



Ação patogênica de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria javanica* e *Penicillium* sp. contra *Nasutitermes corniger* Motschulsky (Isoptera: Termitidae) no Amazonas.

Ginarajadaça Ferreira dos Santos Oliveira¹, Adriana Dantas Gonzaga², Enedina Nogueira Assunção³, Antônia Queiroz Lima de Souza⁴, João Lúcio Azevedo⁵

Resumo

Os cupins são os invertebrados dominantes em ambientes terrestres tropicais são mais conhecidos por sua importância econômica como pragas de madeira e de outros materiais celulósicos, entretanto podem ser considerados insetos benéficos, pois atuam na decomposição da matéria orgânica e colaboram na ciclagem dos nutrientes e na aeração do solo. Este estudo teve como objetivo analisar quatro espécies de fungos (*Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria javanica* e *Penicillium* sp.) contra o cupim *Nasutitermes corniger* e buscar novas fontes de produção de inóculo, a fim de realizar o controle biológico de cupins. Foram testados como substratos a casca de coco, serragem clara, serragem escura e resíduos de sementes de maracujá para o crescimento de fungos, sendo utilizado como controle o arroz. Os resultados mostraram que os fungos tiveram alta eficiência contra *N. corniger*, destacando *I. javanica*, que mostrou o maior potencial para o controle biológico, com 100% de mortalidade para uma concentração de 10⁸ conídios/mL, a partir do segundo dia. A maior produção média de índice de conídios obtidas de cadáveres de *N. corniger* foram encontrados em *Penicillium* sp. e *I. javanica*, a uma concentração de 10⁷ e 10⁸ conídios/mL. Para a produção de inóculo de fungos em substratos testados, os melhores resultados foram encontrados no arroz e no resíduo de sementes de maracujá para *Metarhizium anisopliae*, *Penicillium* sp. e *Isaria javanica* em cinco dias e em oito dias a *Beauveria bassiana* do crescimento na umidade relativa a 28°C.

Palavras-chave: controle biológico, cupim, praga.

Abstract

Pathogenic action of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria javanica* and *Penicillium* sp. against *Nasutitermes corniger* Motschulsky (Isoptera: Termitidae) in the Amazon. Termites are the dominant invertebrates in tropical terrestrial environments are better known for their economic importance as wood plagues and other cellulosic materials, however they can be considered beneficial insects, as they act in the decomposition of organic matter and collaborate in the cycling of nutrients and aeration from soil. This study aimed to analyze four species of fungi (*Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria javanica* and *Penicillium* sp.) Against the termite *Nasutitermes corniger* and to search for new sources of inoculum production, in order to perform the biological control of termites. Coconut shell, light sawdust, dark sawdust and passion fruit seeds residues were tested as substrates for fungus growth, and rice was used as control. The results showed that the fungi had high efficiency against *N. corniger*, highlighting *I. javanica*, which showed the greatest potential for biological control, with 100% mortality at a concentration of 10⁸ conidia/mL, from the second day. The highest average yield of conidia obtained from *N. corniger* corpses was found in *Penicillium* sp. and *I. javanica*, at a concentration of 10⁷ and 10⁸ conidia/mL. For the production of fungal inoculum in tested substrates, the best results were found in

¹ Docente Fundação Centro de Análise, Pesquisa e Inovação Tecnológica - FUCAPI - Av. Gov. Danilo de Mattos Areosa, 381 - Distrito Industrial - CEP: 69075-351, Manaus, Amazonas, Brasil, E-mail: ginarajadaca@yahoo.com.br

² Docente do ICB/UFAM, Departamento de Morfologia, E-mail: adrianadantas1@gmail.com

³ Técnica do Laboratório do Centro de Apoio Multidisciplinar – CAM. Av. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, Cep: 69080-900, Manaus, Amazonas, Brasil. e-mail: dinanog@yahoo.com.br

⁴ Docente da Faculdade de Ciências Agrárias – UFAM/FCA, e-mail: antoniaglsouza@gmail.com

⁵ Docente da Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Av. Pádua Dias, 11 - Cx. Postal 9 – Cep: 13418-900, Piracicaba, São Paulo, Brasil. e-mail: jlazevedo@usp.br



rice and passion fruit seed residue for *Metarhizium anisopliae*, *Penicillium* sp. and *Isaria javanica* in five days and in eight days the *Beauveria bassiana* of growth in relative humidity at 28 °C.

Key-words: Biological control, termite and pest.

1. Introdução

Os cupins são bastante conhecidos pelo seu potencial como praga, apesar dos cupins-praga constituírem minoria dentro do grupo. Dentre os insetos xilófagos que atacam madeira e outros materiais celulósicos utilizados pelo homem, os térmitas são economicamente os mais importantes, tornando necessário o desenvolvimento de técnicas de controle e manejo, tais como tratamentos preventivos e curativos, a fim de minimizar os prejuízos (GALLO et al., 2002).

Dentre os métodos de controles desta praga, o químico tem sido o mais empregado e difundido (FADINI et al., 2001), mas devido aos problemas de desequilíbrio biológico, poluição do meio ambiente, riscos na aplicação e alto custo de inseticidas, outros métodos de controle vêm sendo adotados e entre esses, o controle biológico, tem se tornado uma alternativa viável em substituição ou em associação ao controle químico (ALVES et al., 1998).

Este controle pode ser realizado por fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (ALVES et al., 1998; LOUREIRO e MOINO JR, 2006), que são considerados seguros para ambiente, o homem e outros agentes naturais.

Este trabalho teve como objetivo analisar os fungos (*Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria javanica* e *Penicillium* sp.) contra os cupins *Nasutitermes corniger*.

2. Material e Método

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética (LABGEN) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). A manutenção dos cupins foi feita em casa de vegetação no Instituto de Ciências Biológicas da UFAM. A identificação taxonômica clássica dos fungos foi realizada na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), no Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas (CCB).

MATERIAL BIOLÓGICO

Isolados de fungos entomopatogênicos

Os fungos utilizados foram *Isaria javanica* (Frieder e Bally) isolado de *Lonomia obliqua* oriundos do Rio Grande do Sul, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin - E₆ isolado de *Diatrea saccharalis*., *Beauveria bassiana* (Balsamo) - URM4548, isolado de *Diabrotica speciosa*, *Penicillium griseofulvum* (Fleming) - 4DPA, provenientes da Coleção de Cultura da Micoteca do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Coleta e manutenção de Nasutitermes corniger

A espécie de cupim *N. corniger* foi obtida de cupinzeiros localizados em árvores no campus da Universidade Federal do Amazonas. Os cupins foram acondicionados em potes de plástico estéreis e levados para manutenção em laboratório.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Produção de conídios

Os fungos foram cultivados em Batata Dextrose e Ágar - BDA (20g de glucose e 4 g de extrato de batata e 17 g de Ágar), durante 12 dias. Em seguida, foi feita uma raspagem da superfície da colônia e transferidos com auxílio da alça de platina para solução Tween 80 (0,05% v/v), contados em câmara de Neubauer. A suspensão foi padronizada para 10⁸ conídios/mL. Essas suspensões foram inoculadas em sacos de polipropileno contendo 100 g de arroz parboilizado, umedecido com 50 mL de água destilada e previamente autoclavado. Após a inoculação, o arroz contido nos sacos foi agitado para melhor espalhamento do inóculo e mantidos em repouso à temperatura ambiente durante 12 dias.

Inoculação de cupins a partir de suspensões conidiais



Foram preparadas suspensões de conídios nas concentrações necessárias para os bioensaios de acordo com Vilas Boas et al., (1996), procedeu-se diluições sucessivas nas concentrações de 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 e 10^4 conídios/mL que foram usadas nos testes *in vitro*.

Para esse experimento, foram feitas cinco repetições com 10 cupins (8 operárias e 2 soldados) em um total de 300 indivíduos, incluindo o grupo controle. Os espécimes foram imobilizados por 1 minuto à temperatura de -2 °C, manipulados com pincéis e pulverizados (pulverizador manual Vilbiss nº 15) com 0,5 mL de cada suspensão.

Após a inoculação, os cupins foram transferidos para placas de Petri contendo papel de filtro umedecido com água destilada e com pedaços de madeira que serviram de abrigo e alimento para os insetos. As placas foram mantidas em casa de vegetação por quatro dias e monitorados diariamente. Os insetos inativados foram transferidos para câmara úmida em placa e contabilizados com base em Sun *et al.*, 2002. Como controle experimental foi utilizado cupins sobre os quais não foram aplicadas suspensões conidiais. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e nas comparações múltiplas de médias utilizou-se o teste de Scheffé. Para os testes fixou-se o nível de 5% de significância. Na análise dos dados utilizou-se o *software Statistica* versão 8.0

Avaliação da infecção fúngica a partir da produção de conídios para avaliação de mortalidade de N. corniger

A infecção dos fungos na espécie *N. corniger* foi avaliada pela observação da produção de conídios de *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *I. javanica* e *Penicillium* sp obtidos de cadáveres dos cupins. Os insetos contaminados e mortos após a infecção foram imersos em tubo de ensaio contendo 4 mL de solução Tween 80. O tubo foi agitado por três minutos e efetuado a quantificação dos conídios em câmara de Neubauer e em seguida procedeu-se o reisolamento dos fungos obtidos de cadáveres. Quatro cupins colonizados pelos fungos foram imersos em álcool 70 % por três minutos; solução hipoclorito de sódio 4 % por dois minutos e em água destilada autoclavada por três minutos, conforme Alves et al. (1998). Em seguida, os insetos foram secados em papel filtro autoclavado,

transferidos para câmara úmida e incubados em B.O.D (28 °C) até as suas esporulações. Após 12 dias, os esporos fúngicos foram semeados em placa de Petri, contendo 15 mL de meio (BDA) acrescido de antibiótico (cloranfenicol). Após o crescimento micelial, foi realizado a avaliação macro e microscópica da colônia.

3. Resultados e Discussão

Os cupins *Nasutitermes corniger* foram suscetíveis a todos os fungos avaliados, os quais apresentaram alta patogenicidade nos diferentes tratamentos, mortalidade maior que a do controle, onde não foi isolado os fungos avaliados.

O fungo *I. javanica* foi mais patogênico sobre *N. corniger* durante a avaliação realizada, atingindo mortalidade de 78 a 84%, desde o primeiro dia de observação nos tratamentos com as concentrações 10^6 a 10^8 conídios/mL, respectivamente diferindo entre si, das outras concentrações conidiais e das outras espécies de fungos.

A partir do segundo dia de exposição à ação patogênica do fungo sobre os cupins atingiu o percentual de 100% de mortalidade na concentração 1×10^8 . Também, o percentual de mortalidade do grupo controle foi discreto (0,2 %) e constatada diferença significativa entre o controle e os tratamentos à partir da concentração 1×10^5 conídios/mL. O *M. anisopliae* após o terceiro dia de exposição, causou 100 % de mortalidade na concentração 10^8 conídios/mL, diferindo estatisticamente das outras concentrações de inóculo. O mesmo não foi evidenciado com o *Penicillium* sp. que apenas no quarto dia de exposição, causou 100% mortalidade na concentração 1×10^7 e 1×10^8 conídios/mL não diferindo estatisticamente entre as concentrações. Ao passo que *B. bassiana* só no quarto dia de exposição, teve mortalidade acumulada de 100%, na concentração 1×10^8 conídios/mL, diferindo estatisticamente das outras concentrações e espécies de fungos. Os resultados obtidos demonstram similaridades aos encontrados por MALAGODI E VEIGA (1995), realizando bioensaio em laboratório, avaliaram a patogenicidade dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre cupins *Nasutitermes* sp. Os tratamentos utilizados foram as suspensões de cada um dos fungos em cinco concentrações que variaram de 1×10^6 a 1×10^{10} conídios /mL. Os resultados mostraram que ambos os fungos



causaram mortalidades de 100% nas concentrações de 1×10^9 e 1×10^{10} e de 97,5% e 87,5 % respectivamente na concentração de 1×10^8 conídios /mL em cinco dias.

WRIGHT et al. (2002) ao utilizarem duas linhagens de *B. bassiana* sobre *Coptotermes formosanus*, em testes de laboratório, verificaram que 100% dos indivíduos morreram após sete dias de exposição ao patógeno, utilizando o método de infecção através do contato direto com a cultura fúngica, demonstrando assim a suscetibilidade do gênero *Coptotermes* a vários fungos entomopatogênicos. Por outro lado WRIGHT et al. (2005) constataram a mortalidade de 100% dos operários de *C. formosanus* em 14 dias, por *M. anisopliae* C4-B em bioensaios utilizando a concentração 2×10^6 conídios/mL, sendo tamanho do inóculo e o tempo de mortalidade do inseto superior ao encontrado neste trabalho, mostrando assim, a eficaz capacidade das linhagens *I. javanica*, *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Penicillium* sp. de infectar e controlar o cupim subterrâneo e arbóreo em menor tempo de exposição aos fungos.

Relatos realizados por RATH e TIDBURY (1996) avaliaram a suscetibilidade de *Coptotermes acinaciformis* e *Nasutitermes exitiosus* aos isolados comerciais de *M. anisopliae* DAT F-001 verificaram que aplicações de inóculos ainda maiores, $8,1 \times 10^7$ conídios/mL resultaram em 100% de mortalidade quatro dias após a inoculação. Menores tempos de mortalidade aliados às menores concentrações do inóculo são características desejáveis na implantação de controle biológicos, sobretudo em espécies vegetais ou culturas de interesse comercial.

A patogenicidade observada no presente estudo é satisfatória e próxima à apresentada por ACUÑA, (2005) quando em ensaios *in vitro* utilizou *M. anisopliae* no controle de *N. corniger* em sete dias obteve um percentual de 100 % de mortalidade. Segundo LECUONA et al., (2001) os fungos entomopatogênicos são considerados eficazes quando apresentam valores de mortalidade acima de 40% para as pragas estudadas. De fato os valores observados são elevados e promissores para o controle de cupins, visto que todos os fungos testados possuíram poder patogênico que causou mortalidade maior aos 40% já no segundo dia para a maioria das concentrações conidiais. O maior índice de

mortalidade (100%) foi obtido no quarto dia após a infecção para a linhagem *I. javanica* em todas as concentrações fúngicas sendo que na concentração de 1×10^7 e 1×10^8 conídios/mL obteve mortalidade de 100 % a partir do segundo dia.

A produção dos conídios nos insetos mortos apresentou diferença estatística significativa entre os fungos testados, indicando maior eficiência na concentração 1×10^7 e 1×10^8 conídios/mL para os fungos *Penicillium* sp. e *I. javanica*, diferenciando das demais concentrações e fungos.

Após o procedimento da técnica em lâmina foi observado no período de 24 horas à formação de micélio, representado por hifas septadas, em todos os fungos re-isolados. Às 48 horas os fungos *Penicillium* sp. e *B. bassiana* foi constatada a formação de conidióforos e conídios sendo estes confirmados no reisolado porém, estas estruturas, principalmente os conidióforos foram mais abundantes a partir das 72 horas. Estes dados indicam o revigoramento das linhagens depois da passagem pelos cupins *Nasutitermes corniger* técnica utilizada para ativar a patogenicidade das linhagens fúngicas estocadas em substratos artificiais. Diante destas análises não foram evidenciadas diferenças morfológicas entre as estruturas vegetativas e reprodutivas dos fungos padrão e dos re-isolados estudados, embora estas estruturas tenham se apresentado em maior proporção em todos os reisolados. Estes dados corroboram com os encontrados por NASCIMENTO (2003) ao analisar os aspectos morfológicos de *B. bassiana* reisolado de *R. sanguineus*.

As espécies de fungos empregadas apresentaram elevado poder de infecção aos térmitas e foi possível observar que a produção de conídios é fator importante na disseminação e permanência de fungos entomopatogênicos em população de inseto, devido ao contato social, que permite a transferência do inóculo de cupins infectados para os não infectados, além de aumentar o potencial do inóculo no ambiente do hospedeiro, sendo assim, essencial para que esses patógenos sejam bem sucedidos no biocontrole de insetos-praga no campo.

4. Conclusão

Na avaliação da infectividade *in vitro* dos fungos *Metarhizium anisopliae*, *Isaria javanica* e



Penicillium sp. e *Beauveria bassiana* comprovaram sua patogenicidade contra o cupim *Nasutitermes corniger* tendo ocasionado 100% de mortalidade na concentração 10^8 conídios/mL em cinco dias.

Não foram observadas mudanças nos aspectos morfológicas das colônias re-isoladas de cadáveres dos cupins *N. corniger*.

Agradecimentos

Ao prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, José Odair Pereira, Enedina Nogueira Assunção, a Divisão de Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas- UFAM, FAPEAM.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

Alves S B, Pereira R M (1998) Fungos Entomopatogênicos, p. 289-381. In: Alves, S B (ed) Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.

Alves S B, Moraes S A (1998) Quantificação de inóculo de patógenos de insetos, p. 765-777. In: Alves S B Controle Microbiano de Insetos. 2 (ed) Piracicaba, FEALQ, 1163p.

Albuquerque A C, Pereira K C A, Cunha, F M, Veiga A F S L, Athayde, A C R, Lima, E A L A (2005) Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *Metarhizium anisopliae* var. *acridium*. sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). Neotrop Entomol 34: p.585-592.

Araujo Jr JM, Marques E.J. Oliveira, J. V. (2009) Potencial de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Bauveria bassiana* do óleo de nin no controle de pulgões *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae). Neotrop Entomol 38: 520-525.

Cunha, F. M.; Teixeira, V. W.; Teixeira, A. A. C.; Albuquerque, A. C.; Alves, L. C.; Lima, E. C. L. A. (2009) Hemocyte Characterization of

Nasutitermes coxipoensis (Holmgren) (Isoptera: Termitidae) Workers and Hemocyte Evaluation after Parasitism by *Metarhizium anisopliae*. Neotrop Entomol 39: 293-297.

Fadini, M A.; Souza, O. G.; Fanton, C. J. (2001). The effects of depth and distribution of liquid insecticides for the control of mound termites in pastures (Isoptera: Termitidae). 30 : 157-159.

Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S (2002) Entomologia Agrícola 2ª (ed) São Paulo, FEALQ, 10: 920 p.

GRIMALDI, D. Evolution of the insects (2005) Cambridge, University Press, 755p.

Hussain, A.; Ahamed, S; Shahid, M. (2011). Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* for controlling subterranean termites. Neotrop Entomol 40, 244-250.

Lecuona R E, Edelstein J D, Berretta M F, Rosa R F LA, Arcas J A (2001) Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) strains as potencial agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). J Med Entomol 38: 172-179.

Loureiro, E. S. & Moino Jr, A. (2006) Pathogenicity of Hyphomycet Fungi to Aphids *Aphis gossypii* Glover and *Myzus Persicae* (Sulzer) (Hemiptera:Aphididae). Neotrop Entomol 35: 660-665.

Neves, P.M.O.J. & Alves, S. B. (2004). External events related to the infection of *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) by the entomopathogenic fung *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Neotrop Entomol 33, 051-056.

Pires, L. M.; Marques, E. J.; Oliveira, J. V.; Alves, S. B. (2010). Selection of Isolates of Entomopathogenic Fungi for Controlling *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera:

Gelechiidae) and their Compatibility with Insecticides Used in Tomato Crop. Neotrop. Entomol. 39: 977-984.

Sun J, Fuxa J R, Henderson G (2002) Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Coptotermes formosanus* *in vivo* and *in vitro*. J Invert Pathol 81: 78-85.