtro

facilitando a alimentação dos cupins.

Todos os controles de viabilidade obtidos foram positivos portanto os cupins entraram em contato com conídios viáveis passíveis de causarem mortalidade caso fossem patogênicos.

Com relação ao comportamento dos cupins foi observado que no teste de seleção de substratos os cupins mortos geralmente apareciam decapitados, sugerindo canibalismo (Grassé, 1986). Entretanto, nos ensaios de patogenicidade observou-se com mais frequência que os cupins mortos foram enterrados com o corpo intacto corroborando as observações de Zoberi (1995) em *Reticulitermes flavipes* contaminado com o fungo *M. anisopliae*.

Em alguns casos também foram observados os sintomas de tremor e paralisia descritos por vários autores (Fernandes & Alves, 1992; Hänel, 1982; Sanassi, 1969; Zoberi, 1995).

4.3.1.2 Teste com duração de duas semanas

Após a seleção do fungo *Aspergillus* sp. 1, que apresentou melhor resultado dentre os fungos isolados, foi realizado um novo teste de patogenicidade com duração de duas semanas e com dois grupos: A-tirando os cupins mortos diariamente e B-não tirando os cupins mortos (tabela 5).

No ensaio com duração de duas semanas é possível observar que há uma diferença significativa nas médias de mortalidade entre o controle, o fungo *Aspergillus* sp. 1 e o fungo padrão *M. anisopliae*, tanto no grupo com intervenção diária como no grupo no qual não houve intervenção.

Tabela 5 Mortalidade de *Nasutitermes globiceps* após 2 semanas de contato com os fungos.

Grupos	Espécie de fungo	Média de mortalidade (%) de <i>N. globiceps</i> após 2 semanas	Desvio Padrão
A (Tirando os cupins mortos)	<i>Metarhizium. anisopliae</i>	100 *	0
	<i>Aspergillus</i> sp. 1	88,6 *	8,33
	Controle	31	10,46
B (Não tirando os cupins mortos)	<i>Metarhizium. anisopliae</i>	100 *	0
	<i>Aspergillus</i> sp. 1	65,3 *	19,87
	Controle	38	11,66

Médias seguidas por asterisco diferem estatisticamente do controle pelo teste Mann-Whitney U test (5%).

O fungo padrão atingiu 100% de mortalidade já no final da primeira semana após inoculação e o fungo *Aspergillus* sp. 1 chegou a 88,6% de mortalidade, após o fim da segunda semana. Apesar de não apresentar virulência tão elevada como o fungo padrão, é indiscutível o fato do fungo *Aspergillus* sp. 1 ser patogênico ao cupim *N. globiceps*, pois a mortalidade foi superior a do controle.

Os mecanismos de interação entre os organismos em seus ambientes naturais é diferente do ambiente de laboratório. Assim as condições de ensaio não reproduzem as condições de campo, mas podem dar indicações, da patogenicidade de um determinado organismo que, em campo, pode ou não ser eficaz no controle.

4.3.2 Teste de Repelência

Este teste buscou simular uma situação em campo na qual cupins que forrageiam são contaminados com o fungo patogênico. Algumas observações foram feitas nos seguintes sentidos:

- avaliar um possível comportamento dos cupins saudáveis, de evitar o ambiente e o contato com cupins contaminados;
- avaliar estatisticamente as médias de mortalidade nesses grupos.

Observou-se que houve passagem dos cupins saudáveis para o ambiente contaminado e que eles não evitaram o contato com os cupins contaminados.

Os resultados observados (tabela 6) indicam que a mortalidade dos grupos foi superior e significativamente diferente com relação ao controle. Hänel et al.(1983) observaram, em testes de laboratório, que *Nasutitermes exitiosus* contaminado com *M. anisopliae* (tanto os ativos quanto os moribundos) são aceitos pelos cupins saudáveis e são capazes de transmitir a doença para todo o grupo, sugerindo o uso deste fungo em teste de campo.

Tabela 6 Mortalidade de *Nasutitermes globiceps* após 7 dias de contato com os fungos.

Grupos	Espécie de fungo	Média de mortalidade (%) de <i>N. globiceps</i> após 7 dias	Desvio Padrão
A (Tirando os cupins mortos)	<i>M. anisopliae</i>	55,1 b	3,03
	<i>Aspergillus</i> sp. 1	42,1 c	7,61
	Controle	12,3 a	1,83

Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste Mann-Whitney U test (5%).

De modo geral observou-se que na maioria das repetições do grupo controle os cupins saudáveis não evitaram contato com os cupins corados indicando que a coloração não implica em uma rejeição, portanto se esse comportamento fosse observado nos outros grupos, uma possível causa seria a repelência causada pelos fungos.

Nas repetições do grupo inoculado com *Aspergillus* sp. 1 o mesmo comportamento foi observado, ou seja, os cupins saudáveis não evitaram contato com os cupins contaminados e, na maioria das vezes, permaneceram agrupados na placa onde o fungo havia sido inoculado.

Com o grupo inoculado com o fungo *M. anisopliae* observou-se que todos os cupins corados que foram contaminados morreram em 3 a 4 dias após a inoculação. A maioria dos cupins saudáveis permaneceu agrupado na placa onde o fungo foi inoculado.

Com essas observações pode-se afirmar que os fungos utilizados nesse teste não foram repelentes aos cupins da espécie *Nasutitermes globiceps*, podendo ser usados em futuros testes de campo para avaliar sua eficiência.

Nos ensaios anteriores constatou-se que a mortalidade dos cupins em contato com o fungo padrão foi mais rápida do que em contato com os outros fungos. Desta observação surgiram duas hipóteses:

- o fungo que causasse a mortalidade de forma mais lenta teria vantagem em disseminar a doença entre os saudáveis, pois estes evitam o contato com os cupins mortos mas não com os vivos contaminados;
- o fungo que causasse a mortalidade de forma mais lenta teria desvantagem em disseminar a doença, pois os cupins saudáveis teriam mais tempo e mecanismos para controlar uma contaminação generalizada.

Estas hipóteses não foram confirmadas neste teste. Um possível motivo teria sido o fato de que o contato entre os cupins saudáveis e contaminados foi promovido aproximadamente uma hora após a inoculação. Este tempo não é suficiente para causar a mortalidade mesmo com o fungo mais patogênico.

Outro motivo, para que a mortalidade nos cupins saudáveis não seja elevada, decorre do controle da disseminação de um patógeno menos virulento na colônia.

Para verificar estas hipóteses sugere-se que novos testes sejam feitos com fungos da mesma espécie e de cepas que apresentem diferentes graus de patogenicidade, e que o contato entre os cupins saudáveis e os contaminados seja feito em tempos diferentes.

5 CONCLUSÕES

- O fungo isolado e identificado como *Aspergillus* sp. 1 e o fungo *Metarhizium anisopliae* são patogênicos ao cupim *Nasutitermes globiceps*.
- Os fungos *Aspergillus* sp. 1 e *Metarhizium anisopliae* não são repelentes aos cupins da espécie *Nasutitermes globiceps*.
- Cupins saudáveis não evitam o contato com cupins contaminados.
- A concentração de 10^7 conídios/ml aplicada nos testes de patogenicidade é adequada para causar a mortalidade dos cupins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley, 1996. 868p.

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.

ALVES, S.B. Perspectivas para a utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. In: 20 SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, Brasília, 1990. **Resumo**. p.39.

ALVES, S.B. & ALMEIDA, J.E.M. Novas alternativas para o controle microbiológico de cupins. In: Alguns Aspectos Atuais da Biologia e Controle de Cupins. Piracicaba: FEALQ, 1995. p.95-102.

ALVES, S.B.; BERTI-FILHO, E. Controle dos cupins nas construções urbanas e rurais. **Boletim Técnico ESALQ/CENA**, n.4, p.01-12, 1995.

AMBURGEY, T.L. Review and checklist of the literature on interactions between wood-inhabiting fungi and subterranean termites: 1960 - 1978. **Sociobiology**, v.04, n.2, p. 249-296, 1979.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4^a ed. Minneapolis: Burgess, 1987. 241p.

BARRON, G.L. **The genera of Hyphomycetes from soil**. 1^a ed. Baltimore: Robert E. Krieger Publishing Company, 1972. 364p.

- BEAL, R.H.; KAIS, A.G. Apparent infection of subterranean termites with *Aspergillus flavus* Link. **Journal of Insect Pathology**, v.4, p.488-489, 1962.
- BECKER, G. Rearing of termites and testing methods used in the Laboratory.
In: KRISHNA, K. ; WEESNER, F.M. **Biology of termites**. New York: Academic Press, 1969. cap. 11, p.351-385.
- BOYER, P., Les différents aspects de l'action des termites sur les sols tropicaux. In: Pesson, P.: **La vie dans les sols – aspects nouveaux, études expérimentales**. Paris: Gautier-Villars, 1971. p.279-334.
- BRAZOLIN, S. Podridão mole em madeira de *Tabebuia* sp. (ipê) em torre de resfriamento de água: Identificação e avaliação da capacidade de degradação dos fungos e alterações na estrutura anatômica da madeira. Piracicaba, 1997. 140p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- 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.
- DELATE, K.M.; GRACE, J.K.; TEME, C.H.M. Potential use of pathogenic fungi in baits to control the Formosan subterranean termite (Isoptera - Rhinotermitidae). **Journal of Applied Entomology**, v.119, n.6, p.429-433, 1995.
- EDWARDS, R.; MILL, A.E. **Termites in buildings: their biology and control**. East Grinstead: Rentokil, 1986. 261p.

- EL-KADI, M.K.; XARÁ, L.S.; DE MATOS, P.F.; DA ROCHA, J.V.N.; DE OLIVEIRA, D.P. Effects of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* on guinea pigs and mice. **Environmental Entomology**, v.12, p.37-42, 1983.
- FERNANDES, P.M. Controle microbiano de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera-Termitidae) utilizando *Beauveria bassiana* (Bals.) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok.. Piracicaba, 1991. 114p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- FERNANDES, P.M.; ALVES, S.B. 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.
- FONTES, L.R. Termites (Isoptera) que causam infestação em Brasil. Alguns Aspectos Atuais da Biologia e Controle de Cupins. Piracicaba: FEALQ, 1995. p.161-162.
- FONTES, L.R.O. Cupins nasutos (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae) neotropicais, geófagos: morfologia das mandíbulas do alado e do operário e anatomia do tubo digestivo do operário. São Paulo, 1981. 83p. Dissertação (M.S.) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- GALLO, D., NAKANO, O.; NETO, S.S. et al. **Manual de Entomologia Agrícola**. São Paulo: Editora Agrônômica "CERES", 1988. 649pp.
- GAMS, W et al. **CBS - Course of Mycology**. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures., 1987. 136pp.

GLARE, T.R.; MILNER, R.J. Ecology of Entomopathogenic fungi. In: ARORA, D.K.; AJELLO, L.; MUKERJI, K.G. **Handbook of applied Mycology Volume II: Humans, Animals, and Insects**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1992. cap.16, p.547-611.

GRASSÉ, P.P. **Termitologia: Fondation des Sociétés – Construction**. Paris: Masson, 1984. V.2, 613p.

GRASSÉ, P.P. **Termitologia: Comportement - Socialité - Écologie - Évolution - Systematique**. Paris: Masson, 1986. V.3, 715p.

GRIFFIN, D.M. **Ecology of soil fungi**. London: Chapman and Hall, 1972. 193p.

HÄNEL, 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). **Z. Angew. Entom.**, v.92, p.9-18, 1981.

HÄNEL, H. The life cycle of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the termite *Nasutitermes exitiosus*. **Mycopathologia**, v.80, p.137-145, 1982.

HÄNEL, H. Biological control of termites with fungus *Metarhizium anisopliae*. **Holz Zentralblatt**, v.109, n.33, p.488-489, 1983.

HÄNEL, 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, p.305-313, 1983.

- HARRIS, W.V. **Termites their recognition and control**. London: Longmans, Green & Co. Ltd., 1961. 187p.
- HAVERTY, M. The proportion of soldiers in termite colonies: a list and a bibliography (Isoptera). **Sociobiology**, p.199-216, 1977.
- HEIMPEL, A.M.; ANGUS, T.A. Diseases caused by certain sporeforming bacteria. In: STEINHAUS, E.A. **Insect pathology**. New York: Academic Press, 1963. cap. 2, p.21-73.
- HENDEE, E.C. The association of termites and fungi. In: KOFOID, C.A. **Termites and termite control**. Berkeley: University of California Press, 1934. cap. 9, p. 105-116.
- HICKIN, N.E. **Termites - A world problem**. London: Hutchinson, 1971. 232p.
- JONES, S.C.; BORDEREAU, C. Introduction: economically important termites in urban areas worldwide. In: LES INSECTES SOCIAUX, Paris, 1994. **Annals of the 12th Congress of the International Union for the Study of Social Insects-IUSSI; Symposia-Termites in Urban Areas**. Paris, 1994. p.250.
- JONES, W.E.; GRACE, J.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, 1996.
- KHAN, H.K.; JAYARAJ, S.; GOPALAN, M. Testing of entomopathogenic fungi against agro-forestry termite *Odontotermes wallonensis* (Wasmann). **Indian Journal of Forestry**, v.15, n.4, p.342-345, 1992.

- KOFOID, C.A. **Termites and termite control** 2.ed. Berkeley: Univ. of California Press, 1934. 795p.)
- 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.
- LEE, K.E.; WOOD, T.G. **Termites and soils**. London: Academic Press., 1971. 251p.
- LEFEUVE, P. Communications chimiques dans le genre *Nasutitermes* (Isoptères, Termitidae): rôle dans le développement post-embryonnaire et le comportement. Borgonha, 1991. 54p. Tese (Doutorado) -Universidade da Borgonha.
- LELIS, A.T. Termite problem in São Paulo City -Brazil. In: 12th CONGRESS OF THE INTERNATIONAL UNION FOR THE STUDY OF SOCIAL INSECTS (IUSI), Paris, 1994. **Resumo**. p.253.
- LELIS, A.T. O problema dos cupins no meio urbano. **Revista Secretários de Saúde**, v.24, p.26-29, 1997.
- LELIS, A.T. Primeiro registro no Brasil de rainha de substituição de *Coptotermes havilandi* e sua implicação no controle desse cupim. **Vetores & Pragas**, v.4, p.19-23, 1999.

- LUCAROTTI, C.J.; FREDERICI, B.A.; CHAPMAN, H.C. Progress in the Development of *Coelomomyces* fungi for use in integrated mosquito control programs. In: LAIRD, M.; MILES, J.W. **Integrated Mosquito Control Methodologies**. New York: Academic Press, 1985. p.251-268.
- MALAGODI, M.M.; VEIGA, A.F.S.L. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o cupim *Nasutitermes* (Dudley) (Isoptera: Termitidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.24, n.2, p.315-322, 1995.
- MARTOJA, R & MARTOJA-PIERSON, M. **Initiation aux techniques de l'histologies animale**. Paris: Masson, 1968. 1113p.
- MILNER, R.J.; STAPLES, J.A.; LUTTON, G.G. The effect of humidity on germination and infection of termites by the hyphomycete, *Metarhizium anizopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.69, p.64-69, 1997.
- MILNER, R.J.; STAPLES, J.A.; HARTLEY, T.R. et al. Occurence of *Metarhizium anisopliae* in nests and feeding sites of australian termites. **Mycological Research**, v.102, n.2, p.216-220, 1998.
- OLIVEIRA, A.M.F.; LELIS, A.T.; LOPEZ, G.A.C. et al. Agentes destruidores da madeira. In: LEPAGE, E.S. (Ed). **Manual de Preservação de Madeiras**. São Paulo: IPT, 1986. v.1, p.99-278.
- ONIONS, A.H.S; ALLSOPP, D.; EGGINS, H.O.W. **Smiths Introduction to Industrial Mycology**. London: Edward Arnold (Publishers) Ltd., 1981.
- PELCZAR JR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 596p.

- PETERS, B.C.; KING, J. & WYLE, F.R. **Pests of Timber in Queensland**. Queensland Forestry Research Institut, 1996. 175p. Information Series Q196092
- PICCINI, E.; PASCHOLATI, S.F. Crescimento, esporulação e patogenicidade de isolados de *Colletotrichum graminicola* após 14 anos de preservação pelo método de Castellani **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.4, p. 449-502, 1996.
- ROBERTS, D.W. & HUMBER, R. A. Entomogenous fungi. In: Cole & Kendrick (Eds.) **The biology of conidial fungi**. New York: Academic Press, 1981. Vol. 2, cap. 21 p.201-236.
- ROBERTS, D.W. Biotechnology and Biological Control: Entomopathogenic Fungi. In: 20 SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, Brasília, 1990. **Resumo**. p.41-42.
- RODDAM, L.F.; RATH, A.C. Isolation and characterization of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* from Subantarctic Macquarie Island. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.69, p.285-288, 1997.
- SANNASI, A. Studies of na insect mycosis. I. Histopathology of the integument of the infected queen of the mound-building termite *Odontotermes obesus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.13, p.4-10, 1969.
- SANDS, W.A. The association of termites and fungi. In: KRISHNA, K. ; WEESNER, F.M. **Biology of termites**. New York: Academic Press, 1969. cap. 16, p.495-524.

SOPER, R.S.; WARD, M.G. Production, formulation and application of fungi for insect control. In: BARC SYMPOSIUM, n.05, 1981. **Biological Control in Crop Production**. Ahanheld: Papavizas, G.C. Ed., 1981. p.161-180.

STATSOFTT INCORPORATION. **Programa Statistica for Windows**: programa estatístico para análise de dados (software). Tulsa, OK: Statsoft, Inc., 1995

SWEENEY, A.W. An undescribed species of *Smittium* (Trichomycetes) pathogenic to mosquito larvae in Australia. **Transactions of the Brithish Mycological Society**, v.77, p.55-60, 1981.

TANADA, Y.; KAYA, H.K. **Insect pathology**. New York: Academic Press, 1993. 666p.

VAN DRIESCHE, R.G.; BELLOWS JR., T.S. **Biological Control**. New York: Chapman & Hall, 1996. 539p.

VAN DRIESCHE, R.G.; BELLOWS JR., T.S. **Biological Control**. New York: Chapman & Hall, 1996. 539p.

WELLS, J.D.; FUXA, J.R.; HENDERSON, G. Virulence of four fungal pathogens to *Coptotermes formosanus* (Isoptera-Rhinotermitidae). **Journal of Entomological Science**, v.30, n.2, p.208-215, 1995.

WILCKEN, C.F.; RAETANO, C.G. Controle de cupins em florestas. In: ANAIS DO III SEMINÁRIO SOBRE CUPINS (INSECTA, ISOPTERA) & III ENCONTRO PAULISTA DE PESQUISADORES DE CUPINS, Piracicaba, 1995. **Alguns Aspectos Atuais da Biologia e Controle de Cupins**. Piracicaba: FEALQ, 1995. p.141-154.

- YOSHIMURA, T.; TSUNODA, K. Alternative protection of japanese houses from subterranean termite invasion. In: 12th CONGRESS OF THE INTERNATIONAL UNION FOR THE STUDY OF SOCIAL INSECTS (IUSSI), Paris, 1994. **Resumo**. p.259.
- ZENID, G.J. Identificação e grupamento das madeiras serradas empregadas na construção civil habitacional na cidade de São Paulo. Piracicaba, 1997. 169p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- ZOBERI, M.H. The ecology of some fungi in a termite hill. **Mycologia**, v.71, n.3, p.537-545, 1979.
- ZOBERI, M.H. *Metarhizium anisopliae*, a fungal pathogen of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera - Rhinotermitidae). **Mycologia**, v.87, n.3, p.354-359, 1995.
- ZOBERI, M.H.; GRACE, J.K. Fungi associated with the subterranean termite *Reticulitermes flavipes* in Ontario. **Mycologia**, v.82, n.3, p.289-294, 1990 a.
- ZOBERI, M.H.; GRACE, J.K. Isolation of the pathogen *Beauveria bassiana* from *Reticulitermes flavipes* (Isoptera - Rhinotermitidae). **Sociobiology**, v.16, n.3, p.289-296, 1990 b.

Apêndice 1

Sobrevivência - Resultados de sobrevivência obtidos para os cupins da espécie
Nasutitermes globiceps submetidos à seleção do substrato.

Tabela 7 Sobrevivência (%) de *Nasutitermes globiceps* após 10 dias de transferência para os substratos: papelão, celulose, ágar/papel-filtro e serragem.

Repetições	PAPELÃO	CELULOSE	ÁGAR/PAPEL -FILTRO	SERRAGEM
R1	3	49	69	76
R2	34	32	59	88
R3	23	57	32	87
R4	29	16	61	81
R5	29	57	66	86
R6	25	15	56	80
R7	0	52	46	90
R8	35	57	64	87
R9	10	31	40	82
R10	6	58	24	86

Apêndice 2

Mortalidade - Resultados de mortalidade obtidos para os cupins da espécie *Nasutitermes globiceps* submetidos aos fungos isolados (testes de uma semana e testes de duas semanas de duração),

Tabela 8 Mortalidade (%) de *Nasutitermes globiceps* após uma semana de contato com os fungos.

Repetições	Controle	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Paecilomyces</i> sp. 1	<i>Paecilomyces</i> sp. 2	<i>Paecilomyces</i> sp. 3	<i>Paecilomyces</i> sp. 4
R1	21	100	13	21	23	14
R2	22	97	19	14	17	11
R3	11	99	6	9	23	13
R4	15	100	8	68	18	15
R5	26	100	16	16	20	12
R6	9	100	15	23	12	15
R7	8	100	7	30	18	23
R8	8	100	28	13	21	32
R9	6	88	26	66	16	19
R10	18	99	7	26	20	10

(Continua)

(Continuação) Mortalidade (%) de *Nasutitermes globiceps* após uma semana de contato com os fungos.

Repetições	Controle	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Fusarium sp. 1</i>	<i>Fusarium sp. 2</i>	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.
R1	21	100	14	15	9	35
R2	22	97	28	15	12	74
R3	11	99	14	20	8	26
R4	15	100	10	12	19	17
R5	26	100	11	11	17	21
R6	9	100	13	12	14	30
R7	8	100	22	21	13	39
R8	8	100	20	26	22	10
R9	6	88	16	11	11	14
R10	18	99	12	11	14	40

(Continua)

(Continuação) Mortalidade (%) de *Nasutitermes globiceps* após uma semana de contato com os fungos.

Repetições	Controle	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Aspergillus</i> sp. 1	<i>Aspergillus</i> sp. 2	<i>Aspergillus</i> sp. 3	<i>Aspergillus</i> sp. 4
R1	21	100	17	13	10	28
R2	22	97	65	26	23	16
R3	11	99	35	17	18	22
R4	15	100	54	19	17	20
R5	26	100	14	23	30	11
R6	9	100	18	21	14	45
R7	8	100	38	19	10	28
R8	8	100	36	19	15	37
R9	6	88	79	32	12	15
R10	18	99	75	18	15	21

Tabela 9 Mortalidade (%) de *Nasutitermes globiceps* após uma semana de contato com os fungos.

Repetições	Controle tirando	Controle não tirando	<i>Metarhizium anisopliae</i> tirando	<i>Metarhizium anisopliae</i> não tirando	<i>Aspergillus</i> sp. 1 tirando	<i>Aspergillus</i> sp. 1 não tirando
R1	40	43	100	100	85	82
R2	38	40	100	100	89	60
R3	32	40	100	100	100	34
R4	34	24	100	100	91	52
R5	50	15	100	100	95	70
R6	33	48	100	100	93	54
R7	26	36	100	100	95	47
R8	23	38	100	100	71	85
R9	17	57	100	100	86	69
R10	17	39	100	100	81	100

Apêndice 3

Mortalidade - Resultados de mortalidade obtidos para os cupins da espécie
Nasutitermes globiceps após o teste de transmissibilidade.

Tabela 10 Mortalidade (%) de *Nasutitermes globiceps* após duas semanas de teste de transmissibilidade.

Repetições	Controle	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Aspergillus</i> sp. 1
R1	14	55	45
R2	11	51	39
R3	11	57	60
R4	11	50	40
R5	14	56	35
R6	13	53	42
R7	12	57	34
R8	9	55	47
R9	15	57	43
R10	13	60	36