

SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. E *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. PARA CONTROLE DE *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832) (ISOPTERA - TERMITIDAE)¹

Paulo M. Fernandes² e Sérgio B. Alves³

ABSTRACT

Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. And *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Isolates to control of *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera - Termitidae).

In 2 laboratory bioassays, 1 isolate of *Beauveria bassiana* and 3 isolates of *Metarhizium anisopliae* were selected by considering virulence to *Cornitermes cumulans* (an important brazilian pasture pest). For each isolate 5g of pure conidia was applied per colony of *C. cumulans* in the field. Ten days after application, we observed 100% termite mortality and a high value for the conidiogenesis index on cadavers within the nests. KEYWORDS: entomopathogenic fungi, isolates selection, termites.

RESUMO

Em 2 bioensaios de laboratório foram selecionados considerando-se a virulência a *Cornitermes cumulans* (importante praga das pastagens no Brasil) 1 isolado de *Beauveria bassiana* e 3 de *Metarhizium anisopliae*. Cinco gramas de conídios puros de cada isolado foram aplicados por colônia de *Cornitermes cumulans* no campo. Decorridos 10 dias da aplicação observaram-se 100% de mortalidade dos cupins e altos níveis de conidiogênese sobre os cadáveres dentro dos cupinzeiros. PALAVRAS-CHAVE: fungos entomopatogênicos, seleção de isolados, cupins.

Recebido em 18/09/91

¹ Parte da Tese de Doutorado em Entomologia, apresentada à ESALQ/USP.

² Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, Caixa Postal 131. 74 001-970 Goiânia GO.

³ Departamento de Entomologia ESALQ/USP, Caixa Postal 9, 13418-900 Piracicaba SP. Bolsista do CNPq.

INTRODUÇÃO

A espécie de cupim de montículo *C. cumulans* infesta a maioria das pastagens no centro-sul do Brasil. Ocorre em altas densidades reduzindo área útil de pastejo e dificultando tratos culturais. Esta espécie provoca danos a sementes, raízes e plântulas de milho, destroem sementes e raízes de *Brachiaria* e danificam toletes de cana-de-açúcar (FERNANDES & ALVES, no prelo). O controle desta praga tem sido feito através da utilização de inseticidas químicos, os quais apresentam eficiência variável, são tóxicos aos animais e poluem o ambiente.

Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* têm apresentado resultados promissores em bioensaios visando o controle de outras espécies de cupins como: *Coptotermes formosanus* (KO *et al.*, 1982; LAI *et al.*, 1982), *Reticulitermes* sp. (KRAMM *et al.* 1982; KRAMM & WEST, 1982) e *Nasutitermes exitiosus* (HANEL, 1981, 1982). O presente trabalho foi desenvolvido visando selecionar isolados de *B. bassiana* e *M. bassiana* e *M. anisopliae* virulentos a *C. cumulans* em laboratório e eficientes no controle das colônias no campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois bioensaios para seleção de isolados em laboratório e um teste de campo para controle de colônias.

Bioensaio 1: foram testados 5 isolados de *B. bassiana* e 4 isolados de *M. anisopliae* (Quadro 1). Estes isolados foram multiplicados em BDA + Y durante 10 dias a 26°C. As suspensões dos isolados foram padronizadas para $1,2 \times 10^8$ conídios/ml e inoculadas pelo método dos "fragmentos de ninho", que consiste na imersão de fragmentos de ninho de *C. cumulans* na suspensão de conídios, escorrimento do excesso de suspensão sobre papel toalha e adição aos recipientes, seguido dos cupins. A parcela experimental foi formada por um pote plástico transparente (4,5 cm de diâmetro e 7,0 cm de altura) com fundo forrado com papel filtro, com "fragmentos de ninho" tratados e vinte operários e soldados. Foram feitas cinco repetições e o delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. As contagens e retirada dos mortos foram feitas diariamente a partir do 2º dia. Os isolados foram comparados através da análise da variância e comparação de médias pelo teste de Tukey (5%) dos dados de mortalidade aos 3, 4 e 5 dias após inoculação, transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

Bioensaio 2: os 5 isolados mais virulentos a *C. cumulans*, obtidos no bioensaio 1, foram novamente comparados. Seguiram-se os mesmos procedimentos e métodos do bioensaio 1, exceto para os mortos que foram retirados diariamente e colocados em câ-

mara úmida para observação dos níveis de conidiogênese sobre os cadáveres. As análises estatísticas foram feitas com dados de mortalidade do 3º e 5º dia após inoculação

Teste de campo: Os melhores isolados, números 865, 868, 259 e 866 foram reisolados de cupins mortos (boioensaios 2), purificados e multiplicados em arroz através do processo de bandeja (ALVES, 1986). Este teste foi realizado em pastagens de *Brachiaria* no Sítio São João, em Piracicaba. Foram selecionados e mapeados 25 cupinzeiros de *C. cumulans* com diâmetro ao nível do solo (d.n.s.) de 25 a 45 cm. Utilizando-se uma polvilhadeira manual (polvilhadeira de formicida) aplicaram-se 5 g de conídios de cada isolado, por cupinzeiro, através de um canal central atravessando o centro celulósico. Na testemunha apenas foi feito o canal. Foram feitas 5 repetições por tratamento e o delineamento foi inteiramente ao acaso. Após 10 dias da aplicação os cupinzeiros foram arrancados, fragmentados e, utilizando uma escala visual de notas (0, 1, 2, ..., 10 correspondentes a 0, 10, 20, ... 100% de mortalidade ou conidiogênese sobre os cadáveres, respectivamente), avaliaram-se a mortalidade e conidiogênese sobre os cadáveres em cada cupinzeiro. As análises estatísticas foram idênticas ao bioensaio 1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bioensaio 1: Todos os isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram patogênicos a *C. cumulans* diferindo estatisticamente da testemunha (Quadro 2). O isolado 867, embora tenha sido patogênico, foi estatisticamente menos virulento do que os demais. Dois isolados de *M. anisopliae* (865 e 866) foram os mais virulentos apresentando 90% de mortalidade no 2º dia e 100% no 3º dia. Os isolados 477, 760, 259 e 868 foram também muito virulentos a *C. cumulans* e no 3º dia provocaram de 69 a 80% de mortalidade dos cupins não diferindo estatisticamente dos isolados 865 e 866. Após 4 dias apenas o isolado 867 diferiu estatisticamente dos demais.

Os melhores isolados foram selecionados de acordo com os resultados do 3º dia. Os 5 isolados selecionados para o bioensaio 2 foram: 865, 866, 259, 868 e 760. O isolado 760 foi obtido de *C. cumulans* mantido em laboratório e provavelmente se tratava de isolado 447 que, nesta ocasião, estava sendo aplicado sobre *Solenopsis* sp. no mesmo laboratório. Devido a esse fato, optou-se pelo isolado 760. A comparação da virulência destes isolados para *C. cumulans*, utilizando tempos letais (análise de probites), não foi possível devido a rápida mortalidade dos cupins inoculados com os isolados 865 e 866.

Bioensaio 2: Os 5 isolados seleccionados no bioensaio 1 foram novamente comparados (Quadrc 3).

Os isolados 865 e 866 foram virulentos como no bioensaio 1 e no 2º dia provocara 81 e 91% de mortalidade, respectivamente e no 3º dia mataram 100% dos insetos. No 2º e 3º dias os isolados 865 e 866 provocaram mortalidade de *C. cumulans* estatisticamente superiores aos demais. Os isolados 259 e 868, embora menos virulentos, repetiram a performance obtida no bioensaio 1 e causaram, no 5º dia, mortalidades superiores ao isolado 760. Este isolado apresentou uma baixa virulência a *C. cumulans* em relação ao bioensaio 1.

Com relação à conidiogênese dos fungos sobre os cadáveres de *C. cumulans*, os 3 isolados de *M. anisopliae* foram superiores aos de *B. bassiana*, apresentando de 95 a 100% dos cadáveres recobertos com conídios, enquanto que o isolado de *B. bassiana* (868) apresentou 42%. Os isolados 865, 866, 259 e 868 foram escolhidos para o 1º teste de controle de colônias de *C. cumulans* em campo.

Teste de campo: os isolados de *M. anisopliae* (865, 866 e 259) e o isolado de *B. bassiana* (868) foram altamente eficientes no controle das colônias de *C. cumulans* (Quadro 4), alcançando quase 100% de mortalidade, em apenas 10 dias da aplicação, não diferindo estatisticamente entre si. Em relação aos níveis de conidiogênese sobre os cupins mortos no interior dos cupinzeiros, o fungo *B. bassiana* foi estatisticamente superior a *M. anisopliae*, atingindo quase 100% de conidiogênese sobre os cadáveres, enquanto que *M. anisopliae* não atingiu 60%. Os isolados de *M. anisopliae* não diferiram estatisticamente entre si em relação aos níveis de conidiogênese sobre os cadáveres.

A ação dos fungos sobre os cupins no interior do cupinzeiro foi rápida, pois haviam cadáveres espalhados por todo o ninho, indicando que a maioria da população foi atingida pelos fungos e não houve tempo para que operários ativos acumulassem todos cadáveres no fundo do ninho ("instinto de assepsia"). Em apenas um cupinzeiro foi encontrada a rainha que se encontrava morta e com sinais externos (conidiogênese) do fungo (isolado 259). Pelo canal de aplicação houve, em alguns cupinzeiros, penetração de água de chuva e de moscas, cujas larvas se alimentaram dos cadáveres.

Nos dois bioensaios de laboratório observou-se que os isolados de *M. anisopliae* número 865 e 866 provocaram quase 100% de mortalidade em menos de 48 horas. Alguns autores observaram que para certas espécies de cupins inoculadas com isolados de fungos como *B. bassiana* (BAO & YENDOL, 1971), *M. anisopliae* (KRAMM & WEST, 1982) e *Entomophora coronata* (YENDOL & PASCHKE, 1965), a morte do inseto ocorreu antes do crescimento do fungo na hemocele. Nestes trabalhos os insetos morreram em menos de 48 horas, e os autores fizeram tentativas de explicação do fenômeno. YENDOL & PASCHKE (1965), estudando o processo de infecção de *E. coronata* em *Reticulitermes flavipes*,

afirmaram que a mortalidade de cupins, observada em apenas 12 horas após a inoculação, durante os primeiros estágios de penetração do fungo, ocorreu possivelmente devido à produção de micotoxinas. KRAMM & WEST (1982) obtiveram 100% de mortalidade de *Reticulitermes* sp., inoculados com 2 isolados de *M. anisopliae*, ente 16 e 24 horas após a inoculação. Estes autores observaram, através de estudos histológicos, que *M. anisopliae* não penetrou a 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 de cutícula levando o inseto à desidratação. BAO & YENDOL (1971), estudando o processo de infecção de *R. flavipes* por *B. bassiana*, observaram que os cupins morreram 24 a 36 horas após a inoculação do fungo e afirmaram que a ausência de crescimento micelial antes da morte dos cupins pode ser devida a ação de micotoxinas.

O isolado de *M. anisopliae* 865 provocou altos níveis de mortalidade, em menos de 48 horas, em outros gêneros de cupins como: *Syntermes*, *Heterotermes*, *Coptotermes* e *Cryptotermes*, além de outra espécie de *Cornitermes*, em bioensaios de laboratório e testes de campo (FERNANDES, 1991). Nestes estudos e nos trabalhos citados anteriormente, foram utilizadas altas doses dos patógenos. Desta forma, este fenômeno está associado não só à raça do fungo, mas também às altas doses aplicadas. Em exames microscópicos do tegumento de soldados de *Syntermes* sp., inoculados com o isolado 865, e já moribundos, observaram-se muitos conídios penetrando o tegumento. Como os cupins apresentaram sintomas típicos de intoxicação como tremores e paralisia, pode-se sugerir que a morte dos mesmos está associada a alguma enzima ou toxina produzida durante a penetração do fungo. Assim, quanto mais conídios penetram (doses altas) mais toxina ou enzima é liberada e mais rapidamente ocorre a morte do inseto. Entretanto, são necessários estudos mais detalhados para elucidar definitivamente as causas deste fenômeno.

Operários e soldados de *C. cumulans* inoculados com *B. bassiana* e *M. anisopliae* apresentaram alguns sintomas como: agrupamento, tremores de pernas e antenas, perda de coordenação e paralisia, que já haviam sido descritos para outras espécies de cupins (BAO & YENDOL, 1971; HENEL, 1982b).

Nos bioensaios e no teste de campo observou-se que os operários e soldados de *C. cumulans*, recém mortos ou moribundos, eram levados pelos operários mais ativos, acumulados na parte inferior do recipiente ou do ninho e cobertos com partículas de argila. Este "instinto de assepsia" de *C. cumulans* concorda com observações de TORALES (1982-84). Esta autora, examinando colônias de *C. cumulans* mantidas em laboratório e já mortas, relatou que os indivíduos mortos, estavam aglomerados entre si, com grãos de areia e cimento retal ou apareciam em bolas de terra amassada e misturada com alimentos. O "instinto de assepsia" apresentado pelos cupins, não constitui uma barreira capaz de evitar uma epizootia

quando grandes quantidades de patógeno são inoculadas nos seus ninhos, como foi feito através da estratégia da introdução inundativa adotada no teste de campo.

QUADRO 1 - Dados referentes aos isolados de fungos testados sobre *C. cumulans*. Piracicaba, 1990.

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

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

QUADRO 2 - Virulência de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* a *C. cumulans* em laboratório. Piracicaba, 1990.

Espécie do fungo	Nº do isolado	Porcentagem de mortalidade acumulada		
		Dias após inoculação		
		2	3	4
<i>M. anisopliae</i>	865	100 a	100 a	100 a
<i>M. anisopliae</i>	866	90 a	100 a	100 a
<i>B. bassiana</i>	477	36 b	78 ab	95 a
<i>B. bassiana</i>	760	35 b	80 ab	98 a
<i>M. anisopliae</i>	259	32 bc	73 abc	100 a
<i>B. bassiana</i>	868	24 bc	69 abc	96 a
<i>B. bassiana</i>	252	13 c	47 bcd	97 a
<i>B. bassiana</i>	869	22 bc	44 cd	79 a
<i>M. anisopliae</i>	867	20 bc	35 d	50 b
Testemunha	-	0 d	0 e	4 c

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

QUADRO 3 - Virulência de 5 isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* a *C. cumulans* em laboratório. Piracicaba, 1990.

Espécie do fungo	Nº do isolado	Porcentagem de mortalidade acumulada			Porcentagem de conidiogênese
		Dias após inoculação			
		2	3	5	
<i>M. anisopliae</i>	865	81 a	100 a	100 a	100
<i>M. anisopliae</i>	866	91 a	100 a	100 a	100
<i>M. anisopliae</i>	259	15 b	53 b	100 a	95
<i>B. bassiana</i>	868	14 b	29 bc	86 b	42
<i>B. bassiana</i>	760	8 b	16 cd	50 c	9
Testemunha	-	5 d	5 d	7 d	0

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

QUADRO 4 - Mortalidade e conidiogênese sobre *C. cumulans* no interior dos cupinzeiros polvilhados com diferentes isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Piracicaba, 1990.

Espécie do fungo	Nº do isolado	Mortalidade e conidiogênese após 10 dias de aplicação ¹	
		Mortalidade (%)	Conidiogênese (%)
<i>M. anisopliae</i>	865	100 a	54 a
<i>M. anisopliae</i>	866	96 a	58 a
<i>M. anisopliae</i>	259	98 a	54 a
<i>B. bassiana</i>	868	100 a	98 a
Testemunha	-	0	0

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

CONCLUSÕES

Alguns isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* são altamente virulentos a *C. cumulans* em laboratório e campo e apresentam grande potencial para utilização como inseticida microbiano no controle desta praga.

LITERATURA CITADA

- ALVES, S.B. 1986. Produção de fungos entomopatogênicos. In: S.B. ALVES (Coord.) *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Manole, p. 311-323.
- BAO, L.L. & YENDOL, W.G. 1971. Infection of the eastern subterranean termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar) With the fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. *Entomophaga* 16:343-352.
- FERNANDES, P.M. 1991. Controle microbiano de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) utilizando *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Tese de Doutorado. ESALQ/USP, Piracicaba, 114 p.
- HANEL, H. 1981. A bioassay for measuring the virulence of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (fungi imperfecti) against the termite *Nasutitermes exitiosus* (Hill.) (Isoptera, Termitidae). *Z. Angew. Ent.* 92: 9-18.
- HANEL, H. 1982a. Selection of a fungus species suitable for the biological control of the termite *Nasutitermes exitiosus* (Hill.) *Z. Angew. Ent.* 94:236-245.
- HANEL, H. 1982b. The life cycle of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the termite *Nasutitermes exitiosus*. *Mycopathologia* 80: 137-145.
- KO, W.H.; FUJII, J.K.; KANEGAWA, K.M. 1982. The nature of soil pernicious to *Coptotermes formosanus*. *J. Invertebr. Pathol.* 39: 38-40.
- KRAMM, K.R. & WEST, D.F. 1982. Termite pathogens: effects of ingested *Metarhizium*, *Beauveria* and *Gliocladium* conidia on worker termites (*Reticulitermes* sp.). *J. Invertebr. Pathol.* 40: 7-11.
- KRAMM, K.R.; WEST, D.F.; ROCKENBACH, P.G. 1982. Termites pathogens: transfer of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* between *Reticulitermes* sp. termites. *J. Invertebr. Pathol.* 40: 1-6.

- LAI, P.V.; TAMASHIRO, M.; FUJII, J.K. 1982. Pathogenicity of six strains of entomogenous fungi to *Coptotermes formosanus*. *J. Invertebr. Pathol.* 39: 1-5.
- TORALES, G.J. 1982-84. Contribucion al conocimiento de las termitas de Argentina (Pcia. de Corrientes) *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae). *Facena* 5: 97-133.
- YENDOL, W.G. & PASCHKE, J.D. 1965. Pathology of an *Entomophthora* infection in the eastern subterranean termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar). *J. Invertebr. Pathol.* 7: 414-422.