

**PATOGENICIDADE DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. E *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. SOBRE O CUPIM *Nasutitermes* (DUDLEY) (ISOPTERA: TERMITIDAE) EM LABORATÓRIO**

Marilene Malagodi<sup>1</sup> e Antônio F.S.L. Veiga<sup>2</sup>

**ABSTRACT**

Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on the Termite *Nasutitermes* (Dudley) (Isoptera: Termitidae) in Laboratory

Laboratory bioassays showed that the fungi *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Isolates from IPA) were pathogenic against workers and soldiers of *Nasutitermes* (Dudley), an important sugarcane pest in the Pernambuco, Brazil. *Metarhizium anisopliae* and *B. bassiana* caused 100% mortality on termites at concentrations of  $1.0 \times 10^9$  and  $1.0 \times 10^{10}$  conidia/ml; at  $1.0 \times 10^8$  conidia/ml, caused 97,5% and 87,5% mortality, respectively, five days after inoculation. There was no statistical difference amongst these three concentrations. The lethal time (LT<sub>50</sub>) of exposure showed range between 2.70 and 5.87 days for *B. bassiana* from 1.96 to 6.72 days for *M. anisopliae* in concentrations of  $1.0 \times 10^{10}$  and  $1.0 \times 10^6$  conidia/ml. Lethal concentrations (LC<sub>50</sub>) were of  $3.18 \times 10^7$  and  $0.18 \times 10^7$  conidia/ml for *B. bassiana* and  $1.78 \times 10^7$  and  $0.69 \times 10^7$  conidia/ml for *M. anisopliae*, at four and six days after inoculation, respectively. The concentration of  $1.0 \times 10^8$  conidia/ml was considered adequate according to mortality and biological product economy.

KEY WORDS: Insecta, biological control, termite, sugarcane, entomopathogenic fungi.

**RESUMO**

Em bioensaios de laboratório, os fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. foram patogênicos a operários e soldados de *Nasutitermes* (Dudley), uma importante praga da cana de açúcar em Pernambuco, Brasil. Os resultados indicaram que *Metarhizium anisopliae* e *B. bassiana* aos cinco dias após a inoculação causaram mortalidade de 100% nas concentrações  $1,0 \times 10^9$  e  $1,0 \times 10^{10}$  conídios/ml, e, na concentração de  $1,0 \times 10^8$  conídios/ml, as mortalidades foram de 97,5% e 87,5% de cupins, respectivamente, não havendo diferenças significativas entre essas três concentrações. Os tempos letais (TL<sub>50</sub>)

---

Recebido em 04/04/94. Aceito em 01/06/95.

<sup>1</sup>Departamento de Agronomia, UFRPE, Dois Irmãos s/n, 52071-000, Recife, PE.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia, Área de Entomologia, UFRPE, Dois Irmãos s/n, 52071-000, Recife, PE.

variaram de 2,70 a 5,87 dias para *B. bassiana* e de 1,96 a 6,72 dias para *M. anisopliae* nas concentrações  $1,0 \times 10^{10}$  e  $1,0 \times 10^6$  conídios/ml. As concentrações letais ( $CL_{50}$ ) foram de  $3,18 \times 10^7$  e  $0,18 \times 10^7$  conídios/ml para *B. bassiana* e  $1,7 \times 10^7$  e  $0,69 \times 10^7$  conídios/ml para *M. anisopliae*, aos quatro e seis dias após a inoculação, respectivamente. A concentração  $1,0 \times 10^8$  conídios/ml foi considerada eficiente, face a mortalidade e economia do produto biológico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Insecta, controle biológico, cupim, cana-de-açúcar, fungos entomopatogênicos.

## INTRODUÇÃO

Entre os fatores atuais que contribuem para a baixa produtividade da acultura da cana-de-açúcar, notadamente no Nordeste brasileiro, estão os cupins. Esses insetos compreendem várias espécies e estão presentes em todas as áreas tropicais do mundo onde a cana-de-açúcar é cultivada (Harris 1969). No Brasil, devido aos danos causados em todas as fases da cultura, podem ocasionar perdas superiores a 10 t/ha (Novaretti 1986).

Estudos de controle biológico com os fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. foram efetuados em cupins das espécies: *Nasutitermes exitiosus* Hill. (Hanel 1981, 1982), *Coptotermes formosanus* Shiraki (Ko et al. 1982, Lai et al. 1982), *Reticulitermes* sp. (Kramm et al. 1982, Kramm & West 1982) e *Cornitermes cumulans* Kollar (Fernandes 1991), apresentando resultados promissores. O objetivo do trabalho foi avaliar a patogenicidade, tempos e concentrações letais dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* em relação ao cupim *Nasutitermes* sp.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram testados os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* provenientes da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA. O cupim *Nasutitermes* sp. foi obtido de áreas de cana-de-açúcar da zona do Litoral Sulde Pernambuco, intensamente infestadas, e mantidos em casa-de-vegetação, para os bioensaios de laboratório (Malagodi 1993). O método de inoculação utilizado foi o dos "fragmentos de ninho", descrito por Fernandes (1991). Este método utiliza fragmentos de ninho imersos em 200 ml da suspensão de conídios na concentração desejada, acrescida de espalhante adesivo "Tween" na proporção 0,1 ml/l por aproximadamente 25 segundos, escorridos sobre papel-toalha e adicionados aos recipientes, seguidos dos cupins. A parcela experimental constituiu-se de um recipiente de vidro transparente com 4,0 cm de diâmetro por 7,0 cm de altura, com o fundo forrado com papel esterilizado e, 15 a 20g de fragmentos de ninhos de *Nasutitermes* sp. previamente tratados com a suspensão de conídios. Em cada um desses recipientes foram colocados 20 cupins (operários e soldados) oriundos das colônias de *Nasutitermes* sp. mantidas em casa-de-vegetação. Os tratamentos utilizados foram as suspensões de cada um dos fungos em cinco concentrações ( $1,0 \times 10^6$ ;  $1,0 \times 10^7$ ;  $1,0 \times 10^9$  e  $1,0 \times 10^{10}$  conídios/ml) e mais a testemunha, que recebeu apenas água esterilizada com espalhante adesivo. Após o tratamento, os recipientes foram cobertos com tecido de algodão branco e mantidos em estufa incubadora BOD à temperatura de 27°C, umidade  $82,5 \pm 2\%$  e no escuro. Os insetos mortos foram retirados e contados diariamente a partir do segundo dia, sendo colocados em câmara úmida para se observar a produção de conídios sobre os cadáveres. Os dados de mortalidade foram transformados em  $\sqrt{x} \pm 0,5$ ,

submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade aos três, quatro e cinco dias após a inoculação. Foram determinados os tempos letais ( $TL_{50}$ ) e concentrações letais ( $CL_{50}$ ) através do programa de Análise de Próbite (Sokal 1958).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram patogênicos a *Nasutitermes* sp. e as mortalidades provocadas foram crescentes em relação ao tempo, após a inoculação e ao aumento da concentração (Tabelas 1 e 2).

Em relação a *B. bassiana*, os tratamentos  $1,0 \times 10^9$  e  $1,0 \times 10^{10}$  conídios/ml apresentaram mortalidade superior a 90% (91,5 e 93,0%, respectivamente) já no quarto dia após a inoculação, enquanto que *M. anisopliae* provocou, nas mesmas concentrações, 100% de mortalidade de cupins. Os tratamentos  $1,0 \times 10^8$ ,  $1,0 \times 10^9$  e  $1,0 \times 10^{10}$  conídios/ml provocaram aos cinco após a inoculação, as mortalidades de 87,5%, 100% e 100% para *B. bassiana*, e

Tabela 1. Mortalidade de *Nasutitermes* sp. e conidiogênese aos três, quatro e cinco dias após a inoculação com diferentes concentrações do isolado de *Beauveria bassiana*.

Concentração	Mortalidade acumulada <sup>1</sup>						Conidiogênese <sup>2</sup>
	3		4		5		
	Média	%	Média	%	Média	%	
$1,0 \times 10^{10}$	3,1762 a	52,5	4,3595 a	93,0	4,5276 a	100,0	60,5
$1,0 \times 10^9$	3,3862 a	58,5	4,3274 a	91,5	4,5276 a	100,0	49,5
$1,0 \times 10^8$	2,7855 a	38,0	3,6353 b	66,0	4,2101 a	87,5	48,0
$1,0 \times 10^7$	1,7366 b	14,0	2,3982 c	28,5	3,1712 b	50,5	29,5
$1,0 \times 10^6$	1,4498 b	9,0	1,9387 cd	17,0	2,1925 c	22,5	12,0
Testemunha	1,2086 b	5,0	1,3316 d	6,5	1,7153 c	12,5	0
DMS 5%	0,9007		0,6406		0,5878		
CV%	29,74		16,16		13,11		

<sup>1</sup>Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Dados de média transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ . Total de 200 insetos por tratamento.

<sup>2</sup>Total de 399 insetos que apresentaram conidiogênese.

97,5%, 100% e 100% para *M. anisopliae*, não diferindo estatisticamente entre si, mas apenas das concentrações  $1,0 \times 10^7$  e  $1,0 \times 10^6$  conídios/ml. O tratamento  $1,0 \times 10^6$  conídios/ml não diferiu estatisticamente da testemunha, embora tenha apresentado 12% de cupins mortos com produção de conídios (conidiogênese) de *B. bassiana* e 10,5% com conídios de *M. anisopliae*.

Tabela 2. Mortalidade de *Nasutitermes* sp. e conidiogênese aos três, quatro e cinco dias após a inoculação com diferentes concentrações do isolado de *Metarhizium anisopliae*.

Concentração	Mortalidade acumulada <sup>1</sup>						Conidiogênese <sup>2</sup>
	3		4		5		
	Média	%	Média	%	Média	%	
1,0x10 <sup>10</sup>	4,0459 a	81,5	4,5276 a	100	4,5276 a	100,0	55,5
1,0x10 <sup>9</sup>	4,1118 a	82,5	4,5276 a	100	4,5276 a	100,0	49,0
1,0x10 <sup>8</sup>	2,8834 b	42,5	4,1806 b	87,5	4,4686	a	97,5
45,5							
1,0x10 <sup>7</sup>	1,2336 c	8,0	1,9108 b	20,5	2,4918 b	34,0	23,5
1,0x10 <sup>6</sup>	1,1268 c	5,0	1,6786 b	13,0	1,7805 bc	15,0	10,5
Testemunha	1,1050 c	4,0	1,2571 b	6,0	1,5653 c	11,0	0
DMS 5%	0,8235		0,7785		0,7421		
CV%	25,76		19,53		17,39		

<sup>1</sup>Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Dados de média transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ . Total de 200 insetos por tratamento.

<sup>2</sup>Total de 368 insetos que apresentaram conidiogênese.

Fernandes (1991), utilizando o mesmo método de inoculação em laboratório, obteve mortalidade de 86 a 100% de *Cornitermes cumulans* Kollar com *B. bassiana* e *M. anisopliae*, entre o terceiro e quinto dia após a inoculação. O autor ressalta que este método de inoculação pode não ser eficiente para suspensões fúngicas com baixa concentração de conídios devido à

Tabela 3. Tempos Letais (TL<sub>50</sub>) para adultos operários e soldados de *Nasutitermes* sp. em relação a cinco concentrações de conídios de *Beauveria bassiana*.

Concentração	TL <sub>50</sub> <sup>1</sup> (dias)	Intervalo de confiança	Equação da reta
1,0 x 10 <sup>10</sup>	2,70	2,1346 - 3,4374	Y = 1,60962 + 7,83407.log X
1,0 x 10 <sup>9</sup>	2,62	2,1456 - 3,2062	Y = 1,94130 + 7,30408.log X
1,0 x 10 <sup>8</sup>	3,02	2,5074 - 3,6531	Y = 2,51457 + 5,16780.log X
1,0 x 10 <sup>7</sup>	4,48	3,8315 - 5,2387	Y = 1,11008 + 5,97256.log X
1,0 x 10 <sup>6</sup>	5,87	5,1719 - 6,6713	Y = 0,56402 + 5,76903.log X

<sup>1</sup>Total de 200 insetos em cada tratamento.

diluição do inóculo, observando ainda que, quando se utilizaram concentrações de  $10^7$  conídios/ml em testes de laboratório, a mortalidade de operários de *C. cumulans* foi retardada. Tal constatação está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo.

Tabela 4. Tempos Letais ( $TL_{50}$ ) para adultos operários e soldados de *Nasutitermes* sp. em relação a cinco concentrações de conídios de *Metarhizium anisopliae*.

Concentração	$TL_{50}$ <sup>1</sup> (dias)	Intervalo de confiança	Equação da reta
$1,0 \times 10^{10}$	1,96	0,4368 - 3,8034	$Y = 3,18570 + 6,20337 \cdot \log X$
$1,0 \times 10^9$	2,20	1,1330 - 4,2787	$Y = 2,19471 + 8,18435 \cdot \log X$
$1,0 \times 10^8$	2,97	2,6942 - 3,2939	$Y = 1,06416 + 8,30230 \cdot \log X$
$1,0 \times 10^7$	5,47	4,8406 - 6,1862	$Y = 0,31244 + 6,35030 \cdot \log X$
$1,0 \times 10^6$	6,72	5,5715 - 8,1258	$Y = 0,09790 + 5,92101 \cdot \log X$

<sup>1</sup>Total de 200 insetos em cada tratamento.

Sintomas de intoxicação como agrupamento, tremores de pernas e antenas, descarga anal, perda de coordenação e paralisia, foram apresentados por operários e soldados de *Nasutitermes* sp. inoculados. Estes sintomas já haviam sido descritos para cupins do mesmo gênero (Hanel 1982) e para outras espécies, como: *C. cumulans* (Fernandes 1991), *Reticulitermes flavipes* Kollar (Bao & Yendol 1971) e *Odontotermes abesus* Rambur (Sannasi 1969).

A rápida mortalidade de cupins provocada pelos dois fungos, neste experimento, e, principalmente por *M. anisopliae* (100% ao quarto dia após a inoculação) foi observada também, com maior intensidade por vários autores em outras espécies de cupins. Cupins

Tabela 5. Concentrações Letais ( $CL_{50}$ ) para adultos operários e soldados de *Nasutitermes* sp. em relação aos isolados de *Beauveria bassiana* (B. b) e *Metarhizium anisopliae* (M. a).

Fungo	Dias após a inoculação	$CL_{50}$ <sup>1</sup> conídios/ml	Intervalo de confiança	Equação da reta
B. b	4	$3,18 \times 10^7$	$0,9586 \times 10^7 - 10,615 \times 10^7$	$Y = -0,3029 + 0,7067 \cdot \log X$
	6	$0,18 \times 10^7$	$1,5053 \times 10^6 - 2,1802 \times 10^7$	$Y = -1,6709 + 1,06597 \cdot \log X$
M. a	4	$1,78 \times 10^7$	$0,4325 \times 10^7 - 7,3858 \times 10^7$	$Y = -4,1873 + 1,2668 \cdot \log X$
	6	$0,69 \times 10^7$	$1,9770 \times 10^6 - 24,1160 \times 10^7$	$Y = -43697 + 1,3699 \cdot \log X$

<sup>1</sup>Total de 200 insetos em cada tratamento.

inoculados com *B. bassiana* (Bao & Yendol 1971) e *M. anisopliae* (Toumanoff & Rombault 1965, Kramm & West 1982) morreram em menos de 48 horas e antes do crescimento do fungo na hemocele. Esses autores concordam que a morte do inseto antes do crescimento micelial pode ocorrer devido à ação de micotoxinas, ou abrasão da cutícula levando o inseto à desidratação.

A percentagem de cadáveres de *Nasutitermes* sp. que apresentavam conidiogênese foi crescente com o aumento de concentração e semelhantes nos dois fungos, embora, de uma maneira geral, tenha se apresentado baixa (Tabelas 1 e 2).

Os tempos letais ( $TL_{50}$ ) variaram em função das concentrações de conídios inoculadas, sendo obtidos os limites para *B. bassiana* de 2,70 a 5,87 dias e para *M. anisopliae* de 1,96 e 6,72 dias, nas concentrações de  $1,0 \times 10^{10}$  a  $1,0 \times 10^6$  conídios/ml, respectivamente (Tabelas 3 e 4). Comparando-se esses resultados observa-se que as concentrações de  $1,0 \times 10^{10}$ ,  $1,0 \times 10^9$  e  $1,0 \times 10^8$  conídios/ml do isolado de *M. anisopliae* apresentaram os  $TL_{50}$  inferiores aos das mesmas concentrações do isolado de *B. bassiana*. Em altas concentrações ( $10^{10}$ ,  $10^9$  e  $10^8$ ) o fungo *M. anisopliae* foi mais virulento do que *B. bassiana*. Já nas concentrações inferiores ( $10^7$  e  $10^6$ ) o fungo *B. bassiana* apresentou uma ação mais rápida do que *M. anisopliae*.

As concentrações letais ( $CL_{50}$ ) observadas (Tabela 5) aos quatro dias após a inoculação dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram  $3,18 \times 10^7$  e  $1,78 \times 10^7$  conídios/ml, enquanto que aos seis dias foram  $0,18 \times 10^7$  e  $0,69 \times 10^6$  conídios/ml, respectivamente. O fungo *M. anisopliae*, aos quatro dias, necessitou de uma menor concentração de conídios/ml do que *B. bassiana* no mesmo período, para que ocorresse uma mortalidade de 50% de cupins. Aos seis dias observa-se que o quadro se inverte, pois, a  $CL_{50}$  exigida para o fungo *B. bassiana* passa a ser menor do que a de *M. anisopliae*. Para aumentar a rapidez de mortalidade do isolado de *B. bassiana*, de seis para quatro dias, foi necessário um aumento da concentração em 1.661% (de  $0,18 \times 10^7$  para  $3,18 \times 10^7$  conídios/ml), enquanto que, para *M. anisopliae* este aumento foi de 158% (de  $0,69 \times 10^7$  para  $1,78 \times 10^7$  conídios/ml). A ação mais lenta de *B. bassiana* pode ser explicada, pela menor virulência do isolado a *Nasutitermes* sp. em relação ao isolado de *M. anisopliae*, ou ainda, pela temperatura mantida na estufa incubadora durante os bioensaios ( $27^\circ\text{C}$ ), pois, segundo Schaerffenberg (1964), Lingg & Donaldson (1981) e Quintela *et al.* (1992) pode ser considerada alta para o ótimo desse fungo.

A partir da análise estatística e de próbites pode-se afirmar que as concentrações  $1,0 \times 10^8$ ,  $1,0 \times 10^9$  e  $1,0 \times 10^{10}$  conídios/ml dos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* são eficientes quando utilizadas nas condições e metodologia indicadas, sendo que  $1,0 \times 10^8$  conídios/ml pode ser considerada adequada aos bioensaios, já que a mesma praticamente não diferiu das concentrações  $1,0 \times 10^9$  e  $1,0 \times 10^{10}$  conídios/ml e possibilitou uma economia do produto biológico, além da facilidade de manuseio.

## LITERATURA CITADA

- Bao, L.L. & W.G. Yendol. 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, 114p.

- Hanel, H. 1981.** 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. Ent. 92: 9-18.
- Hanel, H. 1982.** Selection of a fungus suitable for the biological control of the termite *Nasutitermes exitiosus* (Hill). Z. Angew. Ent. 94: 236-245.
- Harris, W.V. 1969.** Termites as pests of sugar cane. In J.J. Williams (ed.). Pests of sugarcane Amsterdam, Elsevier, 306p.
- Ko, W.H., J.K. Fujii & K.M. Kanegawa. 1982.** The nature of soil pernicious to *Coptotermes formosanus*. J. Invertebr. Pathol. 39: 38-40.
- Kramm, K.R. & D.F. West. 1982.** Termite pathogens: effects of ingested *Metarhizium*, *Beauveria* and *Glicadium conidia* on worker termites (*Reticulitermes* sp.). J. Invertebr. Pathol. 40: 7-11.
- Kramm, K.R., D.F. West & P.G. Rockenbach. 1982.** Termite pathogens: transfer of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* between *Reticulitermes* sp. termites. J. Invertebr. Pathol. 40: 1-16.
- Lai, P.Y., M. Tamashiro & J.K. Fujii. 1982.** Pathogenicity of six strains of entomogenous fungi to *Coptotermes formosanus*. J. Invertebr. Pathol. 39: 1-5.
- Lingg, A.J. & M.D. Donaldson. 1981.** Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. J. Invertebr. Pathol. 38: 191-200.
- Malagodi, M. 1993.** Aspectos bioecológicos e controle microbiano do cupim *Nasutitermes* (Dudley, 1980) (Isoptera: Termitidae) em cana-de-açúcar na zona do Litoral Sul do Estado de Pernambuco. Dissertação de mestrado, UFRPE, Recife, 144p.
- Novaretti, W.R.T. 1986.** Controle de cupins em cana-de-açúcar através do emprego de inseticidas no solo. Bol. Tec. COPERSUCAR 33: 39-44.
- Quintela, E.D., J.C. Lord, S.B. Alves & D.W. Roberts. 1992.** Persistência de *Beauveria bassiana* em solo de cerrado e sua interação com microorganismos do solo. An. Soc. Entomol. Brasil 1: 67-82.
- Sannasi, A. 1969.** Studies of an insect mycosis. I. Histopathology of the integument of the infected quenn of the mound building termite *Odontotermes obesus*. J. Invertebr. Pathol. 13: 4-10.
- Schaerffenberg, B. 1964.** Biological and environmental conditions for the development of mycosis caused by *Beauveria* and *Metarhizium*. J. Insect Pathol. 6: 8-20.
- Sokal, R.R. 1958.** Probit analysis on a digital computer. J. Econ. Entomol. 51: 738-739.

**Toumanoff, C. & J. Rombault. 1965.** Actions de certains champignons entomophage cultiver sur les milieux appropriés attractifs, sur le termite de Saintoge *Reticulitermes santonensis*. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 40: 605-609.

---