

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Nasutitermes corniger* (Motschulsky)
(Isoptera:Termitidae) POR FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS:
Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) (Sorokin), *Beauveria bassiana*
(Balssamo) (Vuillemin), *Isaria javanica* (Frieder e Bally)
e *Penicillium* sp. (Fleming) NO AMAZONAS

GINARAJADAÇA FERREIRA DOS SANTOS OLIVEIRA

MANAUS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Nasutitermes corniger* (Motschulsky)
(Isoptera:Termitidae) POR FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS:
Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) (Sorokin), *Beauveria bassiana*
(Balssamo) (Vuillemin), *Isaria javanica* (Frieder e Bally)
e *Penicillium* sp. (Fleming) NO AMAZONAS

GINARAJADAÇA FERREIRA DOS SANTOS OLIVEIRA

MANAUS

2011

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

O48c

Oliveira, Ginarajadaça Ferreira dos Santos

Controle biológico de Isoptera: Termitidae, *Nasutitermes* sp. (Motschulsky) por fungos entomopatogênicos: *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) (Sorokin), *Beauveria bassiana* (Balssamo) (Vuillemin) *Isaria javanica* (Frieder e Bally) e *Penicillium* sp. no Amazonas / Ginarajadaça Ferreira dos Santos Oliveira. – Manaus, AM: UFAM, 2011.

92f.: il. color. ;

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, 2011.

Orientador: Dr. João Lúcio de Azevedo

Co-orientador: Dr. José Odair Pereira

1. Térmita – Controle biológico – Amazonas 2. Cupins – Controle biológico – Amazonas 3. Fungos entomopatogênicos - Amazonas I. Azevedo, João Lúcio de (Orient.) II. Pereira, Jose Odair (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU (1997) 595.732(811.3)(043.2)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Nasutitermes corniger* (Motschulsky)
(Isoptera:Termitidae) POR FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS:
Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) (Sorokin), *Beauveria bassiana*
(Balssamo) (Vuillemin), *Isaria javanica* (Frieder e Bally)
e *Penicillium* sp. (Fleming) NO AMAZONAS

GINARAJADAÇA FERREIRA DOS SANTOS OLIVEIRA

MANAUS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

GINARAJADAÇA FERREIRA DOS SANTOS OLIVEIRA

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Nasutitermes corniger* (Motschulsky)
(Isoptera:Termitidae) POR FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS:
Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) (Sorokin), *Beauveria bassiana*
(Balssamo) (Vuillemin), *Isaria javanica* (Frieder e Bally)
e *Penicillium* sp. (Fleming) NO AMAZONAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof^o Dr. João Lúcio de Azevedo
Coorientador: Prof^o Dr. José Odair Pereira

MANAUS
2011

GINARAJADAÇA FERREIRA DOS SANTOS OLIVEIRA

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Nasutitermes corniger* (Motschulsky)
(Isoptera:Termitidae) POR FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS:
Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) (Sorokin), *Beauveria bassiana*
(Balssamo) (Vuillemin), *Isaria javanica* (Frieder e Bally)
e *Penicillium* sp. (Fleming) NO AMAZONAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovado em 11 de outubro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio
Centro de Biotecnologia do Amazonas

Prof^ª. Dra. Rozana de Medeiros Sousa Galvão
Universidade Federal do Amazonas

Prof^ª. Dra. Yamile Benayon Alencar
Universidade Nilton Lins

Ao meu pai, Hildeberto

Ferreira dos Santos

in memoriam

Dedico

*Ao Meu esposo
Davi Gentil de Oliveira
Ofereço*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de viver e realizar um sonho;

A meu orientador Dr. João Lúcio de Azevedo e co-orientador Dr. José Odair Pereira pela confiança, pela amizade e pelo apoio;

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em especial na figura de seu coordenador Dr. Edmar Vaz de Andrade;

A Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e a FAPEAM pela concessão da bolsa financiada;

Aos professores: Spartaco Astolfi Filho, Antonia Queiroz, Cristina Sayuri Maki e Pedro de Queiroz Costa Neto e a todos que contribuíram para o meu crescimento;

Ao meu esposo Davi Gentil de Oliveira, meus filhos Flavia Danielle e David Felipe, a minha mãe Ecilda Ferreira dos Santos pelo apoio para realização deste trabalho;

Aos meus amigos que torcerem e acreditaram em mim, em especial a Enedina Nogueira de Assunção, Adriana Dantas, Alessandra Karisa Costa Lima do Nascimento, Simone Maria Costa de Oliveira Moreira, Assislene Braga da Mota, e a todos os colegas desta Instituição que contribuíram no delinear do caminho e que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho;

À Escola Superior Batista do Amazonas pela compreensão na minha ausência, em especial ao Mantenedor Dr. Elizeu Lima, a Sandra Queiroz, Ana Amélia Guerra, aos Coordenadores especialmente a Lúcia Inês Freire, aos professores, administrativo, Christiany Nunes de Oliveira e as meninas do Laboratório multidisciplinar da ESBAM.

AGRADEÇO

*Tudo o que um sonho precisa para
ser realizado é alguém que acredite
que ele possa ser realizado.*

Roberto Shinyashiki

RESUMO

Os cupins são insetos eusociais da ordem Isoptera, mais conhecidos por sua importância econômica como pragas, causando prejuízos em áreas urbanas, campo, sobretudo em canaviais, áreas de pastagens e florestas. O controle biológico com fungos entomopatogênicos tem demonstrado ser uma opção viável, pois não compromete o manejo e nem apresenta efeitos deletérios sobre os animais, como pode ocorrer no uso de produtos químicos. Este trabalho teve como objetivo analisar quatro espécies de fungos biologicamente ativos contra o cupim *Nasutitermes corniger* e buscar novas fontes de produção dos inóculos, visando o desenvolvimento futuro de um produto para controle biológico de cupim no Amazonas. O bioensaio *in vitro*: conídios foram produzidos, quantificados e inoculados. Vários substratos foram testados para crescimento dos fungos (casca de coco, serragem clara, serragem escuro e resíduo de semente de maracujá) tendo como controle o arroz. Os resultados dos testes *in vitro* mostraram que os fungos apresentaram alta eficiência contra *Nasutitermes corniger*, destacando-se *I. javanica* que apresentou maior potencial para o controle biológico com 100% de mortalidade na concentração de 10^8 conídios/mL a partir do segundo dia. O maior índice médio de produção de conídios obtidos de cadáveres de *N. corniger* foram encontrados em *Penicillium* sp. e *I. javanica* na concentração 10^7 e 10^8 conídios/mL. Para a produção dos inóculos fúngicos nos substratos testados, os melhores resultados foram encontrados nos substratos de arroz e de resíduo de semente de maracujá para *Metarhizium anisopliae*, *Penicillium* sp. e *Isaria javanica* em cinco dias e em oito para *Beauveria bassiana* de cultivo em umidade relativa a 28 °C. Para testes em campo, o melhor resultado foi observado com o *Penicillium* sp., na concentração 10^8 conídios/mL .

Palavras-chaves: Controle biológico, térmitas e pragas

ABSTRACT

Termites are eusocial insects of the Isoptera order. They are best known for its economic importance as pests, causing damage in urban areas, countryside, especially in sugarcane fields, pastureland and forests. Biological control with entomopathogenic fungi have been shown to be a viable option not compromising the handler and does not have any harmful effects on animals, as may occur when chemicals is used. This work aimed to analyze four species of fungi biologically active against termite *Nasutitermes corniger* and seek new sources of inoculums production, seeking the development of a product for biological control of termites in the Amazonas State. The bioassay in vitro, conidia were produced, quantified and inoculated. Several substrates were tested for fungal growth (coconut shell, clear and dark sawdust and residue of passion fruit seed) with the control treatment using rice. The in vitro test results showed fungi high efficiency against *Nasutitermes corniger*, especially *Isaria javanica* with the highest potential for biological control with 100% mortality at a concentration of 10^8 conidia / mL from second day. The highest average production of conidia obtained from cadavers of *N. corniger* was found in *Penicillium* sp. and *I. javanica* at a concentration 10^7 and 10^8 conidia / mL. For the production of fungal inoculate on the tested substrates. The best results were found in substrates of rice and seed residue for *Metarhizium anisopliae*, *Penicillium* sp. and *I. javanica* in five, and eight days for *Beauveria bassiana* culture in humidity at 28 ° C. For field tests, the best result was observed over the *Penicillium* sp. at a concentration 10^8 conidia / mL.

Keywords: Biological control, termite and pest

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Rainha de <i>Nasutitermes</i> sp., evidenciando o abdome fisogástrico.....	21
Figura 2.	Ciclo de vida geral dos cupins. Mostrando todas as fases do ciclo de vida e reprodução, ovos, larvas, ninfa, operários, soldados, os reprodutivos, a rainha e o rei.....	22
Figura 3.	<i>Nasutitermes corniger</i> infestando pisos e paredes.....	26
Figura 4.	Potencial de interação e utilização dos fungos.....	28
Figura 5.	Coletas de cupim na mata do Setor Sul do Campus da UFAM. A - cupinzeiro localizado em árvore; B <i>Nasutitermes corniger</i>	45
Figura 6.	Infecção <i>in vitro</i> dos fungos. (A) placas contendo cupins, madeira para alimento e abrigo; (B) Pulverização das amostras e controle; (C) Amostras de material pulverizado nas concentrações $1,0 \times 10^8$ a $1,0 \times 10^4$ conídios/ mL mais controle; (D) Casa de vegetação onde as amostras permaneceram pelo período de cinco dias	47
Figura 7.	Substratos. (A) casca de coco, (B) arroz, (C) serragem clara, (D) serragem escura e (E) semente de maracujá	49
Figura 8.	Substratos tratados. (A) arroz, (B) casca de coco, (C) serragem clara, (D) serragem escura e (E) semente de maracujá	50
Figura 9.	Teste para a seleção dos melhores substratos para o crescimento fúngico, sendo que (A) casca de coco, (B) arroz, (C) serragem clara, (D) serragem escura e (E) semente de maracujá, todos com controle	52
Figura 10-	Ampolas de vidro de 13 mL contendo produto (substrato + fungo)	53
Figura 11.	Área de aplicação dos produtos em campo. Setor Sul do Campus da Universidade Federal do Amazonas	54
Figura 12.	Canal vertical no cupinzeiro para posterior aplicação do produto	55
Figura 13.	Cupins <i>Nasutitermes corniger</i> colonizado pelo fungo <i>Penicillium</i> sp. demonstrando aspecto pulverulento e de cor verde	64
	Aspectos das colônias reisoladas de cadáveres dos cupins <i>Nasutitermes corniger</i> . Conidióforos do <i>Penicillium</i> sp.(seta) (A-I) ; conídios de <i>Isaria</i>	66

- Figura 14. *javanica* (seta) (B-II); conídios de *Metarhizium anisopliae* (seta) (C -III) e Conidióforos e conídios e hifas septadas (seta a, b e c) de *Beauveria bassiana* (D-IV) (400 X)
- Figura 15. Produção de conídios de *Penicillium* sp., *Bauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria javanica*, em (A) arroz parboilizado e (B) resíduo de semente de maracujá na concentração 10^8 conídios/mL 67
- Figura 16. Substratos para o crescimento fúngico: (A) semente de maracujá; (B) arroz 67
- Figura 17. Desprendimento dos cupinzeiros de *Nasutitermes corniger* em árvores, tetos de edificações no Setor Sul do campus Universidade Federal do Amazonas aplicação da suspensão fúngica de *Penicillium* sp. na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL. (A) Caule da árvore após desprendimento do cupinzeiro (B) Teto do edifício após desprendimento do cupinzeiro (C) cupinzeiro recém caído da árvore (D) cupinzeiro desprendido do teto. 69
- Figura 18. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, da amplificação da região ITS do rDNA do isolado *Penicillium* sp. **Poço 1** – Marcador de peso molecular de 1 Kb da fermentas; **Poço 2** – Amostra 1 (*Penicillium* sp.); **Poço 3** - Amostra 2 (*Penicillium* sp.), **Poço 4** – controle negativo. 72
- Figura 19. Análise de qualidade via Phred, com a ferramenta PHPH disponível na pagina da UNB. 73
- Figura 20. Cupins utilizados para identificação pela chave taxonômica de Constantino (1999) com base nas características morfológicas 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Área tratada com fungos entomopatogênicos produzidos pelas quatro maiores empresas brasileiras do setor.	40
Tabela 2.	Alguns produtos à base de fungos comercializados no Brasil.....	41
Tabela 3.	Origem das espécies fúngicas utilizadas no trabalho.....	45
Tabela 4.	As 24 ampolas do produto fúngico para dois substratos.....	53
Tabela 5.	Esquema de aplicação dos produtos fúngicos nos cupinzeiros.....	55
Tabela 6.	Reagentes do sistema de Polymerase Chain Reaction- PCR com volumes e concentrações	58
Tabela 7.	Porcentagem média de mortalidade acumulada de <i>Nasutitermes corniger</i> em diferentes dias após a infecção por <i>Isaria javanica</i> , <i>Metharizium anisopliae</i> , <i>Beauveria bassiana</i> . <i>Penicillium</i> sp.	61
Tabela 8.	Comparação das médias da produção de conídios/mL em cadáveres de <i>Nasutitermes corniger</i>	63
Tabela 9.	Comparação de médias de produção de conídios/mL do primeiro ao quinto dia em substratos de arroz e resíduo de semente de maracujá.	68
Tabela 10.	Teste em campo- Infecção fúngica 10^8 conídios/mL mostrando a relação de volume dos cupinzeiros em litros (L) e a mortalidade em diferentes substratos de resíduo de semente de maracujá e arroz.	71
		73

SUMÁRIO

2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Os Cupins	17
2.1.1	Distribuição geográfica	18
2.1.2	Organização social	18
2.1.3	Alimentação	20
2.1.4	Biologia de cupins	20
2.1.5	Importância ecológica	22
2.1.6	Prejuízos econômicos e patrimoniais	23
2.1.7	Taxonomia dos cupins	24
2.1.8	Cupim arborícola	25
2.2	Fungos	27
2.2.1	Taxonomia geral dos fungos	28
2.2.2	Aspectos biológicos dos fungos	29
2.2.2.1	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	29
2.2.2.2	<i>Beauveria bassiana</i>	31
2.2.2.3	<i>Isaria javanica</i>	33
2.2.2.4	<i>Penicillium</i> sp.	34
2.2.3	Fungos como agentes de controle de pragas	35
2.2.3.1	Interação entre fungos entomopatogênicos e insetos	35
2.2.3.2	Fungos entomopatogênicos como agentes de controle de cupins	36
2.2.4	O controle de fungos entomopatogênicos e a interferência no comportamento social de cupins	7
2.3	Substratos como base nutricional de produtos fúngicos	39
2.3.1	Produtos registrados e comercializados no Brasil	40
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	Preparação dos meios de cultura e soluções	43
3.1.1	Meio "Batata Dextrose e Agar" (BDA), 39 g/l (Sigma)	43
3.1.2	Solução de tween 80	43
3.1.3	Solução de hipoclorito a 4%	43
3.1.4	Solução álcool 70%	43
3.1.5	Solução de Clorofil proporção 24:1	43
3.1.6	Tampões	44
3.2	Obtenção das espécies fúngicas	45
3.2.1	Conservação das linhagens fúngicas	45
3.2.2	Obtenção dos <i>Nasutitermes corniger</i>	45
3.3	Estratégias experimentais	46
3.3.1	Teste <i>in vitro</i>	46
3.3.1.1	Produção de conídios	46
3.3.1.2	Preparo das suspensões de conídios	46
3.3.1.3	Infecção " <i>in vitro</i> " de <i>Nasutitermes corniger</i>	46

3.3.1.4	Quantificação de conídios obtidos de cadáveres de <i>Nasutitermes corniger</i> ...	48
3.3.1.5	Reisolamento dos fungos obtidos de cadáveres de <i>Nasutitermes corniger</i>	48
3.3.1.6	Análise das microestruturas dos fungos <i>M. anisopliae</i> , <i>B. bassiana</i> , <i>I. javanica</i> e <i>Penicillium</i> sp.	48
3.4.	Seleção dos substratos	49
3.4.1	Origem dos resíduos	49
3.4.2	Pré-tratamento dos substratos	50
3.4.3	Preparo dos substratos para inoculação fúngica	51
3.4.3.1	Preparo da solução fúngica	51
3.4.3.2	Inoculação fúngica dos substratos	51
3.4.3.3	Quantificação dos conídios crescidos nos substratos	52
3.4.3.4	Preparação dos produtos e teste do período de prateleira	53
3.5	Teste em campo	54
3.5.1	Aplicação do produto no campo	54
3.5.2	Método de aplicação das suspensões fúngicas por cupinzeiro	56
3.5.3	Avaliação do tempo de mortalidade do cupinzeiro	56
3.6	Identificação fúngica	57
3.6.1	Identificação molecular	57
3.6.1.1	Cultivo monospórico	57
3.6.1.2	Extração de DNA	57
3.6.1.3	Preparação e purificação do produto de Polymerase Chain Reaction- PCR	58
3.6.1.4	Reação de seqüenciamento	59
3.6.2	Identificação taxonômica	59
3.6.2.1	<i>Penicillium</i> sp.	59
3.6.2.2	<i>Nasutitermes corniger</i>	59
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
4.1	Análise da infecção “in vitro”	60
	Análise da quantificação de conídios fúngicos obtidos de cadáveres de	
4.2	<i>Nasutitermes corniger</i>	63
4.3	Análise morfológica do reisolamento dos fungos obtidos de cadáveres de	
	<i>Nasutitermes corniger</i>	64
4.4	Análise do substrato para crescimento fúngico	67
4.5	Análise da produção de conídios fúngicos em substratos	68
4.6	Análises do teste em campo	69
4.7	Identificação molecular / taxonômica de <i>Penicillium</i> sp	72
4.8	Identificação Taxonômica	73
5	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

Os cupins ou térmitas são insetos eussociais pertencentes à Classe Insecta, Ordem Isoptera, e constituem um dos grupos de invertebrados dominantes em ambientes terrestres tropicais, distribuídos em 2.900 espécies descritas no mundo. No Brasil, registram-se cerca de 290 espécies distribuídas em 67 gêneros.

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. O real prejuízo causado em meio urbano por esses insetos ainda é desconhecido. Embora se estime que os gastos com tratamentos, reparos e substituições de peças atacadas por cupins alcance, na atualidade, valores da ordem de US\$ 5 a 10 bilhões anuais.

As espécies de cupins que causam danos às edificações em áreas urbanizadas incluem, principalmente, os cupins arbóreos, cupins subterrâneos e cupins de madeira seca. Os primeiros englobam os térmitas pertencentes à família Termitidae, e são conhecidos como cupins “superiores”, xilófagos e compreendem mais de 85% das espécies de cupins do mundo, economicamente importantes. O gênero *Nasutitermes* abrange o maior número de espécies-praga em vários Estados do Brasil, entre elas destaca-se a espécie *N. corniger* nativa causadora de grandes prejuízos financeiros devido ao seu potencial de infestação, hábito alimentar, destruindo diferentes tipos de materiais estruturais nas áreas urbanas em diversas cidades do país. Estas infestações embora sejam escassamente documentadas vêm causando perdas economicamente sensíveis e prejudicando o equilíbrio social.

Dentre os métodos de controles desta praga, o químico tem sido o mais empregado e difundido, 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. A racionalização no uso de inseticidas para o controle de cupins é fator preponderante para o equilíbrio ambiental, como também apresenta importância do ponto de vista econômico, visando à diminuição de custos. Nesta visão o controle microbiano prevê o uso racional de organismos vivos (fungos, bactérias, vírus, predadores e parasitóides), visando à redução das populações pragas, sem interferir na população de inimigos naturais e sendo empregado como alternativa para diminuir ou evitar a utilização de inseticidas químicos convencionais.

Entre os microrganismos entomopatogênicos, destacam-se os fungos como agente de controle biológico, por apresentarem vantagem como: capacidade de atacar os insetos em todos os estágios de desenvolvimento, capacidade de penetrar via tegumento e, normalmente, por estarem presentes como componentes naturais em muitos ecossistemas terrestres.

A utilização de fungos entomopatogênicos no controle biológico tem recebido contribuições crescentes da biotecnologia, inovações nas pesquisas para obtenção de produtos e processos que visam a diminuir os impactos negativos do uso de produtos nocivos ao ambiente e ao homem. Assim, os métodos eficazes para controle de cupim devem ser encontrados, preferencialmente que não sejam prejudiciais ao homem e ao meio ambiente. Portanto se faz necessário desenvolvimento de novos produtos com base em fungos entomopatogênicos para minimizar os problemas relacionados aos prejuízos envolvendo cupins. Este trabalho teve como objetivo geral analisar quatro espécies de fungos biologicamente ativos contra o cupim *N. corniger* e buscar novas fontes de produção dos inóculos, visando o desenvolvimento futuro de um produto para controle biológico de cupim no Amazonas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Os cupins

Os cupins ou térmitas são insetos eussociais pertencentes à Classe Insecta, Ordem Isoptera que vivem em colônias populosas representados por castas de indivíduos ápteros e alados. Eles existem na Terra há muito mais tempo que o próprio homem. Restos fossilizados destes insetos já foram encontrados em formações geológicas datadas de 55 milhões de anos. Existem mais de 2.900 espécies de cupins descritas no mundo. Registram-se no Brasil, cerca de 290 espécies distribuídas em 67 gêneros. Este número de espécies é seguramente subestimado, pois há muitas espécies novas para descrever além das já descritas (CONSTANTINO, 1999; GRIMALDI, 2005).

A ordem Isoptera, foi assim definida por Brullé em 1832 e a etimologia da palavra Isoptera vem do grego *isos* = igual, e *pteron* = asas, devido à forma, estrutura e nervação, muito semelhante dos dois pares de asas na quase totalidade desses insetos; são ovíparos, anfígono e paurometabólicos (MARANHÃO, 1978; RICHARDS e DAVIES, 1984; GALLO et al., 2002). Cupim é um nome empregado para se denominar tanto os insetos alados e ápteros quanto os ninhos. A palavra tem origem do tupi (*kupi'i*) e segundo Cunha (1989) existem variantes no termo, tais como *copi*, *copij* e *copim*, grafadas no curso da história literária do Brasil. Em português, os sinônimos de cupim (inseto) são térmite e térmita, substantivos masculinos e femininos originários do latim *termes*, que significa verme que rói madeira.

Como outros insetos sociais, os cupins apresentam polimorfismo e suas diferentes formas caracterizam as várias castas encontradas na sua sociedade. A base e sucesso do sistema social é a distribuição de funções entre as castas (FONTES, 1978). A organização social é bastante complexa e compreende grupos de indivíduos morfológica e etologicamente diferenciados. Na maioria das espécies pode haver as três castas básicas, que são os reprodutores, os operários e os soldados, todos diplóides, podendo os dois últimos pertencer a um ou outro sexo, ou até ambos

os sexos numa mesma colônia (GRASSÉ, 1982). Os reprodutores estão representados pela rainha e pelo rei, cuja função principal é a produção de ovos para suprir a demanda dos indivíduos na colônia. Nesta ordem de insetos, o rei constitui par permanente com a rainha, com a qual copula diversas vezes ao longo da vida, diferente do que ocorre em Hymenoptera, que copula uma só vez (WILSON, 1971).

2.1.1 Distribuição geográfica

A maioria das espécies de cupins vive nas regiões tropicais e subtropicais, com algumas poucas se estendendo até latitudes mais elevadas, raramente além de 40° norte ou sul (CONSTANTINO, 2005). É um dos grupos de invertebrados dominantes em ambientes terrestres tropicais e estão espalhados desde as florestas úmidas até as savanas, sendo encontrados até mesmo em regiões áridas (LEE e WOOD, 1971). A explicação para essa extraordinária abundância advém da existência da simbiose com microrganismos, além de uma organização social bastante desenvolvida (COSTA-LEONARDO, 2002).

Na América do Sul a ocorrência de cupins foram inicialmente relatadas por naturalistas europeus como o trabalho desenvolvido pelo entomólogo italiano Filippo Silvestre (1903) em Mato Grosso, Argentina e Paraguai, pelo sueco Nils Holmgren (1906) que publicou sobre os cupins que estudou na Bolívia e Peru. O trabalho do norte-americano Alfred E. Emerson (1975) sobre os cupins da Guiana é considerado um clássico, e incluiu a descrição de muitos gêneros e espécies que ocorrem no Brasil. Os cupins coletados pela expedição Mulford (Peru, Bolívia e Brasil) foram estudados por outro termitólogo norte-americano, Thomas E. Snyder (1926). O trabalho conduzido pelo brasileiro Renato L. Araújo do início da década de 1950 até o final da década de 1970 foi importante por ter sido o primeiro desenvolvido por cientista nativo da região, e resultou na importante coleção hoje depositada no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo e vários trabalhos publicados, inclusive um catálogo (ARAUJO, 1970).

Embora nas últimas duas décadas os números de termitólogos nativos da região Neotropical tenham aumentado, principalmente no Brasil, e o conhecimento sobre esse importante grupo de insetos tem avançado mais rapidamente, no entanto, estudos sobre cupins urbanos estão restritos a poucos locais, como na cidade de São Paulo, SP (FONTES, 1995; LELIS, 1995; FONTES e MILANO, 2002), Belém, PA (BANDEIRA, 1998), João Pessoa, PB (BANDEIRA et al., 1998), Recife, PE (OLIVEIRA et al., 2006), Paulista, PE (MATIAS et al.,

2006), Piracicaba, SP (ELEOTÉRIO, 2000) e Brasília, DF (CONSTANTINO e DIANESE, 2001).

2.1.2 Organização social

Os cupins, assim como as formigas, são insetos sociais, havendo completa interdependência entre os indivíduos. Vivem em colônias organizadas em castas: um par real (rei e rainha) que são os reprodutores (férteis), os operários e os soldados (estéreis) (GRIMALDI, 2005).

Em uma colônia também se encontram alados, ovos e jovens. Soldados e operários são designados castas neutras por serem estéreis, porém preservam o sexo genético, bem como os resquícios do aparelho genital e das gônadas, correspondentes ao respectivo sexo. É importante ressaltar que os indivíduos de cada casta – os reprodutores, os operários e os soldados – têm morfologia e funções muito diferentes (ROISIN, 2000).

Os operários são bastante uniformes dentro de cada grupo e geralmente constituem a casta mais numerosa. São os indivíduos encarregados da construção e da manutenção do ninho e das galerias ou túneis de forrageamento. Além disto, coletam o alimento e alimentam os indivíduos de outras castas e cuidam dos ovos, dos jovens e do par real. Os soldados são estéreis e cegos, são indivíduos cuja única função é realizar a proteção do ninho e de todos os demais membros da colônia. Enquanto os reprodutores são representados pelo rei e rainha e são os únicos que se reproduzem na colônia (COSTA-LEONARDO, 2002).

As comunidades de cupins vivem em estruturas especiais denominadas de “ninhos”. O conjunto, comunidade e ninho constituem a colônia. O ninho é a estrutura que oferece moradia e segurança contra inimigos e contra as adversidades do meio ambiente. São constituídos pelos operários que utilizam diversos materiais, como madeira, barro, partículas do solo, ou fezes. Ele preserva as condições microclimáticas (especialmente temperatura e umidade) adequadas à vida saudável de todos os indivíduos da colônia. Nele abrigam-se os reprodutores e os imaturos em várias fases de desenvolvimento que não estão envolvidos em atividade externa de forrageamento (procura e coleta de alimento) (COSTA LIMA, 1938).

Os ninhos variam enormemente em complexidade arquitetural, dependendo da espécie considerada. Pode ser representado por simples conjunto de túneis difusos pelo solo e sem

padrão arquitetônico bem definido, até uma construção muito elaborada, de padrão bem definido e de grande beleza plástica. Alguns ninhos podem atingir grandes dimensões, seja em altura, seja em diâmetro. Localizam-se no solo (subterrâneo), em árvores, mourões, bem como nas residências em diferentes locais (GRASSÉ, 1982).

Os ninhos formados pelas espécies do gênero *Nasutitermes* podem ser construídos dentro de estruturas, às vezes nos pavimentos aéreos. Estas espécies são comumente de fauna nativa e infestam áreas urbanas previamente não infestadas (TORALES e ARMÚA, 1986).

2.1.3 Alimentação

A alimentação dos cupins é constituída basicamente de materiais de origem vegetal (celulose): madeira viva, madeira morta em decomposição, herbáceas e gramíneas vivas, detritos vegetais, húmus e solo com vários teores de matéria orgânica, além de fezes (principalmente de herbívoros) e eventualmente partes vegetais vivas, lenhosas ou não (raízes, tubérculos, colmos, frutos, inflorescências). Assim, os cupins classificam-se como herbívoros e decompositores. Os cupins urbanos podem atacar materiais de natureza bastante diversa como: gesso, plástico, couros, tijolos, argamassa e mantas impermeabilizantes. Porém, os cupins não se alimentam desses materiais, apenas atacam podendo ou não ingerí-los (MILANO e FONTES, 2002b).

Apenas a madeira e produtos com celulose são alimentos, os outros não celulósicos são eliminados sem serem digeridos. Cabe aos operários buscar, preparar e distribuir os alimentos boca a boca (trofalaxia) para os indivíduos da colônia, resultando em um dos principais fatores para a manutenção da organização social (ALVES et al., 1998).

2.1.4 Biologia de cupins

A colônia dos cupins é constituída por formas de reprodução, operárias estéreis, soldados e indivíduos imaturos. As reprodutivas são de dois tipos: primárias e suplementares. Os reprodutivos primários, o rei e rainha são pigmentados e totalmente desenvolvidos como adultos alados. Sua função é a produção de ovos e de distribuição por colonização aérea. A rainha põe cerca de três mil ovos por dia através do seu abdome e vivem em média 25 anos (figura 2). Os ovos são branco-amarelados e eclodem após 50-60 dias de incubação (CONSTANTINO, 2002b).

A colônia alcança seu tamanho máximo em cerca de quatro a cinco anos e pode incluir 60 a 200 mil trabalhadores. Na maioria das colônias, há cerca de um par de reprodutores

primários, mas quando eles morrem, geralmente são substituídos por numerosos suplementares reprodutivos, que podem ser ou não aladas e ligeiramente maiores e mais pigmentadas do que os operários. A casta estéril, os operários e os soldados, não têm asas e geralmente também não tem olhos. Os operários e soldados cupins tem aproximadamente 6 mm de comprimento e são na cor creme clara, no entanto, as cabeças dos soldados são muito largas (quase a metade do comprimento do corpo deles) com notáveis mandíbulas pretas. Os operários constroem galerias como se fossem tubos de abrigos bem distintos e transportam alimentos para os membros jovens e outros da colônia (ANDERSON, 1984; FONTES, 1978).

Os soldados cupins são responsáveis por guardar a colônia e os seus ocupantes. Cupins tratam-se continuamente uns aos outros para obter certas secreções, essas secreções ajudam na regulação do número de indivíduos em diversas castas. Os operários amadurecem em um ano e vivem em média de três a cinco anos. Os soldados também se tornam maduros dentro de um ano e vivem até cinco anos. Os reprodutores alados emergem em um vôo nupcial em massa nos meses de abril e maio. Estes vôos são freqüentemente a primeira indicação das infestações de cupins. Depois de um breve vôo, os alados perdem as asas. A fêmea pesquisa imediatamente local para fazer ninho e o macho segue logo atrás. Quando a dupla encontra uma fenda úmida com material de madeira, formam a câmara real e imediatamente inicia a postura, o abdome da rainha sofre uma hipertrofia, chamado de “fisogastria”, pois todos os ovos em desenvolvimento ficam em seu interior, aumentando de tamanho à medida que a fêmea aumenta sua capacidade de oviposição com o passar dos meses, podendo o abdome assim alcançar vários centímetros de comprimento como mostra a figura 1 (SU et al., 2000).



Figura 1- Rainha de *Nasutitermes* sp., evidenciando o abdome fisogástrico

Fonte: <http://www.scienceimage.csiro.au/index.cfm?event=site.image.detail&id=1865>

O macho permanece junto à fêmea, que necessita ser fecundada periodicamente. Dependendo da espécie de cupim, o casal real pode transitar livremente no ninho ou permanece confinado em uma câmara real, de onde jamais sairão. A partir daí, se desenvolvem os novos cupins, apresentando metamorfose incompleta. Embora cada espécie possua características de desenvolvimento diferentes, basicamente podemos resumir o ciclo de vida destes insetos nas seguintes fases: ovos, formas jovens (ou ninfas), adultos (figura 2) (SU et al., 2000).

As ninfas se diferenciam em operários, soldados e em ninfas aladas que são os adultos férteis. Os ninhos podem apresentar ainda reprodutores secundários ou reprodutores de substituição, indivíduos com a função de substituir o casal real no caso de algum deles adoecer ou morrer, ou até mesmo complementar a postura de ovos na colônia. Os reprodutores secundários são produzidos em colônias mais maduras e, como não têm a necessidade de sair da colônia, eles nunca desenvolveram asas. É importante frisar que podem ocorrer muitas variações nesses passos de acordo com a espécie, mas este é o padrão mais geral (SU et al., 2000).

Figura 1- Rainha de *Nasutitermes* sp., evidenciando o abdome fisogástrico.

Fonte: www.chem.unep.ch/pops/termite/pics/pics.htm

Fonte: Chemone (2010).

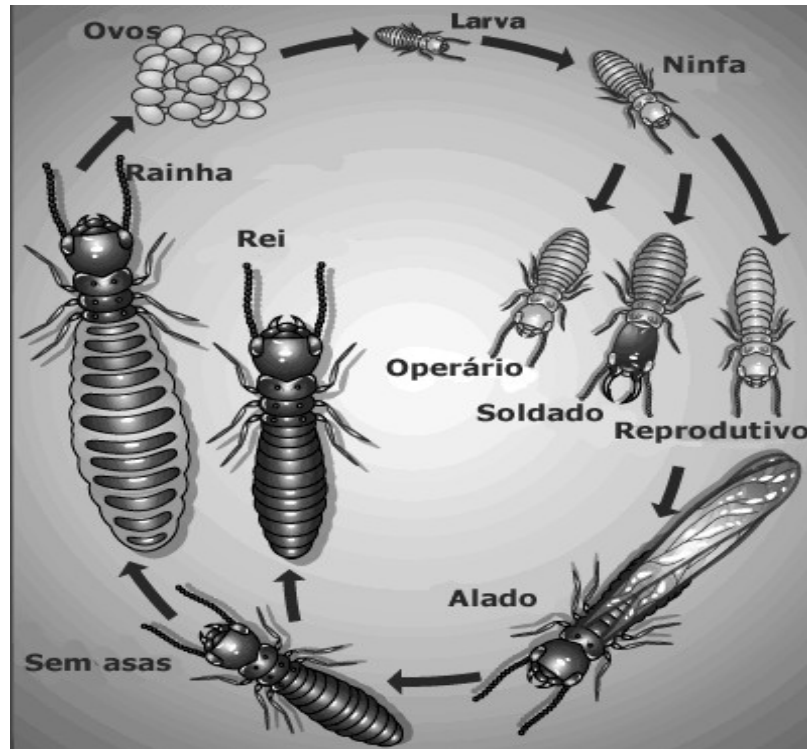


Figura 2 - Ciclo de vida geral dos cupins. Mostrando todas as fases do ciclo de vida e reprodução, ovos, larvas, ninfa, operários, soldados, os reprodutivos, a rainha e o rei
 Fonte: <http://www.insetotec.com.br>

2.1.5 Importância ecológica

A importância ecológica dos cupins em ecossistemas tropicais é alta, principalmente quando consideradas as modificações que podem causar no ambiente, desde alterações de paisagem até modificações nas propriedades físicas e químicas do solo, efeitos no processo de decomposição, ciclagem de nutrientes, entre outros (LEE e WOOD, 1971).

Embora os cupins sejam aceitos como agentes decompositores, por acelerarem o retorno dos componentes de materiais lenhosos à dinâmica da ciclagem orgânica ambiental, esse, possivelmente, nem é o papel mais importante do inseto. O cupim também é fundamental na formação dos solos tropicais, na manutenção da vitalidade do solo, na regeneração do solo degradado e compactado dos cultivos, pastagens e jardins urbanos, na composição e metamorfose de microambientes, na cadeia alimentar de variada cópia de espécies animais, na

composição de microambientes necessários a inúmeros animais, entre outros ofícios que desempenham de grande relevância (HEADRICK e GOEDEN, 2001; FONTES, 2002).

Além disso, mantêm também, complexas relações ecológicas (competição, simbiose, parasitismo, comensalismo) com diversas espécies de organismos. Mas tornaram-se pragas econômicas quando começaram a destruir a madeira e produtos de madeira de recursos humanos: casas, materiais de construção, florestas e outros produtos comerciais (FONTES, 2002; ANDERSON, 2009).

2.1.6 Prejuízos econômicos e patrimoniais

Os problemas com cupins vêm crescendo e causando prejuízos econômicos, sentimentais e patrimoniais cada vez maiores em diversas áreas urbanas no Brasil e do mundo (FONTES, 2002). Provavelmente o impacto ambiental provocado pelo processo de urbanização desenfreado e conseqüente diminuição dos alimentos naturais, os cupins são encontrados em construções e residências, buscando os elementos indispensáveis à sua manutenção, tais como espaço e alimentação (ALVES e BERTI-FILHO, 1995). Além disso, restos de madeiras, geralmente sobras das construções, são enterrados durante a obra, o que ajuda na proliferação desses insetos (LELIS, 1994).

Os cupins ao se alimentarem, atacam e destroem diferentes tipos de materiais e estruturas presentes nas áreas urbanas como, por exemplo: vigas, caibros, ripas, forros, pisos, rodapés, portais, móveis, instrumentos musicais, livros, obras de arte, postes, mourões, cercas, dormentes. Embora, os cupins sejam excelentes decompositores de madeira morta e outras fontes de celulose, eles se tornam um grave problema quando atacam residências e lavouras. Edwards e Mil (1986) afirmaram que infestações por cupins em edificações podem ocorrer de várias formas, as mais comuns são: revoadas: tanto os cupins subterrâneos como os de madeira seca; madeiras infestadas: cupins de madeira seca; frestas e rachaduras nas edificações: cupins subterrâneos e árvores infestadas ou cortadas.

Estima-se que nas áreas urbanas mundiais os gastos com tratamentos, reparos e substituições de peças atacadas por cupins alcance, valores da ordem de US\$ 5 a 10 bilhões anuais. No Brasil os estudos dos danos causados por cupins em áreas urbanas ainda são incipientes. No Estado de São Paulo, calcula-se que somente para a cidade de São Paulo, as perdas podem atingir cerca de US\$ 10 a 20 milhões anuais. Alguns fatores como a densidade

populacional desses insetos nas áreas naturais vizinhas à áreas urbanas, o tipo de solo e vegetação desses locais, além do material usado nas construções parecem influenciar a adaptação das espécies ao meio urbano (FONTES e ARAÚJO, 1999). Cerca de 80 espécies de cupins no Brasil já foram assinaladas como pragas de zonas rurais e urbanas dentre estas espécies causadoras dos maiores estragos de madeira estrutural, agricultura e de florestas, estão as dos gêneros *Coptotermes gestroi*, *Heterotermes tenuis*, *H. assu*, *H. longiceps* (cupins de solo), *Cryptotermes brevis*, *C. havilandi* (cupins de madeira seca) e *N. corniger* (cupim arbóreo) (FONTES, 2002). Infestações causadas por espécies do gênero *Nasutitermes* são comuns nas áreas urbanas sul-americanas, mas escassamente documentadas. Diversas espécies estão envolvidas, conforme a região geográfica (BANDEIRAS et al., 1998). Embora algumas espécies sejam claramente oportunistas e infestem construções ou utensílios mal preservados, um pequeno número de espécies é praga efetiva, podendo causar perdas economicamente sensíveis e prejudicar o equilíbrio social (BANDEIRAS et al., 1989). Paiva (1998) relatou que espécies *N. corniger* considerada como praga pode atuar também como praga oportunista atacando madeira estrutural, sob circunstâncias favoráveis. Isto pode acontecer com frequência em edificações rurais e em casa de fazenda, tombadas por seu valor histórico. Segundo Fontes (1998) em suas pesquisas alegou que a arborização urbana "constitui reservatório do cupim, dificulta o controle em edificações próximas e favorece re-infestação de áreas tratadas".

O controle dos cupins se tornou mais difícil com a proibição do uso de produtos clorados (Portaria nº 329 de 02/09/85, do Ministério da Agricultura) devido ao alto poder residual e danos ao meio ambiente. Os efeitos deletérios decorrentes do uso indiscriminado e incorreto desses inseticidas químicos no controle aos cupins levam pesquisadores a esforços de concentrarem na busca de novos métodos alternativos, como controle biológico por fungos entomopatogênico no sentido de preservar o meio ambiente (ALBUQUERQUE, 2005).

2.1.7 Taxonomia dos cupins

Os cupins são insetos hemimetábolos, com metamorfose gradual, e aparelho bucal mastigador; são ortopteróides e formam um grupo monofilético com as baratas e louva-deuses, os Dictyoptera são iguais ao Blattaria, Isoptera e Mantodea. Muito vem sendo discutido a respeito das relações internas dentro de Dictyoptera, inclusive, se a ordem Isoptera deve ou não continuar sendo utilizada, já que um gênero de baratas que vivem em madeira (*Cryptocercus*) é

filogeneticamente mais próximo dos cupins do que das demais baratas. Desta forma as baratas seriam um grupo parafilético, mas também se poderiam considerar os cupins como uma família (Termitidae) dentro de Blattaria: Blattaria iguais a outras Baratas + (Cryptocercus + Termitidae) (EGGLETON et al., 2007).

A classificação mais aceita divide a ordem Isoptera em sete famílias: Mastotermitidae, Hodotermitidae, Termopsidae, Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae e Termitidae (COSTA-LEONARDO, 2002). As seis primeiras são os chamados cupins “inferiores” (que apresentam protozoários simbiotes para produção da celulase, como a triconinfa ou a (*Mixotricha paradoxa*) e a família Termitidae, que inclui mais de 85% das espécies de cupins do mundo, são os chamados cupins “superiores” (que possuem bactérias para produzirem a sua própria celulase).

Apenas cinco das sete famílias de térmitas existentes no mundo ocorrem na América do Sul, e destas, apenas três (Kalotermitidae, Rhinotermitidae e Termitidae) são economicamente importantes. Dentre as famílias as quatro famílias que ocorrem no Brasil, Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae e Termitidae distribuem se aproximadamente 300 espécies (MARTIUS, 1998).

Aqueles cupins que são capazes de viver em madeira seca sem contato com o solo e nunca constroem ninhos se encontram na família Kalotermitidae. Novas evidências indicam que *Glossotermes oculatus*, espécie da Amazônia previamente incluída na família Kalotermitidae.

Porém esta família Rhinotermitidae é dita subterrânea em sua maioria se alimentam de madeira, alguns deles são classificados como pragas.

Recentemente a família Serritermitidae continha *Serritermes serrifer* como única espécie de ocorrência no Brasil (CONSTANTINO, 1999).

A família Termitidae apresenta os ninhos mais elaborados e complexos entre os cupins, alimentam-se de húmus, serrapilheira, grama, esterco e/ou fungos (COSTA-LEONARDO et al., 1999).

2.1.8 Cupim arborícola

A grande maioria das espécies pertencentes ao gênero *Nasutitermes* é endêmica, principalmente na região neotropical. Na América do Sul estas espécies ocorrem nidificado em qualquer tipo de formação vegetal (matas, florestas, caatingas, parques, etc.). Muitas constroem

ninhos arbóreos, que estão sempre em comunicação com o solo, por meio de túneis que descem pelo tronco da árvore onde seu ninho foi construído (CONSTANTINO, 1999; FONTES, 2002).

No Panamá, bem como em nosso país, algumas espécies de *Nasutitermes* têm a tendência de construir ninhos vulgarmente denominados *cabeça de nego* em galhos de árvores, indicando ser este o principal local de formação da colônia, ainda que o casal real inicialmente nidifique no solo; mais tarde a colônia acaba transferindo-se para locais acima do nível do mesmo. Sabe-se pouco a respeito do comportamento e biologia das espécies pertencentes a este gênero (CONSTANTINO, 2002b).

As infestações causadas por *N. coniger* são aparentes, porque túneis são comumente construídos com material cartonado escuro e são bem visíveis em superfícies expostas de paredes, tetos e pisos figura 3.



Figura 3 - *Nasutitermes corniger* infestando pisos e paredes
Foto: Oliveira, G. (2010)

Esse fato pode resultar em grande alarme dos proprietários ou moradores e resultar em falso diagnóstico de infestação intensa, quando avaliada por profissionais de controle de praga menos experientes (MENEZES et al., 2000).

A presença de túneis escuros (figura 3) é comumente um indicativo da infestação por *Nasutitermes*. As marcas fecais das trilhas termíticas, bem como os resíduos dos túneis removidos das paredes, também são tipicamente de cor escuras. Em casos de construções pesadamente infestadas, massas de cartonados escuros freqüentemente cobrem as superfícies expostas das peças de madeiras. Estas infestações podem disseminar nas edificações pelo solo sob o piso e entorno das paredes, por dentro e no trajeto de conduites elétricos e telefônicos, no trajeto de tubulações hidráulicas de água e de gás, e permeando fissuras e pequenos espaços dentro de paredes e pisos.

Dois padrões de infestações podem ser reconhecidos, conforme o hábito de nidificação. O padrão exógeno é considerado uma infestação comum, característico pela presença de ninhos visíveis em postes, cercas, vigas de telhados, árvores e outros suportes de madeiras ou de alvenarias. Em edificações, ninhos são comumente encontrados em telhados, paredes e muros. Este padrão está associado às infestações de árvores urbanas na América do Sul, cujos troncos e ramos albergam ninhos arborícolas típicos de *Nasutitermes* (TORALES e ARMÚA, 1986).

O padrão endógeno caracteriza-se pela presença de túneis típicos de *Nasutitermes*, mas não são visíveis em locais expostos. Embora os ninhos sejam similares ao descritos no padrão exógeno os mesmos são construídos em locais ocultos no interior de edificações, sempre protegidos da luz solar direta. São encontrados em paredes, colunas internas, corredores, porões, dentro de diversos vãos estruturais, forros e em cavidades sobre o piso. Além disso, em árvores infestadas, os ninhos são construídos no interior do tronco e raízes e não estão expostos como ninhos arborícolas típicos (MILANO e FONTES, 2002b).

2.2 Fungos

Os fungos são seres eucarióticos altamente eficientes na degradação de uma ampla gama de substratos, podendo apresentar-se em forma de leveduras, pseudomicélio ou constituir hifas, que podem agrupar-se ou justapor-se, porém nunca formando um tecido verdadeiro. Estima-se que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, sendo que destas apenas foram descritas cerca de 90 mil espécies (HAWKSWORTH e ROSSMAN, 1997).

Excluindo-se os insetos, os fungos constituem os mais números seres vivos existentes. São conhecidos como bolores, mofos ou cogumelos comestíveis ou alucinógenos e são

responsáveis pela produção de importantes ácidos orgânicos, como ácidos cítricos, pela produção de fármacos, como alguns antibióticos, pela produção de enzimas de interesse industrial, e de elevado valor econômico, destacando-se as celulases, lactases, xilanases, pectinases e amilases, pelo controle biológico de insetos-pragas da agricultura, pelo controle de inúmeras doenças que atacam plantas cultivadas e pela produção de etanol (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010).

Os fungos são os agentes mais importantes de degradação na Terra. O potencial de interação e utilização fungos-organismos está sumarizado na figura 4.

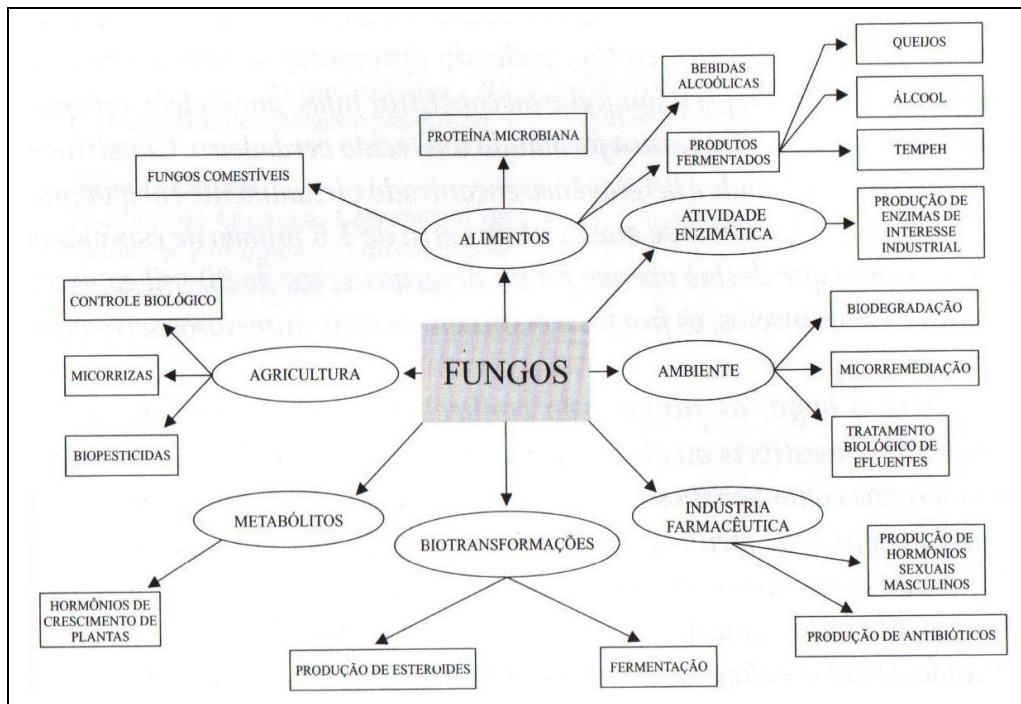


Figura 4 - Potencial de interação e utilização dos fungos
 Fonte: Esposito e Azevedo (2010)

2.2.1 Taxonomia geral dos fungos

Estima-se que o número de espécies de fungos no planeta Terra é de 1,5 milhões, mas o número de espécies descritas até hoje é de aproximadamente 90 mil (HAWKSWORTH e ROSSMAN, 1997). É, portanto, evidente que esses números refletem o grande potencial de exploração da biodiversidade fúngica conhecida e desconhecida. A grande dificuldade na identificação/classificação de fungos está associada ao fato de que a taxonomia deste grupo envolve classificações de *taxa* baseados em aspectos morfológicos, os quais são aplicados à chaves de classificação (BARNETT e HUNTER, 1972). Em muitos casos, os taxonomistas têm dificuldades para determinar quais são as características que realmente definem uma espécie ou gênero (GUARRO et al., 1999). Além disso, fases sexuadas (teleomórficas) e assexuadas (anamórficas) de um mesmo genótipo são classificadas com espécies distintas, e apresentam capacidades distintas de compartilhar material genético, resultando em dificuldade na distinção dos indivíduos (CARLILE e WATKINSON, 1994).

A identificação clássica de fungos filamentosos leva em consideração, principalmente, as características morfológicas das estruturas reprodutivas (sexual e assexual). Dessa forma, para se identificar estas estruturas, os isolados devem ser cultivados a partir de colônias puras em meios de cultura apropriados e corada com técnicas apropriadas para manutenção das estruturas. Em muitos casos, pode não ocorrer a produção de estruturas reprodutivas, sendo necessário assim alterar as condições de cultivo. Para induzir a esporulação pode ser utilizado meio de cultura pobre (ágar-água), aumento da iluminação da cultura, irradiação com doses reduzidas de luz ultravioleta. Fatos estes possíveis somente para espécies/isolados cultiváveis. Em todos os casos deve se realizar uma preparação para observação microscópica das estruturas. As estruturas observadas devem ser comparadas com aquelas da literatura padrão, por meio de chaves de identificação (BARNETT e HUNTER, 1972). Análises bioquímicas também podem ser utilizadas. Para fungos que não esporulam em meio sintético, técnicas de biologia molecular devem ser utilizadas para o entendimento das relações filogenéticas entre as diferentes espécies de fungos, bem como contribuir para uma melhor classificação das novas espécies que poderiam ser catalogadas em projetos de análise da biodiversidade.

2.2.2 Taxonomia e aspectos biológicos dos fungos

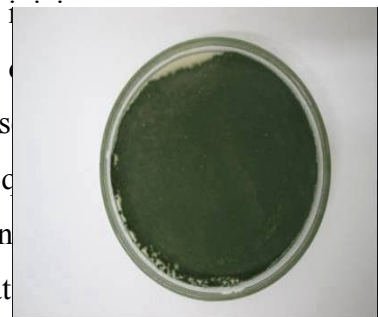
2.2.2.1 *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

Os primeiros testes com fungos entomopatogênicos foram realizados pelo zoologista e patologista russo Metschnikoff no final do século XIX, o qual utilizou *M. anisopliae* para o controle das larvas do besouro *Anisoplia austriaca*, tendo o fungo recebido o nome de *Entomophthora anisopliae*. Em 1883, Sorokin o transferiu para o gênero *Metarhizium*, permanecendo até os dias atuais *M. anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. (KENDRIK, 1971; LUNA-ALVES LIMA, 1985; FARIA e MAGALHÃES, 2001).

O gênero *Metarhizium* inclui duas espécies: *M. anisopliae* e *M. flavoviride*. A espécie *M. anisopliae* apresenta duas variedades, as quais foram separadas pelo tamanho dos conídios: *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresenta conídios curtos medindo de 3 a 9 µm (normalmente entre 5 e 8 µm) e *M. anisopliae* var. *majus* que apresenta conídios mais longos, medindo de 9,1 a 18 µm (geralmente 10 - 14 µm) (TULLOCH, 1976). Os avanços das técnicas enzimáticas e da biologia molecular possibilitaram o estudo das características bioquímicas e moleculares, para auxiliar na taxonomia (DRIVER et al., 2000; ALBUQUERQUE et al., 2005).

A espécie *M. flavoviride* foi descrita pela primeira vez por Gams e Rozsypal (1973), tendo sido isolado de larvas e pupas de curculionídeos, *Ceuthorhynchus maculata-alba* e *C. albovittatus* e de solos cultivados na Europa; possui conídios tipicamente elipsóides (9 -11 x 4,5 - 5,5 µm), hialinos e colônias de coloração verde oliva. Rombach et al. (1986), ainda com base nos estudos morfológicos, consideraram a espécie *M. flavoviride* e descreveram duas variedades: *M. flavoviride* var. *flavoviride*, de conídios maiores 7 - 9 (- 11) x 4,5 - 5,5 µm e *M. flavoviride* var. *minus*, de conídios menores (4,6 ± 0,7 x 2,7 ± 0,3).

O ciclo biológico dos fungos entomopatogênicos, inclusive *M. anisopliae* apresenta duas fases: uma sapróbia e outra parasitária. Na fase sapróbia, o ciclo pode se iniciar com a germinação de conídios, os quais emitem um ou mais tubos germinativos, que se ramificam em hifas, que se conduzem num intrincado sistema de entrelaçamento, constituindo-se em uma rede onde surgem os conidióforos. Na extremidade destes, diferenciam-se as fiáldes, que no ápice, conídios (RIBEIRO, 1990; RIBEIRO et al., 1992). Esses conídios germinam e formam apressórios os quais penetram no hospedeiro por ação mecânica e enzimática. Na fase parasitária, os conídios no interior do inseto se diferenciam em estruturas leveduriformes, as quais secretam toxinas que invadem os tecidos do inseto. Após a morte dos insetos as hifas



emergem formando conidióforos e conídios, que se dispersam e reiniciam o ciclo, fora do inseto (LUNA-ALVES LIMA, 1989; LUNA-ALVES LIMA; TIGANO, 1989).

Driver et al. (2000) reavaliaram a taxonomia de *Metarhizium* com base em dados moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e análise de ITS (Internal Transcribed Space) e descreveram dez classes para o grupo. Todavia consideraram na classe 5 *M. flavoviride* var. *flavoviride* e na classe 7 colocaram *M. anisopliae* var. *acridum*, onde enquadraram nessa variedade a espécie *M. flavoviride* var. *flavoviride* isolada de Acrididae.

Com relação à ação entomopatogênica, *Metarhizium* é capaz de infectar e matar mais de 300 espécies de artrópodes pertencentes a mais de 50 famílias de insetos e ácaros. *M. anisopliae* vem sendo utilizado no controle biológico de insetos-pragas na agricultura. No Brasil, tem sido extensivamente aplicado no controle de cigarrinha da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*) da broca da cana-de-açúcar (*Diatrea saccharalis*) da broca do café (*Diploschema rotundicollee*) e das cigarrinhas das pastagens (*Deois flavopicta* e *Zulia entreriana*). Atualmente, vários estudos têm sido realizados para avaliar sua eficácia no controle de artrópodes de doenças humanas e no controle de outras pragas da agricultura (SUN et al., 2002; BARROS et al., 2010).

De acordo com Barros et al., (2010) o processo de infecção de *Metarhizium* é o mais estudado entre os fungos entomopatogênicos sendo multifatorial dependente de características ambientais, da topografia e da composição da epicutícula do hospedeiro e da infecção de enzimas hidrolíticas e toxinas .

A capacidade de *M. anisopliae* em infectar diferentes tipos de hospedeiros decorre de um programa de expressão gênica próprio para a infecção de um determinado tipo de hospedeiro. Aparentemente, a topografia da superfície do hospedeiro ou os compostos químicos presentes permitem ou não a germinação. Após a morte do hospedeiro, o fungo se desenvolve saprofiticamente e produz uma grande quantidade de metabólitos secundários que podem auxiliá-lo na exclusão de microrganismos competidores pelos nutrientes do cadáver. Quando as fontes de nutrientes são exauridas, as hifas emergem através do tegumento (extrusão) para a superfície externa do hospedeiro ocorrendo, então, a esporulação do fungo e a liberação dos conídios (BUTT et al., 2001).

Balachander et al., (2010) ao analisarem a infectividade de *Metarhizium* contra o térmita arbóreo *Odontotermes* sp. em condições de laboratório, observou que todos os 23 isolados testados foram patogênicos para *Odontotermes* sp. na concentração 10^7 conídios/mL com

significativa mortalidade de a 100 %. Esse estudo também identificou isolados virulentos de *M. anisopliae*, o qual mostrou potencial para o desenvolvimento de micotermiticidas contra *Odontotermes* sp.

Sun et al., (2002) quantificaram a esporulação de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre operários de *C. formosanus*. Os autores classificaram os fungos em dois grupos distintos: os isolados de *B. bassiana* foram incluídos no grupo com alta esporulação total (11 dias) e baixa velocidade de esporulação (dois e três dias), enquanto os isolados de *M. anisopliae* formaram outro grupo, por apresentar alta velocidade de esporulação e baixa esporulação total. Essas características podem dar vantagem a *M. anisopliae* sobre *B. bassiana* no controle de cupins, devido ao comportamento social de defesa desses insetos. Ainda, a produção de conídios foi significativamente maior *in vitro* do que *in vivo* e mostrou correlação positiva, permitindo testes preliminares *in vitro* de muitos isolados, para se obter maior esporulação *in vivo*.

2.2.2.2 *Beauveria bassiana*

A espécie *B. bassiana* é entomopatogênica, apresenta ocorrência cosmopolita, sendo a mais freqüente sobre insetos e amostras de solo (ALVES, 1998). Foi estudada primeiramente pelo pesquisador italiano Agostino Bassi no início do século XIX. Contemporâneo dos trabalhos de Bassi, o pesquisador Giuseppe Balsamo Crevelli, na Itália, numa primeira publicação denominou o fungo de *Botrytis paradoxa*, e posteriormente, de *Botrytis bassiana*, em homenagem a Bassi. Em 1912 Vuillemin estudou o fungo e denominou *Beauveria bassiana*, em homenagem à Bassi, permanecendo até os dias atuais (BENHAM e MIRANDA, 1953; MACLEOD, 1954; SIDRIM e ROCHA, 2004).

O fungo apresenta as seguintes características: colônia de cor branca, filamento micelial cilíndrico, 3,5 µm de diâmetro, hialino, septado, conidióforos simples ou ramificados, ovóides, célula conidiogênica em forma de garrafa com terminação em zigue-zague, medindo de 1,5 a 5 µm e conídios globosos (0,5 a 1 µm) (MACLEOD, 1954).

O ciclo biológico se inicia com a penetração tegumentar que ocorre devido à ação mecânica e enzimática, o que leva aproximadamente 12 horas. A germinação dos conídios pode ocorrer em qualquer parte da cutícula do inseto, 16 a 18 horas após a infecção; o tubo germinativo penetra através da cutícula, atinge a hemolinfa e diferencia-se em estruturas

leveduriformes, ocasionando a morte do inseto; depois o micélio se exterioriza formando os conidióforos e os conídios (ATHAYDE, 2002; OLIVEIRA et al., 2003; WRAIGHT et al., 2010).

No Brasil, este fungo é utilizado para o controle de diversos insetos-praga, como o ácaro rajado (*Tetranychus urticae*), cochonilhas (*Dactylopius coccus*), cupins (*Coptotermes* sp.), mosca branca (*Bemisia tabaci*) (FARIA e MAGALHÃES, 2001), ácaro da falsa ferrugem (*Phylocoptruta oleivora*), broca-do-rizoma (*Cosmopolites sordidus*) (EMBRAPA, 2011), broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) (OLIVEIRA, 2006), *Boophilus microplus* (SILVA e BITTENCOURT, 2006) e *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (ROHDE et al., 2006).

Estudos da biologia e caracterização morfológica de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, para o manejo do percevejo *Lygus lineolaris* por Palisot de Beauvois (1818) foram realizados por zLui et al., (2003). Todos os isolados observados por esses autores foram altamente patogênicos, sendo verificadas diferenças significativas no tamanho dos conídios, viabilidade, produção de esporos, velocidade de germinação, crescimento hifal relativo e temperatura sensitiva. Segundo Wraight et al., (2010) essas características são importantes na seleção dos isolados fúngicos para emprego no manejo integrado de pragas.

Os fungos pertencentes a esse gênero parasitam um grande número de artrópodes ocorrendo em mais de 200 espécies de insetos e ácaros. Além disso, a utilização de *B. bassiana* tem apresentado resultados positivos no controle de várias pragas de importância econômica como: *Hypothenemus hampei* Ferrari (1867) (Coleoptera: Curculionidae), praga mais importante do cafeeiro, *A. diaperinus* Oliveira et al., (2003), (Coleoptera: Tenebrionidae) praga mais comum em aviários comerciais (ALEXANDRE et al., 2008).

Embora Migiro et al. (2010) relataram que pesquisas sobre a patogenicidade de *M. anisopliae* e *B. bassiana* são altamente eficaz no controle de *Liriomyza huidobrensis* Blanchard (1926). Eles também sugeriram a possibilidade de supressão de *L. huidobrensis* com fungos usando um dispositivo de auto-inoculação.

2.2.2.3 *Isaria javanica*

O fungo *I. javanica* (Frieder e Bally) pertencente família Cordycipitaceae e Divisão Hypocreales SAMSON et al., (1984) e foi registrado pela primeira vez na América do Sul (Argentina) infectando *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera, Aleyrodidae). No

Brasil seu registro foi atacando lagartas *Lonomia obliqua* Walker (Lepidoptera: Saturniidae: Herculeucinae) (SCORSETTI et al., 2008; SPECHT et al., 2009). Espécies do gênero *Isaria* Pers. (1797) foram encontradas atacando insetos de diversas ordens, bem como nematódeo. São causadores da chamada "muscardine amarela dos insetos" e foram isolados de *Stenomoma decora*, Zeller, 1854 (Lepidoptera, Elachistidae), *Eupseudosoma* spp. (Lepidoptera, Arctiidae) e *Lagria vilosa* Fabricius, 1783 (Coleoptera: Lagriidae) tendo sido também encontrado causando epizootias em lagartas *Brassolis* sp. (Lepidoptera, Nymphalidae) (ALVES, 1998).

Das espécies deste gênero, destacam-se: *I. farinosa* (Holmsk), *I. tenuipe* (Peck) Samson, *I. cicadidae* (Miquel) Samson, *I. fumosorosea* (Wize) Brown e Smith e *I. amoenorosea* (Hennings) Samson (Alves, 1998) removidas do gênero *Paecilomyces* Bainier (Luangsa-ard et al., 2005).

Pesquisas mais recente com fungo do gênero (*Isaria*) têm demonstrado eficiência no controle de cupins. Wright et al. (2003) patentearam linhagens das espécies *I. fumosorosea* (Wize) e *I. javanica* para o controle de cupins subterrâneos. Este gênero reúne diversas espécies entomopatogênicas, entre elas *I. farinosa* e *I. fumosorosea* são as mais estudadas. Além disso, são empregadas em escala comercial em cultivos protegidos na Europa e nas Américas do Norte e Latina, para o controle de pulgões, mosca-branca, tripes, cochonilhas, ácaros, coleóptero e cigarrinhas (FARIA e MAGALHÃES, 2001; ALVES et al., 2008).

No Brasil, *Isaria* spp. tem sido utilizado em escala comercial no Estado de Mato Grosso para o controle do percevejo de renda da seringueira, (*Leptopharsa heveae*) (Drake e Poor) (ALVES et al., 2008). Segundo os autores, estas espécies produzem grande quantidade de inoculo em meios sólidos, fáceis e baratos de serem preparados, além de não ser repelente, o que facilita a disseminação entre os indivíduos da colônia.

2.2.2.4 *Penicillium* sp.

O gênero *Penicillium* Fleming, 1928, foi descrito na Alemanha, (do latim *Penicillus*: pincel) pertence ao Reino Fungi, Filo: Ascomycota, Classe: Eurotiomycetes, Ordem: Eurotiales e a Família: Trichomiaceae (ALEXOPOULOS et al., 1996). Este gênero apresenta grande importância no ambiente natural, bem como na produção de alimento e drogas. Algumas espécies de *Penicillium* são encontradas no solo e preferem climas frios e moderados, são comumente presentes onde o material orgânico está disponível. Na maioria são saprofitos e estão entre os representantes mais conhecidos da ordem Eurotiales. Algumas espécies são

conhecidas como mofo ou bolores e estão entre as principais causas de deterioração dos alimentos e muitas delas produzem micotoxinas. Estes fungos podem por contágio, contaminarem frutas e sementes e chegam a invadir habitações. Várias espécies produzem bactericidas (antibióticos) que concorrem com bactérias saprófitas pelas mesmas fontes de nutrição (DOMSCH e GAMS, 1980).

Morfologicamente, as colônias são geralmente de rápido crescimento, em tons de verde, branco e às vezes, a maioria composta por um denso micélio de conidióforos. Microscopicamente, as cadeias de conídios unicelulares individuais são produzidos na sucessão basípeta de uma célula especializada chamada fiálide. As fiálides podem ser produzidas individualmente, em grupos ou de métulas ramificadas, dando uma aparência de uma vassoura e são conhecido como *Penicillus*. Todas as células entre as métulas e conidióforos são referidos como ramos. O padrão de ramificação pode ser simples (não ramificado ou monoverticilado), ou em duas fases ramificadas (biverticilado simétrico e assimétrico). Os conidióforos são hialinos e podem apresentar paredes lisas ou ásperas. Os conídios são globosos, elipsoidal, cilíndricos ou fusiformes, podendo ser hialinos ou esverdeados e podem apresentar paredes lisas ou ásperas. Esclerócios podem ser produzidos por algumas espécies (SAMSON et al., 1984).

A forma anamórfica do *Penicillium* sp. pertence ao grupo dos fungos mitospóricos, subgrupo hifomicetos. Enquanto a forma teleomórfica pertence à família Trichocomaceae e estão representadas pelos gêneros *Talaromyces*. e *Eupenicillium*. Existem registrados cerca de 1110 espécies, variedades de formas *speciales* de táxons pertencentes ao gênero *Penicillium* presentes e descritos na literatura. Ele o agente causal dos bolores de coloração azul ou verde em frutos cítricos e podem causar podridões de frutos muito comuns nas condições de pós-colheita além ser responsáveis por perda em produtos agrícolas (KIMATI et al., 1978).

2.2.3 Fungos como agentes de controle de pragas

O biocontrole prevê o uso racional de organismos vivos (fungos, bactérias, vírus, predadores e parasitoides) visando a redução das populações pragas, sem interferir na população de inimigos naturais e sendo empregado como alternativa para diminuir ou evitar a utilização de inseticidas químicos convencionais. Entre os microrganismos entomopatogênicos, destacam-se

os fungos como agentes de controle biológico, por apresentarem vantagens como: capacidade de atacar os insetos em todos os estágios de desenvolvimentos e capacidade de penetrar via tegumento, por estarem presentes como componentes naturais em muitos ecossistemas terrestres (JACKSON et al., 2000).

No Brasil, o interesse em pesquisas com fungos entomopatogênicos iniciou com a ocorrência epizootica de *M. anisopliae* sobre diversas espécies de cigarrinhas da cana de açúcar, na década de 60 e hoje a área tratada com esse fungo no Brasil é, aproximadamente, de um milhão de hectares (ALVES et al., 2008).

2.2.3.1 Interação entre fungos entomopatogênicos e insetos

A primeira etapa do processo infectivo dos fungos entomopatogênicos envolve a adesão e a germinação dos conídios sobre a cutícula do inseto, a qual ocorre por ação mecânica e enzimática. Após a penetração do fungo no inseto as hifas entram em contato com a hemolinfa, desencadeando respostas imunes por parte do hospedeiro (ALVES, 1998).

Boucias et al., (1998) verificaram que a adesão dos conídios no tegumento do inseto pode ser passiva e não passiva, isto ocorre devido a uma interação entre a cutícula do inseto e a camada de microbastonetes (*rodlets*) de natureza lipoproteica ou de outra constituição química.

Suscetibilidade ou resistência de várias espécies de inseto à infecção de fungos pode resultar de muitos fatores, incluindo diferenças na estrutura e na composição do exoesqueleto, presença de compostos antifúngicos na cutícula, bem como a eficiência das reações de defesa celulares e humorais dos insetos (VILCINSKAS e GOTZ, 1999). Além disto, a composição da cutícula influencia fortemente na germinação dos conídios, resultando na suscetibilidade diferencial de várias espécies de insetos aos fungos entomopatogênicos WANG et al., (2005).

Fungos diferem de outros grupos de patógenos de inseto por sua habilidade de penetrar através da cutícula do hospedeiro. Após alcançar um hospedeiro potencial, o propágulo do fungo inicia uma série de etapas que podem levar à infecção ou a resistência, podendo não provocar nenhuma reação na ausência de reconhecimento entre o fungo e o inseto. O processo de infecção fúngica culmina na ruptura da cutícula do hospedeiro por crescimento e extrusão, antes da formação de esporos e da dispersão. A morte do hospedeiro infectado usualmente ocorre durante a colonização da hemolinfa, quando o hospedeiro sofre a falta dos nutrientes (WANG et al., 2005).

2.2.3.2 Fungos entomopatogênicos como agentes de controle de cupins

Os fungos entomopatogênicos destacam-se como agentes de controle biológico, por apresentarem vantagens como, segundo (Barros et al., 2010): a capacidade de atacar os insetos em todos os estágios de desenvolvimento; a capacidade de penetrar via tegumento e, normalmente por estarem presentes como componentes naturais em muitos ecossistemas terrestres.

O controle biológico natural de cupins por fungos é atualmente amplamente estudado (Hussain et al., 2011) e teve um dos registros mais antigos sobre o controle biológico natural de cupins por meio de fungos está no trabalho de Tate (1928), o qual observou e descreveu dois gêneros de fungos, *Ectomyces* e *Termitaria*, parasitando insetos da ordem Isoptera.

A associação de fungos em cupins foi primeiramente estudada por Hendee (1933). O material fúngico foi coletado do aparelho digestivo e tegumento dos cupins e também dos túneis e galerias. Os gêneros mais freqüentes foram *Trichoderma* e *Penicillium*. O autor concluiu que os cupins são capazes de transportar esporos e hifas de fungos, sendo importantes agentes de disseminação.

Os fungos entomopatogênicos têm sido foco de pesquisas no controle biológico natural de cupins. que são mais lentos no processo de colonização do que os nematóides. Assim sendo, causam menos mudanças comportamentais e fisiológicas e matam mais lentamente. Desse modo, esses patógenos parecem ter um maior potencial para a disseminação do inóculo através do contato social entre os membros da colônia. Todavia, a temperatura e a umidade constantes e a condição de escuro nas galerias subterrâneas dos cupins, também favorecem o crescimento e desenvolvimento do fungo (GRACE, 1997; NEVES E ALVES, 2004; ARAUJO et al., 2009; PIRES et al., 2010;).

A organização social dos cupins é um fator importante na disseminação de fungos entomopatogênicos dentro da colônia, o que deve facilitar o controle desses insetos pelo tratamento das áreas de alimentação. Entretanto, ação defensiva dos cupins, tais como remoção e isolamento dos indivíduos contaminados pelos fungos, enterramento dos cupins mortos junto com secreções defensivas e componentes inibidores, além da possibilidade de resistência humoral pode limitar a disseminação da doença dentro da colônia (RATH, 2000).

Diante disto, o controle de cupins por fungos entomopatogênicos tem sido objeto de pesquisas importantes com a finalidade de melhor preservar o meio ambiente. Os fungos entomopatogênicos: *B. bassiana* e *M. anisopliae* tem apresentado resultados promissores em bioensaios visando o controle de cupins das espécies: *C. formosanos* (LAI et al., 1982; FERNANDES e ALVES, 1992; DELATE et al., 1995); *C. cumulans* (NEVES e ALVES, 1999) e *N. coxiopensis* (ALBUQUERQUE et al., 2005; LOUREIRO e MOINO Jr, 2006; CUNHA et al., 2009).

Fuller (2007) analisou a atividade fungistática dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Paecilomyces* e *Penicillium* sobre a inibição do crescimento do tamanho dos soldados de *Nasutitermes* sp.

Segundo Azevedo (2001) os insetos infectados pelo fungo *M. anisopliae* tornam-se mumificados e cobertos por uma camada pulverulenta de cor verde, formada pela aglomeração de conídios. O fungo é utilizado no controle de pragas que causam sérios prejuízos a culturas de interesse agrônômico, em quase todos os países do mundo, principalmente nas regiões tropicais. Vários experimentos em laboratórios e campos foram realizados na Austrália visando à transmissão entre indivíduos e a indução de epizootia em colônias de *N. exitiosus*. Também foram observados altos níveis de mortalidade em grupos de cupins em laboratórios, obtidos pela adição de operários contaminados com *M. anisopliae* (HANEL, 1981). De acordo com Hanel, (1982) outras espécies de fungos entomopatogênicos foram utilizadas para controle de *N. exitiosus*, bem como o estudo do ciclo de vida de um isolado de *M. anisopliae*, com patogenicidade comprovada. Este fungo pulverizado dentro das colônias no campo ou em locais de coleta de alimento foi capaz de iniciar epizootias por até 15 semanas.

2.2.4 O controle de fungos entomopatogênicos e a interferência no comportamento social de cupins

O efeito inibitório das pelotas fecais dos cupins sobre a germinação dos esporos de *M. anisopliae* foi estudado por Rosengaus et al., (1998) quando observaram que a presença desse material diminuiu significativamente a taxa de germinação comparada ao tratamento controle. A taxa de germinação foi inversamente proporcional à quantidade de material fecal presente nas suspensões testadas e independeram do tempo de incubação. O efeito fungistático do material fecal foi virtualmente imediato e não exigiu tempo prolongado de contato com os esporos para

inibir a germinação. Esse mecanismo de proteção bioquímica pode reduzir os riscos de infecções fúngicas em ninhos de cupins. Apesar dos patógenos parecerem exercer significativa pressão seletiva sobre vários aspectos da socialidade, os mecanismos de resistência à doença são pouco compreendidos nos insetos sociais. Outros experimentos realizados em laboratório demonstraram que as ninfas de *Zootermopsis angusticollis* (Hagen) expostas a uma suspensão na concentração de 9×10^{-1} conídios/mL de *M. anisopliae*, tiveram sobrevivência maior do que o controle após serem submetidos a uma concentração letal de esporos. A exposição prévia ao patógeno conferiu aos cupins um grau de proteção durante o contato subsequente com o mesmo patógeno. Esses resultados representam a primeira demonstração da função imune *in vivo* em insetos sociais (ROSENGAUS et al., 1999a).

Os cupins que foram expostos ao contato direto com fungos entomopatogênicos, emitiram aviso aos companheiros de ninho através da vibração. Os cupins que não tiveram contato direto com os esporos e que perceberam o sinal vibratório aumentaram significativamente a distância entre eles. A resposta de fuga dos cupins não foi induzida apenas pela presença de esporos ou feromônios, mais requer também a percepção da vibração propagada através do substrato. Esse comportamento pode permitir aos cupins a redução dos riscos de doença dentro do ninho (ROSENGAUS et al., 1999b).

Rosengaus et al., (2000) desenvolveu as propriedades antifúngicas dos principais componentes terpenóides das secreções da glândula frontal de soldados *Nasutitermes* foram desenvolvidos por meio de incubação de suspensões de conídios de *M. anisopliae* associados às substâncias α -pineno e limoneno, sozinhas ou associadas em diferentes concentrações. Os ensaios *in vitro* demonstraram que essas substâncias reduzem a germinação dos conídios por meio de contato direto e indireto (vapor). Outros testes foram realizados com as mesmas substâncias antifúngicas por Azevedo e Neto, (2007) com soldados de *N. costalis*, *N. nigriceps* e *C. formosanus*. As espécies de *Nasutitermes* foram menos suscetíveis à infecção, provavelmente devido às propriedades antifúngicas do α -pineno e do limoneno, visto que os soldados de *C. formosanus* contaram apenas com defesas mecânicas, enquanto que os soldados de *N. costalis* e *N. nigriceps* demonstraram defesas químicas graças aos terpenóides das secreções glandulares

Bao e Yendol, (1971) estudaram histopatologia e o comportamento de *Reticulitermes flavipes* infectado com *B. bassiana*, descobriram que os cupins reduziram a atividade dinâmica e

se agruparem além da paralisia, perda de coordenação, aumento na descarga anal e perda de sensibilidade aos estímulos táteis, durante o período de 24 e 36 horas até a morte.

Traniello et al., (2002) descreveram uma exposição do cupim *Z. angusticollis* a *M. anisopliae*, os cupins aumentaram sua habilidade de resistência à infecção quando colocados em contato com os companheiros dos ninhos previamente imunizados. Essa transferência de resistência à infecção, mecanismo não reconhecido previamente no controle de doenças em insetos sociais, poderia explicar como o grupo aumenta a sobrevivência dos membros da colônia, a despeito do aumento dos riscos de transmissão de patógenos que pode acompanhar a sociabilidade.

2.3 Substratos como base nutricional de produtos fúngicos

No Brasil, a produção massal de fungos entomopatogênicos é tradicionalmente realizada com o emprego de arroz cozido como substrato. Após a colonização do arroz pelo microrganismo, a mistura de arroz com fungo, é triturada e comercializada na forma de pó-molhável. Alternativamente, a mistura arroz e fungo são vendidos sem trituração, ficando a cargo dos produtores rurais a tarefa de lavar o substrato com água para remoção dos esporos. Os esporos são sementes do fungo que funcionam como unidades infectivas e constituem o ingrediente ativo dos micoinseticidas (ALVES e PEREIRA, 1998).

Apesar de o arroz ainda ser o substrato mais utilizado na produção de fungos, alternativas vêm sendo testadas, na expectativa de substituir esse substrato. Portanto nestes últimos anos houve uma tendência para aumentar a utilização eficaz de outros resíduos como a casca de café, o bagaço de mandioca e de cana-de-açúcar, o farelo de soja, etc. Estes resíduos podem constituir um excelente substrato para os processos de fermentação em meio sólido, pois os mesmos são ricos em fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais. Igualmente, estes sub-produtos podem ter importantes aplicações na biotecnologia, como substratos para o crescimento de fungos filamentosos para a obtenção de produtos com alto valor agregado: biopesticidas, enzimas, ácidos orgânicos, fungos comestíveis e metabólitos secundários (PANDEY et al., 2005).

O Brasil é o maior exportador de suco de maracujá do mundo, além disso, o óleo da semente de Maracujá pertence às matérias-primas de qualidade altamente atraentes para as indústrias cosméticas (OLIVEIRA, 2003). Essa grande produção agroindustrial é responsável por

uma produção muito elevada de resíduos sólidos e que ocasionar problemas ecológicos sérios (CÓRDOVA, 2005).

Uma alternativa promissora é a utilização de resíduos da semente de maracujá, espécie *Passiflora edulis f. flavicarpa*, conhecido como Maracujá azedo ou amarelo, é a mais explorada comercialmente, botanicamente definido por Meletti (1999) como uma planta trepadeira sublenhosa que apresenta grande vigor vegetativo (ARAÚJO, 2007). As sementes, no maracujá, representam cerca de 6 A 12% do peso total do fruto e, podem ser boas fontes de óleo, carboidratos, proteínas e minerais (ARAÚJO, 2007).

Observamos o volume de micoinseticidas comercializados em nosso país, mesmo considerando que as produções de empresas são de pequeno porte, elas são responsáveis por um tratamento anual de 120 a 150 mil hectares, esses números são ainda bastante modestos, sobretudo quando comparados com inseticidas químicos ou mesmo com produtos biológicos como o Dipel e Thuricid (constituídos de esporos e toxinas da bactéria *Bacillus thuringiensis* como ingredientes ativos e destinados exclusivamente ao controle de lagartas), mas o contexto atual mostra-se favorável ao crescimento do mercado de micoinseticidas (SOCCOL, 2005).

O resíduo agroindustrial da extração do suco do maracujá apresenta pouco ou nenhum valor econômico e este ser transformados em produtos de valor econômico. Desse modo as vantagens do uso do resíduo da semente de maracujá como substrato para produção de bioinseticidas fungicos é uma alternativa viável, pois além de proporcionar bom crescimento fúngico apresentar boa base nutricional e de baixo custo.

2.4 Produtos registrados e comercializados no Brasil

Os primeiros testes com fungos que infectam insetos também chamados de fungos entomopatogênicos, foram realizados pelo russo Metschnikoff no final do século XIX, quando avaliou o potencial de *Metarhizium anisopliae* para o controle de uma espécie de besouro. Somente um século depois os primeiros resultados práticos começaram a surgir, havendo atualmente vários inseticidas biológicos à base de fungos (micoinseticidas) em comercialização em diferentes países. Segundo Alves e Pereira (1998) as quatro maiores empresas brasileiras do setor processaram algo em torno de 155 toneladas de arroz. De fato tem-se uma estimativa da área tratada para o controle de diferentes insetos-praga demonstrados na tabela 1.

Tabela 1- Área tratada com fungos entomopatogênicos produzidos pelas quatro maiores empresas brasileiras do setor.

Cultura	Praga	Fungo	Área (1000 ha)
Pastagens	Cigarrinhas	<i>Metarhizium anisopliae</i>	86,5
Cana-de-açúcar	Cigarrinhas	<i>M. anisopliae</i>	12,9
Mamão	Ácaros	<i>Beauveria bassiana</i>	4,9
Café	Broca-do-café	<i>B. bassiana</i>	1,1
Citrus	Cochonilha ortézia	<i>B. bassiana</i>	0,6
Horticultura	Diversas	<i>B. bassiana</i>	0,3
Seringueira	Percevejo-de-renda	<i>Sporothrix insectorum</i>	1,6
TOTAL			107,9

Fonte: Alves et al., (1998)

No Brasil, pesquisas sobre a utilização de fungos entomopatogênicos, em programas de controle de pragas têm sido realizadas com sucesso. Assim, vários centros da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Estadual de Londrina, Universidade de Caxias do Sul, Universidade Federal de Pernambuco, tabela 2.

Tabela 2 – Alguns produtos à base de fungos comercializados no Brasil

Produto	Praga-alvo	Empresa e/ou Instituição
<i>Bauveria bassiana</i>	<i>Tetranychus urticae</i> (Acari: Tetranychidae) <i>Brassolis</i> sp. (Lepidoptera: Nymphalidae) <i>Hypothenemus hampei</i> (Coleoptera: Scolytidae)	BioAgro Controle Biológico
Boveril WP	<i>T. urticae</i> (Acari: Tetranychidae)	Itaforte Bioproduto
PL63/447	<i>H. hampei</i> (Coleoptera: Scolytidae)	
Boveriol	Isoptera: Rhinotermitidae Isoptera: Termitidae	Tecnicontrol Industria e Comércio de Produtos Biológicos Ltda.
Biocerto <i>Metarhizium</i>	Hemiptera: Cercopidae	Biocerto
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Hemiptera: Cercopidae	BioCana
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Hemiptera: Cercopidae	BTA
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Hemiptera: Cercopidae	Fitossan-Assistência Fitossanitária e Controle Biológico
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Hemiptera: Cercopidae	Prefeitura de São José do Rio Claro
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Hemiptera: Cercopidae	Empaer
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Hemiptera: Cercopidae	Fundação Agroambiental da Amazônia – Funam
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Hemiptera: Cercopidae	Toyobo do Brasil Ltda.

<i>Metarhizium anisopliae</i> Metabiol	Hemiptera: Cercopidae Hemiptera: Cercopidae	Asplana Tecnicontrol Indústria e Comércio de Produtos Biológicos
<i>Sporotrix insectorum</i>	<i>Leptopharsa</i> (Hemiptera: Tinidae)	Empaer Estação de aviso Fitossanitário de são José do Rio Claro
<i>Sporotrix insectorum</i>	Hemiptera: Tingidae	Instituto Biológico
<i>Sporotrix</i>	<i>Leptopharsa beveae</i> (Hemiptera: Tinidae)	BioCerto
Vertirril WP 1300 Vertinat	Hemiptera: Aleyrodidae Hemiptera: Ortheziidae Hemiptera: Aleyrodidae Hemiptera: Ortheziidae	Itaforte Bioproduto Natural Rural

Fonte: Faria e Wraigt, 2007

Entre os fungos mais utilizados nestes centros estão: o *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *N. rileyi*, *Lecanicillium* spp. e *Sporotrix* spp. aplicando tecnologias clássicas e modernas para melhor conhecimento da biologia e da genética desses fungos, na obtenção e seleção de novas linhagens mais eficientes no controle biológico de insetos e no desenvolvimento de produtos comerciais. Efetivamente 12 espécies ou subespécies tem sido empregada como ingredientes ativos em micoinseticidas e micoacaricidas (FARIA e WRAIGHT, 2007).

Entretanto, quando observações de caracteres morfológicos foram complementares com análises moleculares, podem ser identificadas espécies crípticas dentro de grandes gêneros. Os principais micopesticidas comercializados no Brasil utilizam fungos dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Sporotrix* para o controle de pragas tabela 2.

Incluindo os micopesticidas baseados em *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Lecanicillium* spp., *I. fumosorosea*, e *B. brongniartii* (Sacc.) Petch, são os mais comuns dentre os produtos já desenvolvidos em escala mundial (FARIA e WRAIGHT, 2007).

Além disso, 171 micopesticidas desenvolvidos no mundo, aproximadamente, 93,6 % são recomendados para controle de insetos e 16,4 % contra acarinos. Os insetos-alvo estão distribuídos, em pelo menos 48 famílias taxonômicas e em 10 ordens principalmente em Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera, Thysanoptera e Orthoptera (FARIA e WRAIGHT, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os testes experimentais *in vitro* e moleculares foram realizados no Laboratório de Genética (LABGEN) e no Laboratório de tecnologia de DNA do Departamento de Biotecnologia, no Setor Sul do Campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). A manutenção dos cupins foi feita em casa de vegetação do mesmo departamento.

A identificação taxonômica clássica do *Penicillium* sp. foi realizada na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), no Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas (CCB).

A identificação taxonômica clássica do cupim *Nasutitermes* sp. foi realizada no Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (INPA), no Departamento de Entomologia.

3.1 Preparação dos meios de cultura e soluções

3.1.1 Meio "Batata Dextrose e Agar" (BDA) + 0,05 % cloranfenicol

O meio BDA é utilizado para estudar a fisiologia de crescimento e de esporulação dos fungos.

O meio BDA é composto de: 20 g de dextrose e 200 g de batata e 17 g de Agar. Preparo para o meio- 200 g de batatas (sem cascas) foram pesadas e cortadas em pequenos pedaços em forma de cubo. Em seguida, as batatas foram colocadas para ferver em Becker 1000/mL contendo 500 mL de água destilada e levada ao forno microondas até cozinhar. Após o cozimento foram filtradas em um coador de papel e o líquido obtido foi transferido para uma proveta 1000/mL e foi adicionada água destilada até completar um litro. Este foi transferido para um Erlenmeyer 1000/mL e adicionou-se 20 g de dextrose e 17 g de Agar. Foi homogeneizado e levado para ser autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Após a retirada da autoclave deixou esfriar um pouco e adicionou-se 0,05% cloranfenicol para depois ser vertido em placas de Petre.

3.1.2 Solução de tween 80 (0,05% v/v)

A solução foi preparada medindo 100 µL de tween 80 e avolumando 200 mL com água destilada autoclavada.

3.1.3 Solução de hipoclorito a 2%

A solução foi preparada medindo 2 mL de hipoclorito de sódio a 98 mL de água destilada autoclavada .

3.1.4 Solução álcool 70 %

A solução foi preparada misturando 70 mL de álcool etílico (absoluto) e 30 mL de água destilada autoclavada.

3.1.5 Solução Clorofil proporção 24:1.

A solução foi preparada pela mistura de 24 mL de clorofórmio e 1 mL de álcool isoamílico.

3.1.6 Tampões

Tampão TE

Tris HCl10 mM
EDTA10 mM
pH7,5

Tampão R

Tris HCl10 mM
EDTA1 mM
pH7,5

Tampão TEB (10X)

Tris Base0,89 mM
ácido bórico0,89 mM
EDTA0,0089 mM

Tampão de Amostra 5X

Azul de Bromofenol0,001%

Glicerol30%

Tampão TEB 10X.....5X

Gel de Agarose.0,8%

Agarose0,8 g

Tampão TEB (1X) 100 ml

3.2 Obtenção das espécies fúngicas

Neste experimento foram utilizados fungos obtidos da Coleção de Cultura da Micoteca do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e de outras instituições, constando em seu histórico a seguinte procedência tabela 3.

Tabela 3 - Origem das espécies fúngicas utilizadas no trabalho

Espécies fúngicas	Hospedeiros	Procedência
Isolado E ₆ - <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin	<i>Diatrea saccharalis</i> (Fabricius, 1794)	Pernambuco (URM)*
Isolado. URM4548 <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuill	<i>Diabrotica speciosa</i> (Stall, 1954)	Pernambuco (URM)*
Isolado. <i>Isaria javanica</i> (Frieder e Bally)	<i>Lonomia obliqua</i> (Walker, 1855)	Rio Grande do Sul
Isolado. <i>Penicillium</i> sp. (Fleming)		Pernambuco (URM)*

* Coleção de Cultura da Micoteca (URM) do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas (CCB)

3.2.1 Conservação das linhagens fúngicas

As linhagens fúngicas foram cultivadas e conservadas em meio BDA. 15 mL BDA de meio foram distribuídos em tubos de ensaio, fechados com algodão e esterilizados à 121 °C durante 20 minutos. Posteriormente resfriado em posição inclinada. As linhagens fúngicas foram inoculadas e incubadas à 28 °C. Após o crescimento fúngico foi adicionado aos tubos cinco mL de óleo mineral.

3.2.2 Obtenção dos *Nasutitermes corniger*

Os cupins *N. corniger* foram coletados de cupinzeiros localizados em árvores (figura 5), situadas no Setor Sul do Campus da UFAM e transferidos para potes plásticos e levados para o Laboratório de Genética / UFAM.

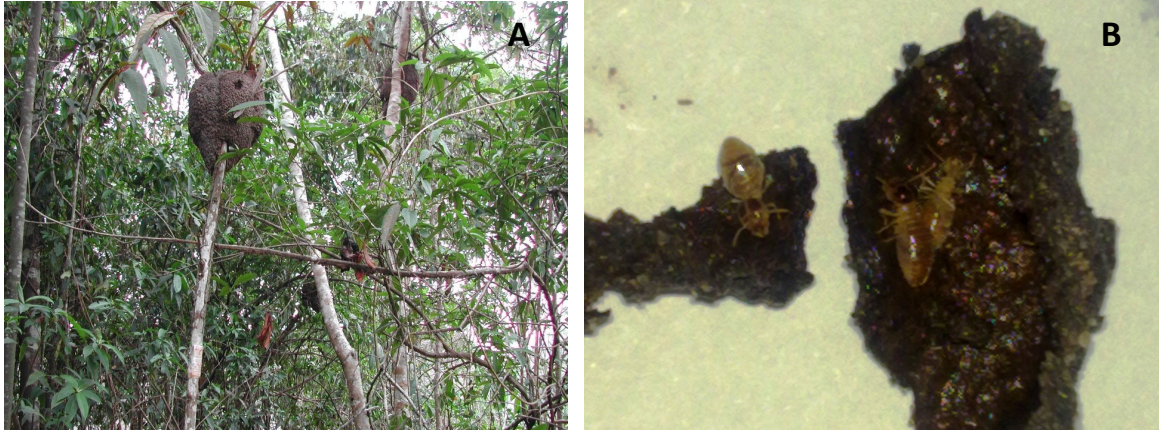


Figura 5 – Coletas de cupim na mata do Setor Sul do Campus da UFAM. **A** - cupinzeiro localizado em árvore; **B** *Nasutitermes corniger*
Foto: Oliveira, G. (2009).

3.3 Estratégias experimentais

Este trabalho foi desenvolvido em quatro Etapas: Teste *in vitro*, Seleção dos substratos, Teste em campo, Identificações: molecular e taxonômica do *Penicillium* sp. e taxonômica do cupim *N. corniger*.

3.3.1 Teste *in vitro*

3.3.1.1 Produção de conídios

Os fungos *M.anisopliae*, *B. bassiana*, *I javanica* e *Penicillium* sp. foram cultivados em BDA durante 12 dias. Conídios foram transferidos para água destilada esterilizada com solução tween 80, contados em câmara de Neübauer e a suspensão foi padronizada para 10^8 conídios/mL de cada fungo. Essa suspensão foi inoculada 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 deixado em repouso à temperatura ambiente.

Após 12 dias de crescimento fúngico foram preparadas suspensões de conídios nas concentrações necessárias para os bioensaios de acordo com Vilas Boas et al., (1996).

3.3.1.2 Preparo das suspensões de conídios

Pesou-se 1,0 g de arroz contendo o fungo, adicionou-se a um becker contendo 100 mL água destilada esterilizada e 0,15 mL de Tween 80. Após agitação em vortex, a suspensão foi quantificada em câmara de Neübauer, conforme a metodologia de Alves e Morais (1998) e ajustada para uma concentração de 10^8 conídios/mL. A partir desta concentração, foram efetuadas diluições sucessivas até as concentrações 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 conídios/mL que foram usadas nos testes *in vitro*.

3.3.1.3 Infecção “*in vitro*” de *Nasutitermes corniger*

Os bioensaios foram realizados nas concentrações 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 de conídios/ mL e um grupo controle contendo água destilada com Tween 80, para cada concentração testada. Foram feitas cinco repetições com 10 cupins (8 operários e 2 soldados) em um total de 300 indivíduos.

Os cupins foram imobilizados por um 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 cinco dias em temperatura ambiente. Foram realizadas observações diárias para remover e contabilizar o número de cupins inativados, esses insetos foram transferidos para placas de Petri e mantidos em câmara úmida (SUN et al., 2002) figura 6.

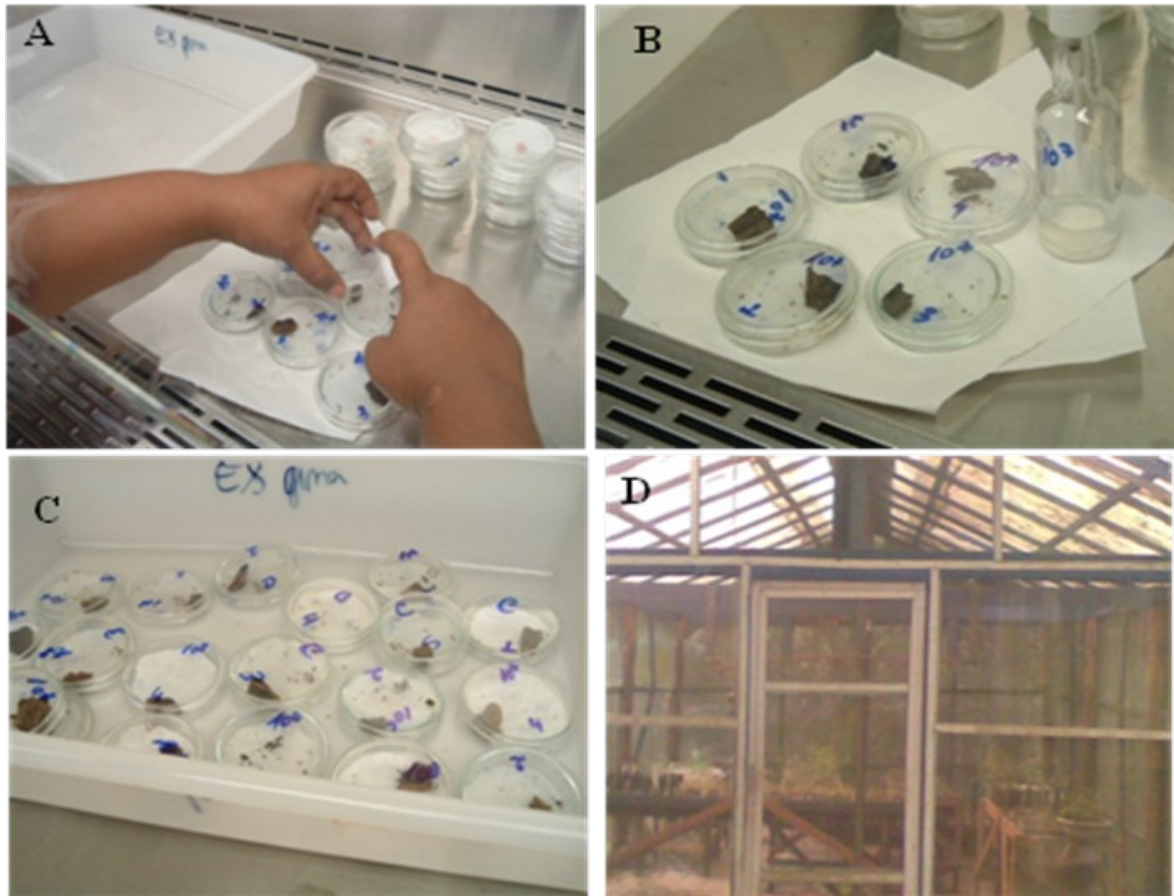


Figura 6 - Infecção *in vitro* dos fungos. (A) placas contendo cupins, madeira para alimento e abrigo; (B) Pulverização das amostras e controle; (C) Amostras de material pulverizado nas concentrações $1,0 \times 10^8$ a $1,0 \times 10^4$ conídios/ mL mais controle; (D) Casa de vegetação onde as amostras permaneceram pelo período de cinco dias
Foto: Oliveira, G. (2009)

3.3.1.4 Quantificação de conídios obtidos de cadáveres de *N. corniger*

Para cada fungo, *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *I. javanica* e *Penicillium* sp. cadáveres dos 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 em Vortex e efetuada a quantificação dos conídios em câmara de Neübauer.

3.3.1.5 Reisolamento dos fungos obtidos de cadáveres de *N. corniger*

Uma parcela de cupins colonizados pelos fungos foi imersa em álcool 70% por três minutos; solução hipoclorito de sódio 2 % 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 BOD (28 °C) até a esporulação.

Após 12 dias, os esporos fúngicos dos patógenos foram semeados em placa de Petri, contendo BDA acrescido de antibiótico (0,05% cloranfenicol). Após o crescimento micelial, o inóculo de cada fungo foi transferido para tubos de ensaio por 12 dias, para posterior análise dos aspectos morfológicos em placas de Petri, para confirmar a presença ou não do fungo inoculado inicialmente.

3.3.1.6 Análise das microestruturas dos fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *I. javanica* e *Penicillium* sp.

Fragmento fúngico foi transferido para quatro pontos equidistantes de uma placa de Petri com BDA. Os inóculos foram cobertos por lamínulas, previamente flambadas. As placas foram incubadas em BOD (28 °C) e após 24, 48, 72 horas, as lamínulas foram retiradas e coradas com azul de Amann e observadas ao microscópio óptico para análise das estruturas fúngicas, segundo Domsch e Gams (1993).

3.4. Seleção dos substratos

3.4.1 Origem dos substratos

Os substratos testados nesse trabalho foram coletados de várias fontes mostrados na figura 07. As cascas de côco seca provêm de coletas dos vendedores da orla da praia da Ponta Negra situada em Manaus/Amazonas.

As sementes de maracujá, (*P.edulis f. flavicarpa*) resíduo proveniente da empresa Divina Fruta, empresa incubada no Centro de Desenvolvimento Empresarial, situado no Distrito industrial, em Manaus/Amazonas.

As serragens foram obtidas da Madeireira e Material de Construção Santos, situada no bairro Ponta Negra, é resíduos procedentes da madeira Angelim do estado do Pará.

O Arroz parboilizado polido tipo 2, classe longo fino, marca korblenz, empresa urbano Agroindustrial Ltda., Rua João Januario Ayroso, Jaraguá do Sul/São Paulo.



Figura 7 - Substratos. (A) casca de coco, (B) arroz, (C) serragem clara, (D) serragem escura e (E) resíduo de semente de maracujá
Foto: Oliveira, G.(2011)

3.4.2 Pré-tratamento dos substratos

Primeiramente, os substratos de serragens e palha de coco foram secados em estufa com circulação de ar à 40 °C, durante 72 horas, até atingir uma umidade de 8% a 10%. A palha de côco após a secagem foi triturado em moinho de quatro facas do Departamento de Química da UFAM.

A semente de maracujá foi prensada por processo mecânico hidráulico, por prensagem mecânica em extrator radial tubular modelo ERT 60, marca Scott- tech. O Arroz parboilizado foi triturado em liquidificador marca cònsul em potência máxima. Os substratos: arroz, casca de coco, serragem clara, serragem escura e resíduo de semente de maracujá processados podem ser observados na figura 08.

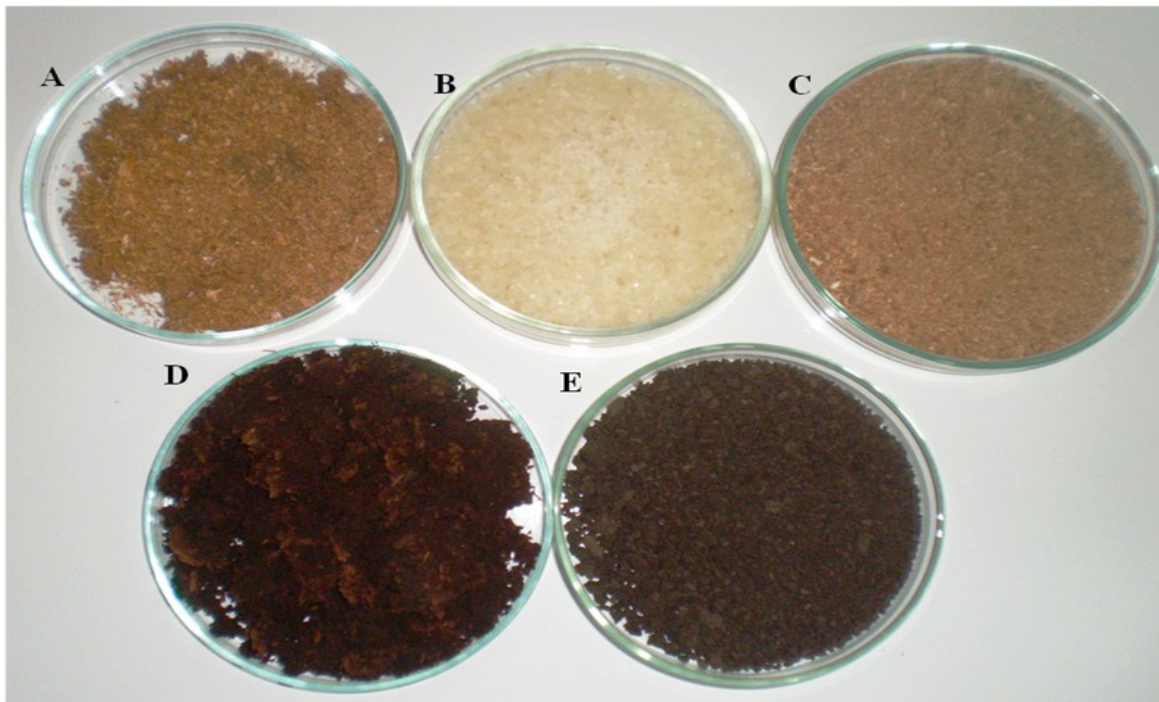


Figura 8 - Substratos tratados. (A) arroz, (B) casca de coco, (C) serragem clara, (D) serragem escura e (E) resíduo de semente de maracujá
Foto: Oliveira, G.(2009)

3.4.3 Preparo dos substratos para inoculação fúngica

Os substratos foram pesados, 15 g de substrato peso seco, e colocados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, adicionados de 7,5 mL de água destilada. Em seguida, os frascos foram fechados com tampão (algodão hidrofóbico), e coberto com papel laminado e esterilizados durante 20 min em autoclave a 121 °C.

Após a esterilização os mesmos foram separados e denominados em cinco grupos dos substratos: (A) casca de coco, (B) arroz, (C) serragem clara, (D) serragem escura e (E) semente de maracujá. Foram feitas três repetições para cada linhagem fungica: *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *I. javanica* e *Penicillium* sp., e um controle (substrato e água autoclavada), em um total de 20 frascos.

3.4.3.1 Preparo da solução fúngica

Os fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *I. javanica* e *Penicillium* sp., foram repicados em placas de Petri contendo BDA e mantidos em temperatura ambiente por oito dias.

Após esse período os fungos foram repicados para tubos falcon de 15 mL contendo 8,5 mL de água destilada autoclavada e 1,5 de glicerol. Foram agitados e a suspensão foi quantificada em câmara de Neubauer e ajustada para uma concentração de 10^8 conídios/mL.

3.4.3.2 Inoculação fúngica dos substratos

Cada grupo de substrato foi inoculado com 0,50 µL da suspensão 10^8 conídios/mL e adicionados 7,5 mL de água destilada autoclavada. Os frascos de Erlenmeyer foram incubados em estufa a 28 °C durante cinco dias.

Foram realizadas observações diárias para acompanhamento do crescimento das linhagens fúngicas em substrato figura 9.



Figura 9 - Teste para a seleção dos melhores substratos para o crescimento fúngico, sendo que (A) casca de coco, (B) arroz, (C) serragem clara, (D) serragem escura e (E) resíduo de semente de maracujá, todos com controle
Foto: Oliveira, G.(2011)

3.4.3.3 Quantificação dos conídios crescidos nos substratos

Pesou-se 1,0 g de cada substrato contendo o fungo, homogeneizou-se em tubo de ensaio contendo 9 mL água destilada autoclavado e 0,15 mL de Tween 80. Após agitação em vortex, a suspensão foi quantificada em câmara de Neübauer, conforme a metodologia de (Alves e Morais, 1998).

3.4.3.4 Preparação dos produtos e teste do período de prateleira

Após os testes para selecionar os melhores substratos que obtiveram melhor crescimento fúngico. A partir dos substratos foram pesados 1,0 g de cada espécie fúngica e transferidos para ampolas de vidro de 13 mL. Sendo 04 ampolas para cada espécie fúngica e controle totalizando 24 ampolas (12 para cada substrato) tabela 4. A primeira aplicação ocorreu após 24 horas de preparação do produto fúngico. Foi determinado um período de prateleira de 30 dias. As 12 ampolas que foram submetidas ao período de prateleira estabelecido foram mantidas em prateleira em temperatura ambiente para aplicação em campo após 30 dias de prateleira tabela 4 e figura 10.

Tabela 4 - As 24 ampolas do produto fúngico para dois substratos

<i>Identificação</i>	<i>Arroz</i>	<i>Semente de maracujá</i>	<i>Concentração (conídios/mL)</i>
1	<i>I. javanica</i>	<i>I. javanica</i>	10 ⁸
2	<i>I. javanica</i>	<i>I. javanica</i>	10 ⁸
3	<i>I. javanica</i>	<i>I. javanica</i>	10 ⁸
4	Controle (água)	Controle (água)	10 ⁸
5	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	10 ⁸
6	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	10 ⁸
7	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	10 ⁸
8	Controle (água)	Controle (água)	10 ⁸
9	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	10 ⁸
10	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	10 ⁸
11	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	10 ⁸
12	Controle (água)	Controle (água)	10 ⁸

* Antes das aplicações nos cupinzeiros foi adicionado 9 mL de água destilada autoclavada em cada ampola.



Figura 10 - Ampolas de vidro de 13 mL contendo produto (substrato + fungo)

Foto:

Oliveira, G. (2011)

3.5 Teste em campo

3.5.1 Aplicação do produto no campo

Para realização do teste em campo foram utilizadas as linhagens fúngicas *M. anisopliae*, *I. javanica*, *Penicillium* sp. e. Exceto o fungo *B.bassiana* por apresentar uma infecção e patogenicidade lenta.

A área de aplicação para o teste dos produtos em campo fica localizada no Setor Sul do Campus da Universidade Federal do Amazonas em Manaus, AM figura 11.



Figura 11 - Área de aplicação dos produtos em campo. Setor Sul do Campus da Universidade Federal do Amazonas
Foto: Google earth, (2010)

Para aplicação dos produtos a base de fungos nos cupinzeiros, foram determinados dois tratamentos. Foram escolhidos 12 cupinzeiros ao acaso no campo e aplicada 10 mL de suspensão fúngica de 10^8 conídios/mL de cada linhagem (*M. anisopliae*, *I. javanica* e *Penicillium* sp.). No grupo (controle) foi inoculado substrato mais água/autoclavada. As aplicações dos produtos foram realizadas após 24 horas do período de preparação tabela 5.

Tabela 5- Esquema de aplicação dos produtos fúngicos nos cupinzeiros

	FUNGOS	SUBSTRATO
1	Controle <i>Isaria javanica</i> (água)	Arroz
2	<i>I. javanica</i>	Arroz
3	<i>I. javanica</i>	Arroz
4	<i>I. javanica</i>	Arroz
5	Controle <i>I. javanica</i> (água)	R.S. de Maracujá*
6	<i>I. javanica</i>	R.S. de Maracujá*
7	<i>I. javanica</i>	R.S. de Maracujá*
8	<i>I. javanica</i>	R.S. de Maracujá*
9	Controle <i>Metharizium. anisopliae</i> (água)	Arroz
10	<i>M. anisopliae</i>	Arroz
11	<i>M. anisopliae</i>	Arroz
12	<i>M. anisopliae</i>	Arroz
13	Controle <i>M. anisopliae</i> (água)	R.S. de Maracujá*
14	<i>M. anisopliae</i>	R. S de Maracujá*
15	<i>M. anisopliae</i>	R. S de Maracujá*
16	<i>M. anisopliae</i>	R. S de Maracujá*
17	Controle <i>Penicillium</i> sp. (água)	Arroz
18	<i>Penicillium</i> sp.	Arroz
19	<i>Penicillium</i> sp.	Arroz
20	<i>Penicillium</i> sp.	Arroz
21	Controle <i>Penicillium</i> sp. (água)	R.S. de Maracujá*
22	<i>Penicillium</i> sp.	R.S. de Maracujá*
23	<i>Penicillium</i> sp.	R.S. de Maracujá*
24	<i>Penicillium</i> sp.	R.S. de Maracujá*

* Resíduo de semente de maracujá (R.S. de Maracujá)

Para a segunda aplicação dos produtos foram 12 novos cupinzeiros escolhidos ao acaso no campo e realizou-se a mesma metodologia da primeira aplicação.

3.5.2 Método de aplicação das suspensões fúngicas por cupinzeiro

Para aplicação dos produtos (substrato mais fungo) foram abertos um ou mais canais com o auxílio de um varão de ferro com 50 cm de comprimento por 15 mm de diâmetro e um martelo. Como regra geral cada canal foi feito verticalmente, começando do topo do cupinzeiro, atravessando a crosta ou calota até chegar à região hipógea. Para cada ampola dos produtos foram adicionados 9 mL de água destilada autoclavada em seguida foram homogeneizados e aplicados diretamente nos canais da região do cupinzeiro, figura 12.



Figura 12 – Canal vertical no cupinzeiro para posterior aplicação do produto

Foto: Oliveira, G. (2010)

3.5.3 Avaliação do tempo de mortalidade do cupinzeiro

A primeira observação do tempo de mortalidade foi realizada após 30 dias e segunda com 60 dias de inoculação fúngica.

Após 60 dias de inoculação os cupinzeiros foram abertos com facão e não havendo população viva do cupim, a colônia foi considerada morta enquanto que se notando a presença de cupim, ainda que em reduzida quantidade, a colônia foi considerada ainda viva.

3.6 Identificação fúngica

3.6.1 Identificação molecular

Esta metodologia foi realizada para identificação molecular do fungo *Penicillium* sp. a nível taxonômico de espécies.

3.6.1.1 Cultivo monospórico

Para a identificação molecular se faz necessário a técnica de cultivo monospórico. Esta técnica proporciona o isolamento de apenas um esporo para obtenção de cultura pura, processo que possibilita a diminuição das variações ao nível morfofisiológico, bioquímico e genético, quando submetidas a cultivos sucessivos segundo a metodologia de Gams e Rozsypai (1973). A amostra do fungo *Penicillium* sp. foi submetida a cultivo monospórico em BDA.

3.6.1.2 Extração de DNA

Para a extração de DNA fúngico foi seguido o protocolo desenvolvido por Souza (2006), com modificações. Os isolados foram previamente cultivados em meio líquido Manachini (1987) por 48 horas a 30 °C e 150 rpm.

Após a incubação foi realizada a filtração para que houvesse separação do micélio. Em seguida, triturou-se o micélio filtrado em nitrogênio líquido e colocou-se 200 mg em microtubos de 2 mL; foi adicionado 1000 µL de Brazol (LGC-Biotecnologia) misturado suavemente e incubado em banho-maria a 65 °C por 30 minutos; o tubo foi removido do banho-maria, esfriou no gelo; adicionou-se 200 µL de clorofil, misturou-se bem e centrifugou-se a 12.000 rpm por dois minutos.

A fase aquosa foi removida e transferida para outro tubo limpo. Adicionou-se 500 µL clorofil e agitou-se suavemente. Centrifugou-se a 12.000 rpm por três minutos. Transferiu-se a fase aquosa para outro tubo limpo. Foram adicionados 600 µL de etanol (a 20 °C), misturou-se bem (gentilmente), e foi precipitado no congelador até o dia seguinte. Em seguida o precipitado foi centrifugado a 12.000 rpm por três minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se ao sedimento 1 mL de etanol (70%) que agiu durante 10 minutos. Repetiu-se o procedimento mais uma vez e adicionou-se 1 mL de etanol (95%) durante três minutos. Centrifugou-se a 12.000 rpm por cinco minutos, descartou-se o sobrenadante e secou-se o sedimento invertendo-se o tubo

sobre um papel autoclavado por, aproximadamente, 30 minutos. O sedimento foi dissolvido em 50 µL de tampão TE e conservado em geladeira para posterior quantificação.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e visualizada em luz ultravioleta.

3.6.1.3 Preparação e purificação do produto de Polymerase Chain Reaction- PCR (MULLIS et al., 1986)

A partir dos oligonucleotídeos descritos por (White et al., 1990) para a região ITS-1 do rDNA, F (5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') e R (5' - CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A- 3').

A reação foi realizada, nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 2,5 minutos; seguida de 40 ciclos (15 segundos de desnaturação a 94 °C; 30 segundos de anelamento a 58 °C e 1,5 minutos de extensão a 72 °C), concluindo com 10 minutos de extensão final a 72 °C. Os componentes para preparação do *mix* da PCR e suas concentrações são mostrados na tabela 6.

Tabelas 6 - Reagentes do sistema de Polymerase Chain Reaction- PCR com volumes e concentrações

Reagentes do sistema	Para 1 reação (µL)
Água	13,2 µL
Tampão 10 X	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µL
DNTPs (2,5 mM)	2,5 µL
Primer(F) (5 pmoles/µL)	1,0 µL
Primer 2(R) (5 pmoles/µL)	1,0 µL
Taq (5 U/µL)	0,3 µL
DNA (10 ng/µL)	2,0 µL
Volume Total	25,0 µL

O produto da PCR foi conferido por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta. A purificação foi realizada através do kit *Accuprep® PCR Purification Kit* (Bioneer corporation).

3.6.1.4 Reação de seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi feita utilizando os mesmos oligonucleotídeos usado na PCR. O seqüenciamento das amostras foi realizado nos dois sentidos de leitura para maior garantia e fidelidade da análise. A seguir os componentes para preparação da reação de seqüenciamento: volume final de 10 µL, contendo 3,0 µL do produto de PCR (~50 100 ng), 1,0 µL (5 pmoles) de iniciador senso e anti-senso (em reações distintas) 0,3 µL BigDye (v3.1A), 2,0 µL de tampão (5x replacement buffer) e complementado com 3,7 µL ddH₂O.

A ciclagem foi composta de etapa 1 (96 °C/1 minuto) 1 ciclo; etapa 2 (96 °C/10 s; 50 °C/15 segundos; 60 °C/1 minuto e 15 segundos) 15 ciclos; etapa 3 (96 °C/10 segundos; 50 °C/15 segundos; 60 °C/90 segundos) 5 ciclo; etapa 4 (96 °C/10 segundos; 50 °C/15 segundos; 60 °C/2 minutos) 5 ciclos; Etapa 5 (15 °C /forever)..

O produto das reações de seqüenciamento marcado foi lido em seqüenciador automático ABI 3130 XL da (Applied Biosystems).

As seqüências foram comparadas com a sua fita complementar e submetidas ao programa BLAST para comparação com outras já depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para identificação das espécies conforme a similaridade genética.

3.6.2 Identificação taxonômica

3.6.2.1 *Penicillium* sp.

A identificação taxonômica da espécie de *Penicillium* sp. foi realizada seguindo as chaves identificação taxonômica do fungo vindo da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE (Coleção de Culturas – Micoteca URM604 – Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas-CCB/UFPE). A amostra foi cultivada a 28 °C por sete dias, utilizando os meios : CYA – Czapek Yeast Extract Agar, MEA – Malt Extract Agar e Czapek Dox Agar.

3.6.2.2 *Nasutitermes corniger*

A identificação taxonômica das espécies de *N. corniger* foi realizada seguindo as chaves de identificação (Isoptera-Termitidae) no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA e coleção de cupins do laboratório de Distemática, biologia e ecologia de invertebrados do solo da Coordenação de Pesquisa em Entomologia do INPA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da infecção “*in vitro*”

Os cupins *N. corniger* foram suscetíveis às linhagens de *I. javanica*, *M. anisopliae*, *B. bassiana*, e *Penicillium* sp. as quais apresentaram alta patogenicidade nos diferentes tratamentos, diferindo estatisticamente do grupo controle, onde não foi observada mortalidade causada pelos fungos (tabela 7). O fungo *I. javanica* foi significativamente mais patogênico sobre *N. corniger* nos tempos analisados, 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 e linhagens fúngicas. Constatou-se que a partir do segundo ao quarto dia de exposição a ação patogênica do fungo sobre os cupins atingiu o percentual de 100% de mortalidade na concentração 10^8 conídios/mL não apresentando diferença significativa na taxa de mortalidade média. Também, o percentual de mortalidade do grupo controle foi discreto (0,2 %) e foi constatada diferença significativa entre o controle e os tratamentos à partir da concentração 10^5 conídios/mL. *M. anisopliae* após o terceiro e quarto dia de exposição, causou 100% de mortalidade na concentração 10^8 conídios/mL, diferindo estatisticamente das outras concentrações. O mesmo não foi evidenciado com o *Penicillium* sp. que no quarto dia de exposição, causou 100 % mortalidade na concentração 10^7 e 10^8 conídios/mL não diferindo estatisticamente entre as concentrações. Ao passo que *B. bassiana* só no quarto dia de exposição, obteve mortalidade acumulada de 100%, na concentração 10^8 conídios/mL, diferindo estatisticamente das outras concentrações e fungos. Os resultados obtidos demonstraram similaridades aos encontrados por Malagodi e Veiga (1995), realizando bioensaio em laboratório, avaliaram a patogenicidade dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre cupim *Nasutitermes*. Os tratamentos utilizados foram as suspensões de cada um deles em cinco concentrações 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} conídios/mL e de 97,5% e 87,5 % respectivamente na concentração de 1×10^8 conídios/mL em cinco dias. Wright et al., (2003) ao utilizarem duas linhagens de *B. bassiana* (26037 e 90519) sobre *C. formosanus*, em testes de laboratório, verificaram que 100% dos operários 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 2×10^8 conídios/mL, sendo 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 arbóreos.

Tabela 7- Percentagem média de mortalidade acumulada de *Nasutitermes corniger* em diferentes dias após a infecção por *Isaria javanica*, *Metharizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium* sp.

Fungo	Concentração conídios/mL	1º dia%	2º dia%	3º dia%	4º dia%
<i>I. javanica</i>	Controle	2c	0c	0, 0c	0,0c
	10^8	84a	100b	100b	100b
	10^7	74ab	94ab	100b	100b
	10^6	78ab	92ab	98b	100b
	10^5	12bc	60ab	82b	100b
	10^4	0c	36bc	60ab	100b
<i>M. anisopliae</i>	Controle	0c	0c	2c	0c
	10^8	2c	92ab	100b	100b
	10^7	1c	62ab	94b	100b
	10^6	0c	32bc	54bc	82b
	10^5	12c	68ab	86b	100b
	10^4	20c	44bc	68ab	74ab
<i>Penicillium</i> sp.	Controle	0c	0c	2c	04c
	10^8	14c	64ab	90b	100b
	10^7	12c	68ab	78b	100b
	10^6	08c	42bc	66b	94b
	10^5	16c	40bc	68b	100b
	10^4	12c	52bc	70b	84b
<i>B. bassiana</i>	Controle	0c	2c	2c	2c
	10^8	36bc	66ab	74ab	100b
	10^7	34bc	44bc	48bc	86b
	10^6	16c	20c	38bc	58b
	10^5	24c	30bc	36bc	80b
	10^4	16c	28bc	44bc	70b

* médias com letras iguais não apresentam diferença ao nível de 5% de significância, teste de Scheffé

Os dados de mortalidade da infecção “*in vitro*” sobre *N. corniger*, 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.

Além disso, os valores obtidos nesta análise são próximos aos encontrados por c (2005) quando em ensaios *in vitro* utilizou *M. anisopliae* no controle de *N. corniger* em sete dias obteve um percentual de 100% de mortalidade. De fato esses valores acumulados são elevados e promissores para o controle de insetos, e na opinião de Lecuona et al., (2001), os fungos entomopatogênicos são considerados eficazes quando apresentam valores de mortalidade acima de 40% para as pragas estudadas.

O maior índice de mortalidade 100% foi obtido no segundo dia após a infecção para a linhagem *I. javanica* em todas as concentrações fúngicas sendo que na concentração de 10^7 e 10^8 conídios/mL obteve mortalidade de 100% a partir do segundo dia tabela 7. Em seus relatos Specht et al., (2009) já havia verificado a ocorrência do fungo entomopatogênico *I. javanica*, ativo em lagartas de *Lonomia obliqua*. Os autores concluíram que na concentração de $5,2 \times 10^7$ conídios/mL 100% das lagartas morreram após sete dias de exposição ao patógeno. Este fungo é encontrado causando epizootias em lagartas de *Brassolis* sp. (Lepidoptera, Nymphalidae) (Alves, 1998). Na seqüência o segundo melhor índice de mortalidade foram as linhagens fúngicas *M. anisopliae* e *Penicillium* sp. que obteve 100% de mortalidade a partir das concentrações 10^5 , 10^7 e 10^8 conídios/mL no quarto dia tabela 7. Relatos realizados por Rath e Tidbury (1996) avaliaram a suscetibilidade de *C. acinaciformis* e *N. exitiosus* aos isolados comerciais de *M. anisopliae*, verificaram que aplicações de $8,1 \times 10^7$ conídios/mL do isolado DAT F-001 e $1,2 \times 10^8$ conídios/mL do isolado ATCC 62176, resultaram em 100% de mortalidade quatro dias após a inoculação.

4.2 Análise da quantificação de conídios fúngicos obtidos de cadáveres de *Nasutitermes corniger*

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

Tabela 8- Comparação das médias da produção de conídios/mL em cadáveres de *Nasutitermes corniger*

Conídios/mL	<i>Metharizium anisopliae</i> %	<i>Penicillium</i> sp. %	<i>Isaria javanica</i> %	<i>Beauveria bassiana</i> %
10^8	40,6b	85,8ab	109,2ab	38,4b
10^7	50,8b	74,8ab	70,4ab	43,6b
10^6	48,8b	62,1b	68,8b	22,6b
10^5	29,2b	26,1b	48,4b	23,6b
10^4	52,6b	24,8b	35,6b	30,8b

* médias com letras iguais não apresentam diferença ao nível de 5% de significância, teste de Scheffé.

Esses dados aproximam-se dos obtidos por Albuquerque et al., (2005) quando estudaram a esporulação de *M. anisopliae* var. *anisopliae* sobre operários e soldados de *N. coxipoensis*, cuja média de esporulação foi de $38,5 \times 10^8$ e $55,0 \times 10^4$ conídios/mL e diferem dos de Albuquerque (2005) quando observou que *B. bassiana* foi capaz de produzir $35,62 \times 10^4$ e $45,66 \times 10^8$ conídios/mL sobre os cadáveres do cupim *N. coxipoensis*. Sun et al., (2002), em experimentos realizados sobre produção de conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre cadáveres de *C. formosanus* verificaram um aumento significativo da esporulação após 11º dia da morte do inseto. Foi possível observar que a produção de conídios é fator importante na disseminação e permanência de fungos entomopatogênicos em população de inseto, em especial de cupins subterrâneos, 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.

4.3 Análise morfológica do reisolamento dos fungos obtidos de cadáveres de *Nasutitermes corniger*

As estruturas vegetativas e reprodutivas presentes dos fungos *M. anisopliae*, *I. javanica*, *Penicillium* sp. e *B. bassiana* antes e após a passagem foram analisadas a cada período de tempo pela técnica de cultura em lamínula.

O crescimento micelial dos fungos sobre o cadáver de *N. corniger* apresentaram inicialmente um aspecto ralo e hialino de cor branca. Posteriormente os fungos *M. anisopliae*, *I. javanica* e *Penicillium* sp. apresentaram um aspecto pulverulento e de cor verde figura 13, exceto a linhagem *B. bassiana* que apresentou aspecto micelial cotonoso e de cor branca, havendo colonização total do inseto no sétimo dia.

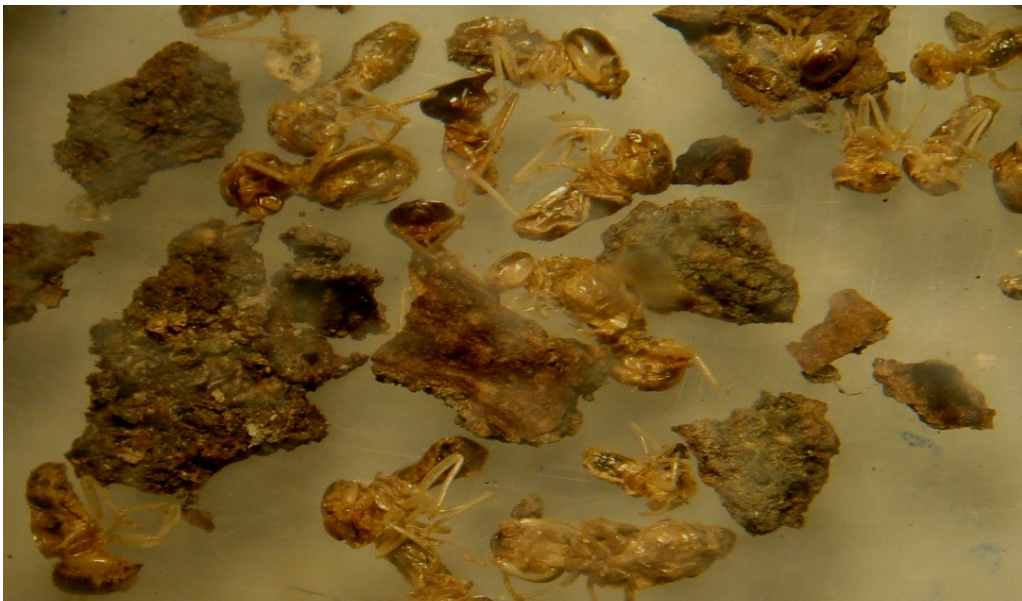


Figura 13 – Cupins *Nasutitermes corniger* colonizado pelo fungo *Penicillium* sp. demonstrando aspecto pulverulento e de cor verde
Foto: Oliveira, G. (2010)

Após o procedimento da técnica em lamínula foi observado no período de 24 horas à formação de micélio, representado por hifas septadas, em todos os fungos reisolados figura 14. Após 48 horas os fungos *Penicillium* sp. e *B. bassiana* foi constatada a formação de conidióforos, 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 reisolados estudados, embora estas estruturas tenham se apresentado em maior proporção em todos os reisolados. Estes dados corroboram com os encontrados por ao analisar os aspectos morfológicos de *B. bassiana* reisolado de *R. sanguineus* dados que indicaram o revigoramento da linhagem após passagem pelos operários de *C. gestroi*, técnica utilizada para ativar a patogenicidade e virulência das linhagens fúngicas estocadas em substratos artificiais por um longo período de tempo Alves (1998). E de acordo com Malagodi e Veiga (1995), quando estudaram a esporulação de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre *Nasutitermes* sp., obtiveram bons resultados com alta produção de conídios sobre os insetos. Formação micelial entre o 2º e o 3º dias foi observada nos insetos tratados com *B. bassiana*. Crescimento micelial foi verificado emergindo inicialmente em torno das peças bucais, logo após, nas membranas intersegmentais e ao redor das patas. Eventualmente os cadáveres foram totalmente cobertos com micélio e conídios, evidenciando o potencial desse fungo sobre o cupim *N. coxipoensis*. Azevedo (1998) relatou que para a análise das microestruturas dos fungos, presença de hifas, conídios e conidióforos, essas observações citológicas tornam-se relevantes no auxílio da detecção da ploidia e que a faixa de temperatura entre 25-30 ° C é a faixa ideal para a produção e germinação dos conídios e para o desenvolvimento das estruturas morfológicas de *M. anisopliae* var. *acridum*, em laboratório, nos procedimentos de produção desse fungo com a finalidade de utilização em controle biológico no campo.

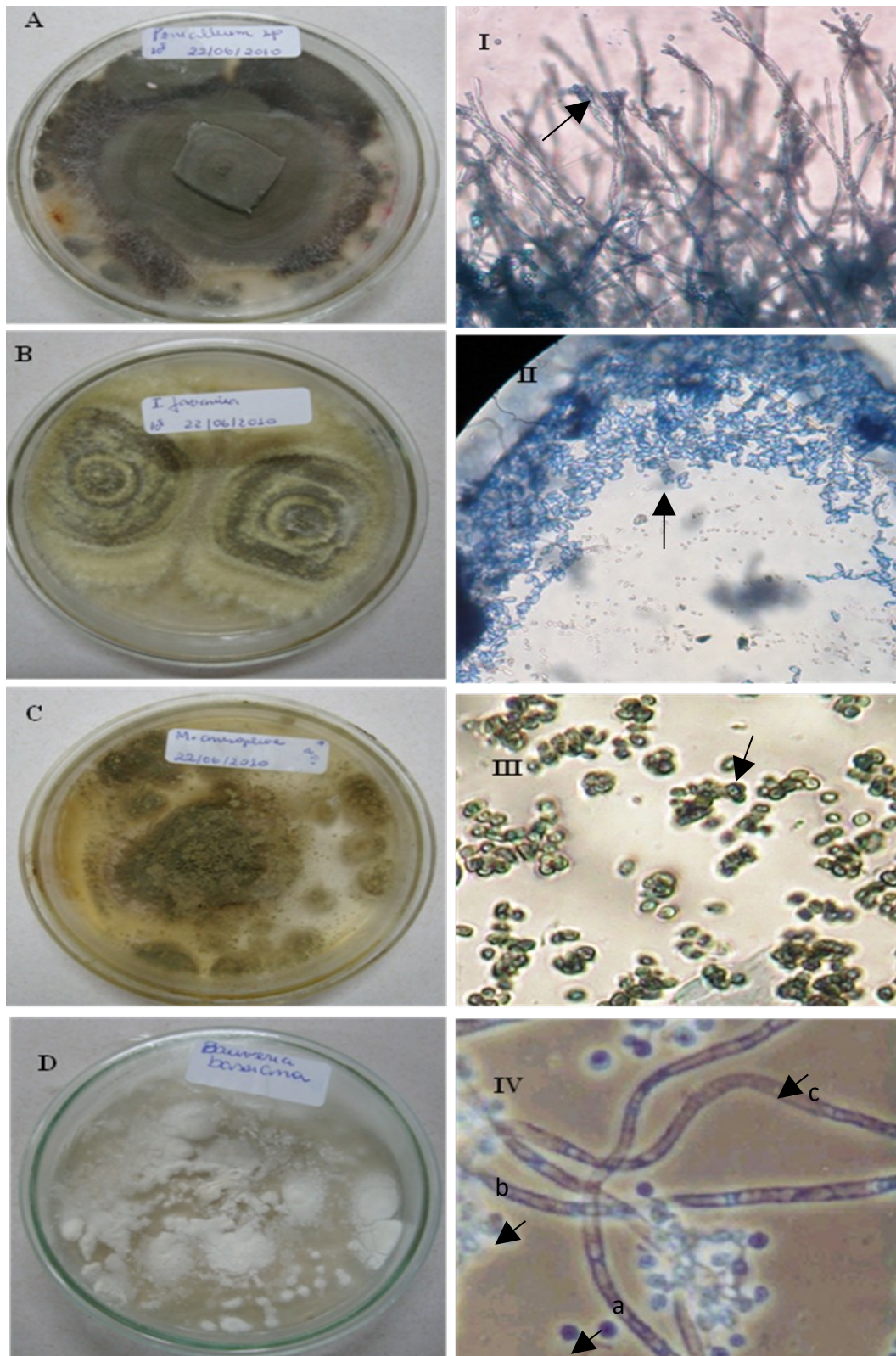


Figura 14– Aspectos das colônias reisoladas de cadáveres dos cupins *Nasutitermes corniger*. Conidióforos do *Penicillium* sp.(seta) (A-I) ; conídios de *Isaria javanica* (seta) (B-II); conídios de *Metarhizium anisopliae* (seta) (C -III) e Conidióforos e conídios e hifas septadas (seta a, b e c) de *Beauveria bassiana* (D-IV) (400 X)
Foto: Oliveira, G. (2010)

4.4 Análise do substrato para crescimento fúngico

Os substratos que apresentaram melhores resultados para o crescimento de *M. anisopliae*, *I. javanica*, *Penicillium* sp. e *B. bassiana* inoculados com suspensão concentração 10^8 conídios/mL foram encontrados em substratos de resíduo de semente de maracujá e arroz (figura 15 e 16) no período de cinco dias de cultivo, a 28 °C. Apenas *B. bassiana* apresentou crescimento com oito dias de cultivos em resíduo de semente de maracujá e arroz a 28 °C. Nos substratos de casca de côco, serragem clara e serragem escura, não foram observado nenhum crescimento fúngico.

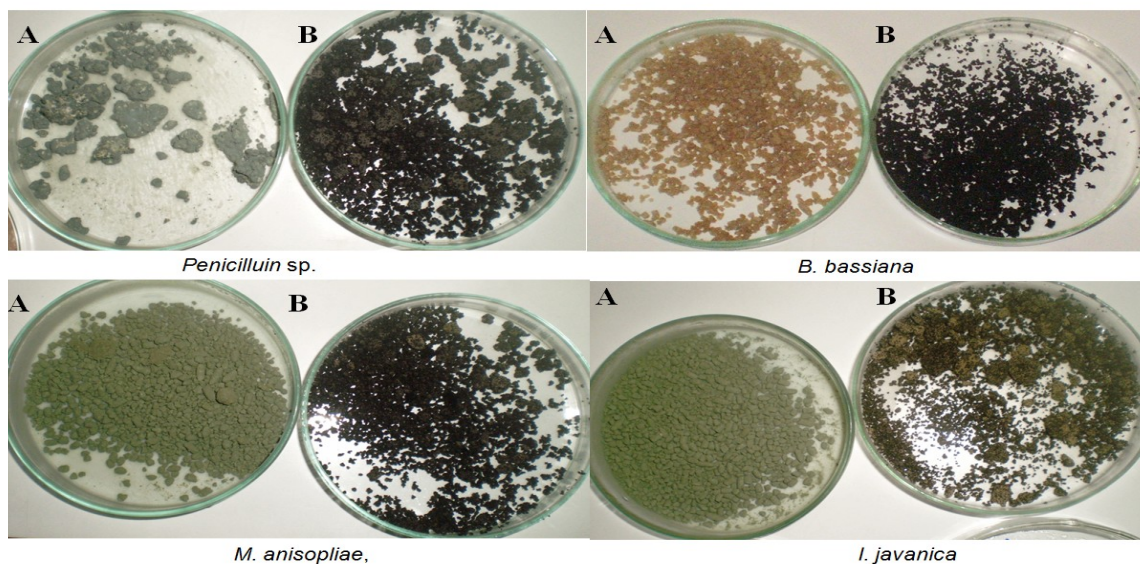


Figura 15- Produção de conídios de *Penicillium* sp., *Bauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria javanica*, em (A) arroz parboilizado e (B) resíduo de semente de maracujá na concentração 10^8 conídios/mL

Foto: Oliveira, G. (2011)



Figura 16 - Substratos para o crescimento fúngico: (A) semente de maracujá; (B) arroz
Foto: Oliveira, G. (2011)

O mercado atual para a fabricação de produtos biológicos utiliza como matéria prima o grão de arroz para produção de inóculo fúngico em larga escala, este tem sido um dos substratos mais utilizados no controle biológico. A eficácia do arroz parboilizado foi constatada por Catalão (2004) e Melo (2006) para obtenção conídios de *Dicyma pulvinata*, segundo os autores o arroz é excelente fonte nutricional para o crescimento fúngico embora relativamente dispendioso.

De acordo com Araujo (2007), a semente de maracujá é fonte de carbono, nitrogênio, lipídios, proteínas e carboidratos. Deste modo o resíduo da semente de maracujá não necessitou de complemento nutricional para o crescimento das linhagens fúngicas deste trabalho. Portanto é um substrato promissor com alto potencial e a vantagem de não ser utilizado em alimentação humana ou animal e por ser um resíduo industrial que apresenta baixo custo.

4.5 Análise da produção de conídios fúngicos em substratos

Conforme Tabela 9, observa-se um aumento na produção de conídios para *M. anisopliae*, *I. javanica*, *Penicillium* sp. em ambos substratos testados. *B. bassiana* apresentou uma baixa produção de conídios nos substratos testados não diferindo estatisticamente entre os substratos. *I. javanica* apresentou maior média de produção de conídios no substrato de resíduo de sementes de maracujá do primeiro ao quinto dia. Mas, pela análise de variância, a referida média não apresenta diferença ao nível de 5% de significância das médias de produção de conídios no segundo e quarto dias.

Tabela 9- Comparação de médias de produção de conídios/mL do primeiro ao quinto dia em substratos de arroz e resíduo de semente de maracujá.

<i>Substratos</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i>		<i>Penicillium sp.</i>		<i>I. javanica</i>		<i>B. bassiana</i>	
	Arroz	Maracujá	Arroz	Maracujá	Arroz	Maracujá	Arroz	Maracujá
1º dia	22,80f	31,00 f	50,60ef	31,40 f	28,40f	151,60 cd	40,00f	18,20 f
2º dia	27,60f	31,00 f	73,20 e	48,60 ef	42,00ef	225,20 ab	30,80f	13,20 f
3º dia	60,60 e	59,40 ef	74,40 e	62,00 e	57,80ef	80,00 bc	29,20f	22,00 f
4º dia	86,20de	85,20 de	88,60de	83,80 de	70,00 e	214,60 abc	44,20ef	24,40 f
5º dia	103,0de	102,20 de	82,60 e	83,80 de	98,60de	248,80 a	67,80 e	31,60 f

* médias com letras iguais não apresentam diferença ao nível de 5% de significância, teste de Scheffé.

De acordo com Wraight et al., (2010) alguns hifomycetos possuem determinadas características produção de conídios e germinação rápida, permitindo que o processo de infecção seja completo em poucas horas, com grande produção de conídios, os quais maximizam a dispersão dos patógenos portanto infectivo.

Assim para dar continuidade ao teste de campo as linhagens fúngicas selecionadas foram *M. anisopliae*, *I. javanica* e *Penicillium sp.* por apresentarem resultados satisfatórios tanto em relação ao crescimento e esporulação rápida quanto a mortalidade sobre *N. corniger* e a melhor concentração da suspensão fúngica foi a de 10⁸ conídios/mL.

4.6 Análises do teste em campo

Os dados obtidos no teste em campo com cupinzeiros utilizando suspensões fúngicas na concentração 10⁸ conídios/mL pelos fungos *M. anisopliae*, *I. javanica* e *Penicillium sp.* demonstraram altamente patogênicos e virulentos proporcionando a ocorrência de mortalidade dos cupins inicialmente em 20 dias e ocorrendo desprendimento dos cupinzeiro da base de sustentação em cerca de 30 dias e se repetiram os resultados nos testes de 60 dias figura 17. As condições do ninho, temperatura moderada e alta umidade foram favoráveis ao crescimento, sobrevivência e propagação dos fungos entomopatogênicos enfatiza Sun et al.; (2002).



Figura 17- Desprendimento dos cupinzeiros de *Nasutitermes corniger* em árvores, tetos de edificações no Setor Sul do campus Universidade Federal do Amazonas aplicação da suspensão fúngica de *Penicillium* sp. na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL. (A) Caule da árvore após desprendimento do cupinzeiro (B) Teto do edifício após desprendimento do cupinzeiro (C) cupinzeiro recém caído da árvore (D) cupinzeiro desprendido do teto.

Foto: Oliveira, G.; (2009)

De acordo com os tratamentos os resultados obtidos demonstraram que *Penicillium* sp. apresentou uma alta patogenicidade e virulência para todos os cupinzeiros testados tanto em substrato de arroz quanto em resíduo de maracujá e mostrou-se eficiente atingindo 100% de mortalidade dos cupins *N. corniger* figura 17.

Os resultados comprovaram que o fungo *I. javanica* apresentou-se eficiente atingindo 50% de mortalidade em um a cada três cupinzeiros tanto em substrato de arroz quanto em resíduo de semente de maracujá e na seqüência *M. anisopliae* apresentou-se eficiente de dois de cada três cupinzeiros com mortalidade de 50% em substrato de arroz e 100% em resíduo de semente de maracujá tabela 10. Esses resultados corroboram com Milner (2003) que em estudos feitos em laboratório e campo demonstraram a eficiência de *M. anisopliae* F1610 no controle dos cupins *C. lacteus* (Froggatt) e *N. exitiosus*. E que fatores comportamentais são responsáveis por limitar a dispersão de epizootias dentro das colônias dos térmitas; mas testes de campo têm mostrado que, quando quantidades suficientes de conídios são bem distribuídas na área central do cupinzeiro (centro de reprodução), são eficientes na mortalidade das colônias de *C. lacteus* e de *N. exitiosus*.

Estudos em laboratório e no campo foram realizados na Austrália visando à transmissão entre indivíduos e a indução de epizootia em colônias de *N. exitiosus*. Altos níveis de mortalidade nos grupos de cupins, em laboratório, foram obtidos pela adição de operários inoculados com *M. anisopliae*. Este fungo, polvilhado ou pulverizado em indivíduos de colônias no campo, no ninho ou em locais de coleta de alimento, foi capaz de iniciar epizootias nas colônias. Através de amostragens de indivíduos dos cupinzeiros, foi observado que a doença persistiu 15 semanas após a inoculação (HANEL e WATSON, 1983).

Tabela 10- Teste em campo- Infecção fúngica 10^8 conídios/mL mostrando a relação de volume dos cupinzeiros em litros (L) e a mortalidade em diferentes substratos de resíduo de semente de maracujá e arroz.

	FUNGOS	VOLUME (L)	SUBSTRATO	MORTALIDA DE
1	Controle <i>Isaria javanica</i> (água)	73,5	Arroz	0%
2	<i>I. javanica</i>	45,0	Arroz	50%
3	<i>I. javanica</i>	48,7	Arroz	100%
4	<i>I. javanica</i>	57,4	Arroz	100%
5	Controle <i>Isaria javanica</i> (água)	350,2	R.S. de Maracujá*	0%
6	<i>I. javanica</i>	22,9	R.S. de Maracujá*	100%
7	<i>I. javanica</i>	28,0	R.S. de Maracujá*	50%
8	<i>I. javanica</i>	32,1	R.S. de Maracujá*	100%
9	Controle <i>Metarhizium</i> <i>anisopliae</i> (água)	56,3	Arroz	0%
10	<i>M. anisopliae</i>	15,5	Arroz	100%
11	<i>M. anisopliae</i>	55,7	Arroz	50%
12	<i>M. anisopliae</i>	66,0	Arroz	50%
13	Controle <i>Metarhizium</i> <i>anisopliae</i> (água)	22,4	R.S. de Maracujá*	0%
14	<i>M. anisopliae</i>	15,3	R. S de Maracujá*	100%
15	<i>M. anisopliae</i>	41,0	R. S de Maracujá*	100%
16	<i>M. anisopliae</i>	76,2	R. S de Maracujá*	50%
17	Controle <i>Penicillium</i> sp.(água)	50,3	Arroz	0%
18	<i>Penicillium</i> sp.	26,9	Arroz	100%
19	<i>Penicillium</i> sp.	27,2	Arroz	100%
20	<i>Penicillium</i> sp.	60,7	Arroz	100%
21	Controle <i>Penicillium</i> sp. água)	125,3	R.S. de Maracujá*	0%
22	<i>Penicillium</i> sp.	1,3	R.S. de Maracujá*	100%
23	<i>Penicillium</i> sp.	13,4	R.S. de Maracujá*	100%
24	<i>Penicillium</i> sp.	28,6	R.S. de Maracujá*	100%

*Resíduo de semente de maracujá

4.7 Identificação molecular / taxonômica de *Penicillium* sp.

O método utilizado para a extração do DNA do micélio da linhagem *Penicillium* sp. mostrou-se eficiente, resultando em quantidade de DNA suficiente para a utilização da técnica de PCR e seqüenciamento.

A região conservada do gene DNA ribossomal (rDNA) de ITS foi amplificada com sucesso utilizando oligonucleotídeos iniciadores ITS1/ITS4 permitindo a amplificação de uma

banda única representando um fragmento de DNA de aproximadamente 600 pares de base (pb) que pode ser observada na figura 18.

A região ITS é uma região de DNA amplamente seqüenciada em fungos. Essa região tem sido útil para a sistemática molecular em nível de espécie, e até mesmo dentro das espécies (por exemplo, para identificar as raças geográficas). Devido seu maior grau de variação do que outras regiões gênicas de rDNA variação entre repetições individuais rDNA às vezes pode ser observada tanto no ITS quanto regiões (espaço inter gênico IGS) (GARDES e BRUNS, 1993).

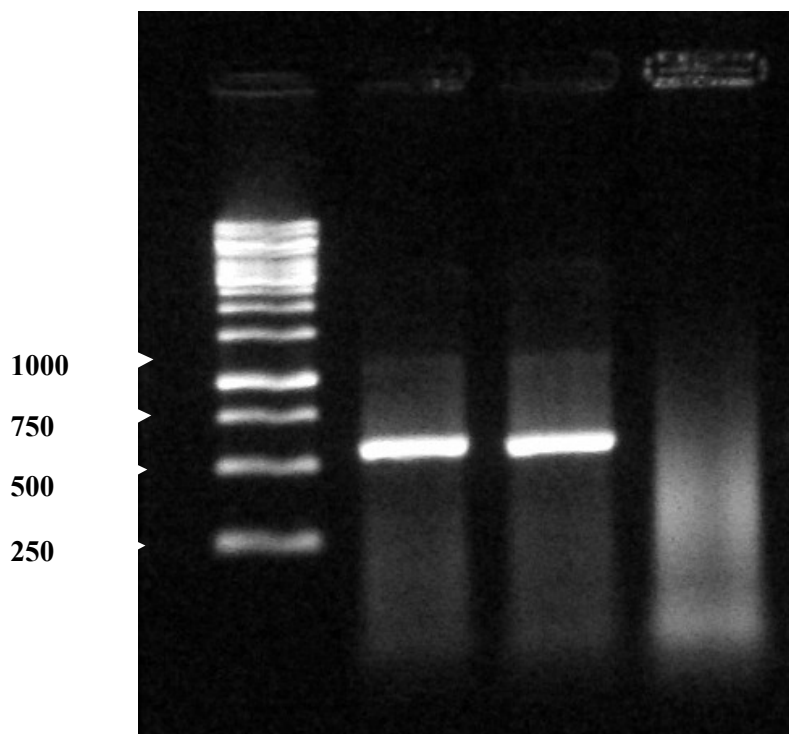


Figura 18- Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, da amplificação da região ITS do rDNA do isolado *Penicillium* sp. **Poço 1** – Marcador de peso molecular de 1 Kb da fermentas; **Poço 2** – Amostra 1 (*Penicillium* sp.); **Poço 3** - Amostra 2 (*Penicillium* sp.), **Poço 4** – controle negativo.

Para o seqüenciamento da região ITS do rDNA foi utilizado o produto direto da PCR, pois não apresentou bandas inespecíficas. Após o resultado do seqüenciamento à análise da qualidade das seqüências via Phred, o qual demonstra máximo de qualidade figura 19.

```

> 9_A02.ab1 ( View 9_A02.scf eletropherogram) / View 9_A02.ab1 list with
score
CATGGGGTTCGATACGGNATCCGAGGTCAACCTGGATAAAAATTGGGTGATCGGC
AAGCGCCGGCCGGCCCTCCTTAAAGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGG
ACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTCGGGCCCGTCCCCGGGATCGGAGGACGGGGCC
AACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCG
GAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATCACTGAATTTGCAA
TTCACATTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATC
CGTTGTTGAAAGTTTTAAATAATTTATATTTTCACTCAGACTACAATCTTCAGACAG
AGTTCGAGGGTGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGGCGTAAGCCCCCGGCGGC
CAGTTAAGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAAGGTAATAAACACGGGTGGGAGGTT
GGACCCAGAGGGCCCTCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAGC
GAGTGAGGGCCCTCGGGTCCACCTCCACCCGTGTTATTTTCCTTGTGGTTCGGC
GGCCGCCTT

```

Figura 19- Análise de qualidade via Phred, com a ferramenta PHPH disponível na página da UNB.

Fonte: (<http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>)

Os resultados da análise da identificação do *Penicillium* sp. pela comparação das seqüências depositadas em bases de dados públicos (Gene Bank), mostrou que a identificação molecular obtida da amostra denominada p1 permitiu um alinhamento com qualidade boa, alinhando com a sequência nucleotídica que corresponde a identificação do fungo *Penicillium griseofulvum* (acesso [JN032682.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN032682.1); Submitted (22-JUN-2009) Plant Systematics and Geography, University of Warsaw, Al. Ujazdowskie 4, Warsaw 00-478, Poland). Portanto podemos inferir a similaridade com o *P. griseofulvum* corroborando com a identificação taxonômica realizada com base nas características morfológicas que identificou através da cultura pura do isolado 4DPA *P. griseofulvum* SAMSON e FRISVAD (2004).

4.8 Identificação Taxonômica

4.8.1 *Penicillium* sp.

A identificação foi realizada com base nas características morfológicas de acordo com literatura especializada Pitt (1979); Samson e Frisvad, (2004) da identificação da cultura: Isolado 4DPA = *Penicillium griseofulvum* Dierckx 1901 Isolado 4DPA = *Penicillium griseofulvum* Dierckx 1901.

4.8.2 *Nasututermes corniger*

Para a identificação dos cupins foi utilizada a chave taxonômica de Constantino (1999) com base nas características morfológicas dos invertebrados, constatou que se trata da espécie *N. corniger* (Motshulsky) (Nasutitermitinae; Termitidae). Além disso, foi feito a comparação com o material depositado na coleção de cupins do laboratório de Distemática, biologia e ecologia de invertebrados do solo da Coordenação de Pesquisa em Entomologia do INPA.



Figura 20 - Cupins utilizados para identificação pela chave taxonômica de Constantino (1999) com base nas características morfológicas

Foto: Oliveira, G. (2010)

5. CONCLUSÃO

1. 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.
2. O maior índice médio de produção de conídios obtidos de cadáveres de *N. corniger* foram encontrados em *Penicillium* sp. e *I. javanica* na concentração 10^7 e 10^8 conídios/mL.
3. Não foram observadas mudanças nos aspectos morfológicas das colônias reisoladas de cadáveres dos cupins *N. corniger*.
4. O substrato resíduo da semente de maracujá apresentou excelente fonte nutricional para produção e crescimento fúngico comparado ao arroz e foi utilizado para preparação do produto.
5. O tempo de prateleira do produto biocontrolador de cupins continuou eficiente para mortalidade dos cupins por trinta dias.
6. A identificação linhagem do *Penicillium* sp. utilizado nesse trabalho mostrou maior similaridade *P. griseofulvum* (taxonomia clássica e molecular).
7. A identificação do cupim foi através da taxonomia clássica e o resultado foi *Nasutitermes cornige*.
8. No teste em campo eficiência dos fungos estudados *M. anisopliae*, *I. javanica* e *Penicillium* sp. causaram mortalidade de 50 a 100% nos cupinzeiros de *N. corniger* no período de 30 e 60 dias, comprovando que são promissores para o controle desta praga.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, A.C.; PEREIRA, K.C.A.; CUNHA, R.M.; VEIGA, A.F.S.L.; ATHAYDE, A.C.R.; LIMA, E.A.L.A. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridium* sobre *Nasutitermes coxipoensis*. Neotropical Entomology , Londrina, p. 585-589, 2005.

ALEXANDRE, T.M.; NEVES, P.M.O.J.; SANTORO, P.H. Controle associado de *Alphitobius diaperinus* com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* e inseticidas químicos. Arquivo Instituto Biológico, São Paulo, p. 481-489, 2008.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. Ed. Controle Microbiano de Insetos. 2. ed. Piracicaba: FEALQ / USP, p. 289-381, 1998.

ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO, Jr.; ALVES, L.F. Técnicas de laboratório. In: ALVES, B.B. Controle Microbiano de Insetos. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, p. 637-712, 1998.

ALVES, S.B.; BERTI-FILHO, E. Controle dos cupins nas construções urbanas e rurais. Boletim Técnico ESALQ/CENA. Piracicaba: PCL/USP, p. 12, 1995.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; VIEIRA S.A.; TAMAI, M.A. Fungos Entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina, In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba: FEALQ, p. 69-110, 2008.

ALVES, S.B.; MORAES, S.A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, p. 765-777, 1998.

ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Distúrbios fisiológicos provocados por entomopatógenos, p. 39-52. In S.B. Alves, Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, p. 1163, 1998.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M.; WILEY, J. Introductory Mycology. New York. p. 868, 1996.

ANDERSON, J.M. Why should we care about soil fauna? Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, p. 885-842, 2009.

ANDERSON, M. The evolution of eusociality. Annual Review Ecology Systematics, p.165-189, 1984.

ARAÚJO, L.M. Produção de alimentos funcionais formulados com xilitol a partir de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e Maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), Tese (Doutorado Multi-institucional em Biotecnologia)-Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 2007. p 180

ARAUJO Jr J.M, MARQUES E.J. OLIVEIRA, J.V. Potencial de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Bauveria bassiana* do óleo de nin no controle de pulgões *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera): Aphididae). Neotrop Entomol p. 520-525, 2009

ATHAYDE, A.C.R. Patogenicidade de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviride* sobre ovos, larvas e teleóginas de *Boophilus microplus* da região semi-árida paraibana. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife. p.138. 2002

AZEVEDO, J.L. Controle microbiano de insetos-praga e seu melhoramento genético. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). *Controle biológico*. Jaguariúna: EMBRAPA, p. 69-96, 1998.

AZEVEDO, J.L. O uso dos fungos em biotecnologia. In: L.A. SEREFINE, M. N. BARROS e J.L. AZEVEDO (eds), *Biotecnologia: Avanços na agricultura e na agroindústria*. Guaíba, Livraria e Editora Agropecuária. p. 433, 2001.

AZEVEDO, R.N.; NETO, J.R.O. Componentes químicos voláteis (Terpenos) da secreção defensiva de *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Termitidae: Nasutitermitinae), coletados na

região urbana de Goiânia. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil. Caxambu – MG. p. 233, 2007.

BANDEIRA, A.G.; GOMES, J.I.; LISBOA, P.L.B.; SOUZA, P.C.S. Insetos pragas de madeira de edificações em Belém, Para. EMBRAPA- CPATU, p. 25, 1989.

BANDEIRA, A.G. Danos causados por cupins na Amazônia Brasileira. p. 87-98. In: FONTES L.R.; BERTI-FILHO, E. (eds.), Cupins. O desafio do conhecimento. Fundação Escola de Agricultura Luiz de Queiroz, p. 512, 1998.

BANDEIRA, A.G.; MIRANDA, C.S.; VASCONCELOS, A. Danos causados por cupins em João Pessoa, Paraíba- Brasil. p.75-85. In FONTES, L. R.; BERTI-FILHO, E. (eds.), Cupins. O desafio do conhecimento. Fundação Escola de Agricultura Luiz de Queiroz, p. 512, 1998.

BALACHANDER, M.; REMADEVI, O.K.; SASIDHARAN, T.O.; SAPNA BAI, N. Infectivity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) isolates to the arboreal termite *Odontotermes* sp. (Isoptera: Termitidae) *Journal of Invertebrate Pathology. of Trop. Insec. Scien.*, p. 202-207, 2010.

BAO, L.L.; YENDOL, W.G. Infection of the eastern subterranean termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar) with the fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo)Vuill. *Entomophaga*, p. 345-352, 1971.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3rd. ed. Minneapolis: Burgess Publ., p. 241, 1972.

BARROS, N.M.; VARGAS, L.R.B.; SCHRANK, A. Fungos como agentes de controle de pragas. In: *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Orgs.: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. 2 ed. Revisada e ampliada. Caxias do Sul: EDUCS. p. 213, 2010.

BENHAM, R.W.; MIRANDA, J.L. The genus *Beauveria*, morphological and taxonomical studies of several species and of two strains isolated from wharf-piling bores. *Mycologia*, p. 727-746, 1953.

BOUCIAS, D.C.; PENDLAND, J.C. Principles of insect pathology. Kluwer Academic Publishers Group. Boston. p. 537, 1998.

BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. Fungal biological control agents: progress, problems and potencial. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. Fungi as biocontrol agents. CABI publishing, Willingford, Oxford, USA, p. 398, 2001.

CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C. The fungi. San Diego: Academic, p. 428, 1994.

CATALÃO, G.L. Cultivo de *Dicyma pulvinata* para o biocontrole de *Microcyclus ulei* em *Hevea* spp. Monografia de Graduação. Brasília, DF, Faculdades da Terra de Brasília. p. 31, 2004.

CONSTANTINO, R. Chave ilustrada para identificação dos gêneros de cupins (Insecta: Isoptera) que ocorrem no Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, v. 40, p. 387-448, 1999.

CONSTANTINO, R.; DIANESE, E.E.C. The urban termite fauna of Brasília, Brazil. *Sociobiology*, p. 323-326, 2001.

CONSTANTINO, R. The pest termites of South America: taxonomy, distribution, and status. *Journal of Applied Entomology*, Berlin, p. 355-365, 2002a.

CONSTANTINO, R. Notes on the type species and synonymy of the genus *Nasutitermes* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae). *Sociobiology* p.533- 537, 2002b.

CONSTANTINO, R. Padrões de diversidade e endemismo de térmitas no bioma Cerrado. In: Aldicir Scariot; José Carlos Souza Silva; Jeanine Maria Felfili. (Org.). Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p. 319- 333, 2005.

CÓRDOVA, K.R.V, Características Físico-Químicas da Casca do Maracujá Amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa Degener) obtida por secagem, Curitiba. p. 223-222, 2005.

COSTA LIMA, A. Insetos do Brasil. 1º Tomo. Rio de Janeiro, Escola Nacional de Agronomia (Série Didática, n. 2) p. 470, 1938.

COSTA-LEONARDO, A.M.; BARSOTTI, R.C.; CAMARGO-DIETRICH, C.R.R. Review and update on the biology of *Coptotermes havilandi* (Isoptera: Rhinotermitidae). Sociobiology, p. 339-356, 1999.

COSTA-LEONARDO, A.M. Cupins-praga: morfologia, biologia e controle. Rio Claro, Ana Maria Costa-Leonardo, p. 128, 2002.

CUNHA, G.A. Dicionário histórico das palavras portuguesas de origem tupi. 3ª ed., São Paulo: Melhoramentos & EDUSP, p. 357, 1989.

CUNHA, F.M.; TEIXEIRA, V.W.; TEIXEIRA, A.A.C.; Albuquerque, A.C.; Alves, L. C.; Lima, E.C.L.A. Hemocyte Characterization of *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae) Workers and Hemocyte Evaluation after Parasitism by *Metarhizium anisopliae*. Neotrop Entomol p.293-297, 2009.

DELATE, K.M.; GRACE, J.K.; TOME, C.M. Potential use of pathogenic fungi in baits to control the formosan subterranean termite (Isoptera, Rhinotermitidae). Journal of Applied Entomology, p. 429-433, 1995.

DOMSCH, K.H,W. GAMS, TH e ANDERSON. Compêndio de fungos do solo. Academic Press, London, UK. p. 178, 1980.

DOMSCH, H.H.; GAMS, W. Compendium of Soil Fungi. San Francisco: IHW-Verlag, p. 856, 1993.

DRIVER, F.; MILNER, R.F.; TRUEMAN, W.H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequence data. *Mycological Research*, p. 134-150, 2000.

EDWARDS, R.; MILL, A.E. *Termites in buildings: their biology and control*. East Grinstead: Rentokil Limited, p. 261, 1986.

ELEOTÉRIO, E.S.R. Levantamento e identificação de cupins (Insecta: Isoptera) em área urbana de Piracicaba. *Ciência Florestal*, Santa Maria, p. 125-139, 2000.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. 2d. Caixias do Sul: Educs, p. 638, 2010.

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. Controle biológico. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/conbio/conbio.html>>. Acesso em: 25 agosto 2011.

EGGLETON, P.; BECCALONI, G.; INWARD, E.D. *Save Isoptera: A comment on Inward* *Biology letters*. p. 564–565, 2007

FARIA, M.R.; MAGALHÃES, B.P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, p. 30-33, 2001.

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*, p. 319-328, 1992.

FONTES, L.R. Cupins em áreas urbanas. *In*: BERTI FILHO, E. e FONTES, L.R. eds. *Alguns aspectos atuais da biologia e controle de cupins*. Piracicaba, FEALQ. p. 57-76, 1995.

FONTES, L.R. Considerações sobre a complexidade da interação entre cupim subterrâneo, *Coptotermes havilandi*, e a arborização no ambiente urbano. In: FONTES, L.R.; BERTI FILHO, E. eds. Cupins. O desafio do conhecimento. Piracicaba, FEALQ. p. 109-124, 1998.

FONTES, L.R.; ARAÚJO, R.L. Os cupins. In: MARICONI, F.A.M. (Ed.) Insetos e outros invasores de residências. Piracicaba: FEALQ, p. 35-90, 1999.

FONTES, L.R. Cupins e cidades: implicações ecológicas e controle. Dedalus. Acervo. Piracicaba: ESALQ /USP. p. 65-95, 2002.

FONTES, L.R.; MILANO, S. Termites as an urban problem in South America. *Sociobiology*, Chico, p. 103-151, 2002.

FULLER, C.A. Fungistatic activity of freshly killed termite, *Nasutitermes acajutlae*, soldiers in the Caribbean. *Jour. of Insec. Scien.* p. 333-450, 2007.

GARDES, M.; BRUNS, T.D. [ITS primers with enhanced specificity](#) for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* p. 113-118, 1993

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S. Entomologia Agrícola. 2ª ed., São Paulo: FEALQ/USP, p. 920, 2002.

GAMS, W.; ROZSYPAL, J. *Metarhizium flavoviride* n. sp. isolated from insects and soil. *Acta Botânica Neerlandica*, p. 518-521, 1973.

GRACE, J. K. Biological control strategies for suppression of termites. *Journal of Agricultural Entomology*, p.281-289, 1997.

GRASSÉ, P. P. Termitologia: anatomie, physiologie, reproduction des térmites. Paris: Masson, p. 676, 1982.

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

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 454-500, 1999.

HANEL, H. A bioassay for measuring the virulence of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (Fungi Imperfect) against the *Nasutitermes exitiosus* (Hill) (Isoptera, Termitidae). *Zeitschrift Angewandte Entomologie*, p. 9-18, 1981.

HANEL, H. Selection of a fungus species, suitable for the biological control of the termite *Nasutitermes exitiosus* (Hill) (Isoptera, Termitidae). *Zeitschrift Angewandte Entomologie*, p. 237-245, 1982.

HANEL, H.; WATSON, J.A.L. Preliminary field test on the use of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Nasutitermes exitiosus* (Hill) (Isoptera: Termitidae). *Bulletin Entomological Research*, p. 305-313, 1983.

HAWKSWORTH, D.L.; ROSSMAN, A.Y. Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology*, p. 888-891, 1997.

HEADRICK, D.H.; GOEDEN, R.D. Biological control as a tool for ecosystem management. *Biological Control*, p. 29-257, 2001.

HUSSAIN, A.; AHAMED, S.; SHAHID, M. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* for controlling subterranean termites. *Neotrop Entomol*, p. 244-250, 2011.

JACKSON, T.A.; ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Success in biological control of soil-dwelling insects by pathogens and nematodes. In: *Biological control: measures of success*. Gurr, G.; Wratten S. Ed. Academic Press. London. p. 271-296, 2000.

KENDRIK, W.B. Taxonomy of Fungi Imperfect. Toronto: University of Toronto Press, p.390, 1971.

KIMATI, H. Fungos. In: GALLI, F., Manual de Fitopatologia. Editora Agronômica Ceres, 2 ed. São Paulo. 1978.

LAI, P.Y.; TAMASHIRO, M.; FUJII, J.K. Pathogenicity of six strains of entomogenous fungi to *Coptotermes formosanus*. Journal of Invertebrate Pathology, p. 1-5, 1982.

LECUONA, R.E.; EDELSTEIN, J.D.; BERRETTA, M.F.; ROSA R. F. L.A.; ARCAS, J.A. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) strains as potencial agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Journal of Medical Entomology, p. 172- 179, 2001.

LEE, K.E.; WOOD, T.G. Termites and soils. London: Academic Press, p. 251, 1971.

LELIS, A.T. Termite problem in São Paulo city – Brazil. In: LENOIR, A.; ARNOLD, G.; LEPAGE, M. *Les insects sociaux*. Paris: Université Paris Nord. Trabalho apresentado no 12º CONGRESS OF THE INTERNATIONAL UNION FOR THE STUDY OF SOCIAL INSECTS – IUSSI. p. 253, 1994.

LELIS, A.T. A nest of *Coptotermes havilandi* (Isoptera, Rhinotermitidae) off ground level, found in the 20th story of a building in the city of São Paulo, Brazil. Sociobiology p. 241-245, 1995.

LOUREIRO, E.S.; MOINO Jr, A. Pathogenicity of Hyphomycet Fungi to Aphids *Aphis gossypii* Glover and *Myzus Persicae* (Sulzer) (Hemiptera:Aphididae). Neotrop Entomol p. 660-665, 2006

LUANGSA-ARD, J.J.; HYWEL-JONES, N.L.; MANOCH, L.; SAMSON, R.A. On the relationships of *Paecilomyces* sect. Isarioidea species. Mycological Research. p. 581-589, 2005.

LUI, H.; SKINNER, M.; BROWNBRIDGE, M.; PARKER, B.L. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Invertebrate Pathology*, p. 139 - 147, 2003.

LUNA-ALVES LIMA, E.A. Características Citológicas e Genéticas de Linhagens Selvagens, Mutantes e Diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. Rio de Janeiro, Tese (Doutorado em Biologia), UFRJ, p. 260, 1985.

LUNA-ALVES LIMA, E.A. Aspectos taxonômicos e citológicos de Hyphomycetes (Deuteromycotina) entomopatogênicos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, p.17-20, 1989.

LUNA-ALVES LIMA, E.A.; TIGANO, M.S. Citologia de estruturas leveduriformes de *Beauveria bassiana* em meios de cultura líquidos e na hemolinfa de *Spodoptera frugiperda*. *Revista de Microbiologia*, p. 85-94, 1989.

MACLEOD, D.M. Investigations on the general *Beauveria* Vuill. And *Tritirachium* Limber. *Canadian Journal of Botany*, p. 818-893, 1954.

MALAGODI, M.; VEIGA, A.F.S.L. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o cupim *Nasutitermes* (Dudley) (Isoptera: Termitidae) em laboratório. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, p. 315-321, 1995.

MARANHÃO, Z.C. *Entomologia Geral*. 3ª ed. São Paulo: Livraria Nobel, p. 514, 1978.

MARTIUS, C. Perspectivas do controle biológico de cupins (Insecta, Isoptera). *Revista Brasileira de Entomologia*, Curitiba, p. 179-194, 1998.

MATIAS, G.R.R.S.; ALBUQUERQUE, A.C.; MATIAS, M.P.; Os cupins urbanos em Jardim Paulista, Paulista-PE. *Diversidade e controle. O Biológico* p. 58-61, 2006.

MANACHINI, P.L.; FORTINA, M.G.; PARINI, C. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters*. p. 219-224, 1987.

MELO, D.F. Produção, armazenamento, estabilidade e eficiência de linhagens de *Dicyma pulvinata* (Berk e M. A. Curtis) *Arx* [syn. *Hansfordia pulvinata* (Berk e Curtis) no biocontrole para o mal-das-folhas da seringueira. Tese de Mestrado, Brasília, DF, Universidade de Brasília, p. 130, 2006.

MENEZES, E.B.; AGUIAR-MENEZES, E.L.; BICALHO, A.C. Cupim arbóreo, *Nasutitermes* spp. mais uma ameaça nas cidades. *Vetores e pragas*, p. 26-29, 2000.

MIGIRO, L.N.; MANIANIA, N.K.; CHABI-OLAYE, A.; VANDENBERG, J. Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) isolates to the adult pea leafminer (Diptera: Agromyzidae) and prospects of an autoinoculation device for infection in the field. *Biological Control – Microbials*, p. 468-475, 2010.

MILANO, S.; FONTES, L.R. Cupins como pragas urbanas na América do Sul. In: MILANO, S (Ed.) Cupim e cidades: implicações ecológicas e controle. São Paulo. p. 33-64. 2002a.

MILANO, S.; FONTES, L.R. Termite pests and their control in urban Brazil. *Sociobiology*, p. 163-177, 2002b.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology*, p. 263-73, 1986.

MILNER, R.J. Application of biological control agents in mound building termites (Isoptera: Termitidae) Experiences with *Metarhizium anisopliae*. *Sociobiology*, p. 419-428, 2003.

NEVES, P.J.; ALVES, S.B. Controle associado de *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832) (Isoptera: Termitidae) com *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e imidacloprid. *Scientia agricola*, p. 301-311, 1999.

NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S. B. External events related to the infection of *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Neotrop Entomol* p., 051-056, 2004.

OLIVEIRA, C.N.; NEVES, P.M. O.J.; KAWAZOE, L.S. Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations, *Scientia Agricola*, p. 663-667, 2003.

OLIVEIRA, M.A.P. Efeitos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. sobre os parâmetros biológicos e fisiológicos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. p. 57, 2006.

OLIVEIRA, L.M. Benefícios comprovados de óleos Brasileiros; C & T. Beraca – Brasil. p. 5, 2003.

PAIVA, R. Cupins e o patrimônio histórico edificado. In L.R. FONTES; E. BERTI FILHO (ed.) *Cupins: O desafio do conhecimento*. Piracicaba, FEALQ, p. 512. 1998.

PANDEY, A.; et al. *Enzyme Technology*. 1 ed. New Delhi: Asiatech Publishers, p. 760, 2005. |

PIRES, L.M.; MARQUES, E.J.; OLIVEIRA, J.V.; ALVES, S.B. Selection of Isolates of Entomopathogenic Fungi for Controlling *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) and their Compatibility with Insecticides Used in Tomato Crop. *Neotrop. Entomol*, p. 977-984. 2010.

PITT J.I. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press. Inc. London. p. 634, 1979.

RATH, A.C. The use of entomopathogenic fungi for control of termites. *Biological Science and Technology*, p. 563-581, 2000.

RATH, A.C.; TIDBURY, C.A. Susceptibility of *Coptotermes acinaciformis* (Isoptera:Rhinotermitidae) and *Nasutitermes exitiosus* (Isoptera:Termitidae) to two Commercial Isolates of *Metarhizium anisopliae*. *Sociobiology*. p. 67-72, 1996.

RIBEIRO, S.M.A. Caracterização Citológica e Sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, em folhas de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Criptógamos) Universidade Federal de Pernambuco, Recife. p. 95, 1990.

RIBEIRO, S.M.A.; LUNA-ALVES LIMA, E.A.; ASSUNÇÃO, W.T.G.; et al. Behavior and characteristics of a wild strain of *Metarhizium anisopliae*. *Revista Brasileira de Microbiologia*, p. 97-100, 1992.

RICHARDS, O.; DAVIES, R.G. Tratado de Entomologia Imm's. *Classificación y Biología*. Barcelona: Ediciones Omega, p. 998, 1984.

ROHDE, C.; ALVESI, L.F.; NEVES, P.M. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorok. contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*, p. 231-40, 2006.

ROISIN, Y. Diversity and evolution of caste patterns. In: ABE, T.; BIGNELL, D.E. (Eds.) *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, and Ecology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 95-119, 2000.

ROMBACH, M.; HUMBER, R. A.; ROBERTS, D.W. *Metarhizium flavoviride* var. nov., a pathogen of plant and leafhoppers on rice in the Philippines and Solomon Islands. *Mycotaxon*, p. 87-92, 1986.

ROSENGAUS, R.B.; GULDIN, M.R.; TRANIELLO, J.F.A. Inhibitory effect of termite fecal pellets on fungal spore germination. *Journal of Chemical Ecology*, p. 1697-1708, 1998.

ROSENGAUS, R.B.; TRANIELLO, J. F. A.; CHEN, T.; BROWN, J. J.; KARP, R. D. Immunity in a social insects. *Naturwissenschaften*, p. 588-591, 1999a.

ROSENGAUS, R.B.; JORDAN, C.; LEFEBVRE, M.L.; TRANIELLO, J.F.A. Pathogen alarm behavior in a termite: A new form of communication in social insects. *Naturwissenschaften*, p. 544-548, 1999b.

ROSENGAUS, R.B.; LEFEBVRE, M.L.; TRANIELLO, J.F.A. Inhibition of fungal spore germination by *Nasutitermes*: Evidence for a possible antiseptic role of soldier defensive secretions. *Journal of Chemical Ecology*, p. 21-39, 2000.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; OORSCHOT, C.V. Introdução aos fungos de origem alimentar. *Schimmelcultures voor Centraalbureau, Baarn, Países Baixos*. p. 2-120, 1984.

SAMSON, R.A.; FRISVAD, J.C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. *Studies in Mycology*. p. 1-173, 2004.

SCORSETTI, A.C.; HUMBER, R.A.; GREGORIO, C. New records of entomopathogenic fungi infectin *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorun*, pests of horticultural crops, in Argentina. *Biocontrol*. p. 787-796, 2008.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F. G. *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*. 1ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 408, 2004.

SILVA, S.B.; BITTENCOURT, V.R. Avaliação da resposta celular de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) inoculadas com *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium corylophilum* ou *Fusarium oxysporum*. *Neotropical Entomology*, p. 231-40, 2006.

SOCOL, C.R. D.; BRAND, R.; MOHAN, J.A.L. RODRIGUEZ,; PANDEY, A. Coffee husk: a potential alternative material for bioprocesses *Metals Mater. Process.*, p. 195–206, 2005.

SPECHT, A.; AZEVEDO, J.L.; LIMA, E.A.L.; BOLDO, J.T. Ocorrência do fungo entomopatogênico *Isaria javanica* (Frieder. e Bally) Samson & Hywell-Jones (Fungi: Sordariomycetes) em lagartas de *Lonomia obliqua* Walker (Lepidoptera: Saturniidae: Hemileucinae). *Revista Brasileira Entomologica*, p. 493-494, 2009.

SU, N.Y.; BAN, P. M.; SCHEFFRAHN, R. H. Control of subterranean termite populations at San Cristóbal and El Morro, San Juan National Historic Site. *Journal of Cultural Heritage*, p. 217-225, 2000.

SUN, J.; FUXA, J.R.; HENDERSON, G. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Coptotermes formosanus* *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Invertebrate Pathology*, p. 78-85, 2002.

TATE, P. Notes on the genera *Ectomyces* and *Termitaria*, fungi parasitic on termites. *Parasitology*, p. 77-78, 1928.

TRANIELLO, J.F.A.; ROSENGAUS, R.B.; SAVOIE, K. The development of immunity in a social insect: evidence for the group facilitation of disease resistance. *Proceeding Academic Science*, p. 6838-6842, 2002.

TOCCHINI, R. P. III Processamento: produtos, Caracterização e Utilização. In: Maracujá: cultura, matéria-prima e aspectos econômicos. 2. ed. Revista e ampliada. Campinas: Ital, p. 161-175, 1994.

TORALES, G.J.; ARMÚA, A.C. Contribucion al conocimiento de las térmitas de Argentina (proviniente de Corrientes), *Nasutitermes coniger* (Isoptera: Termitidae). Primeira parte. *FACENA*, p. 206-222, 1986.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. Transactions of the British Mycological Society, p. 407-411, 1976.

VILAS BOAS, A.M.; ANDRADE, R.M.; OLIVEIRA, J.V. Diversificação de meios de cultura para produção de fungos entomopatogênicos. Arquivo de Biologia e Tecnologia, p. 123-128, 1996.

VILCINSKAS, A.; GOTZ, P. Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system *Advam. Parasitology*. p. 267-313, 1999.

WANG, C.; HU, G.; LEGER, S.T. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genet Biology*, 2005.

WILSON, E. O. The Insect Societies, Cambridge, Mass, Harvard University Press. 1971.

WRAIGHT, S.P.; RAMOS, M.E.; AVERY, P.B.; JARONSKI, ST; VANDENBERG, J. D. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops, *Journal of Invertebrate Pathology*, p. 186–199, 2010.

WRIGHT, M.S.; CONNICK, W.J.; JACKSON, M.A. Use of *Paecilomyces* spp. as pathogenic agents subterranean termites. U.S. Patent 20030095951, 2003.

WRIGHT, M.S.; RAINA, A.K.; LAX, A.R. A strain of the fungus *Metarhizium anisopliae* for controlling subterranean termites. *Journal of Economic Entomology*, p. 1451-1458, 2005.

WHITE, T.J.; T. BRUNS, S. LEE.; J.W. TAYLOR. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, GELFAND, M.A.D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. eds. INNIS, Academic Press, Inc., New York. p. 315-322, 1990.