

PATOGENICIDADE DE FUNGOS DO GÊNERO *Isaria* (PERSOON) SOBRE *Coptotermes gestroi* (WASMANN) (ISOPTERA: RHINOTERMITIDAE) E ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

por

ELIANA MARIA DOS PASSOS

(Sob Orientação da Professora Auristela Correia Albuquerque)

RESUMO

O cupim *Coptotermes gestroi* (Wasmann) é uma praga urbana e agrícola que vem se estabelecendo em muitas áreas do mundo. A utilização de fungos entomopatogênicos é uma opção para minimizar os prejuízos econômicos causados por este cupim. Sabe-se, contudo, que distúrbios fisiológicos ocasionados por um patógeno desencadeiam reações de defesa pelos insetos, como respostas humorais e celulares (hemócitos). Desta forma, a presente pesquisa teve como objetivos: 1. verificar a patogenicidade de isolados de *Isaria farinosa* e *Isaria fumosorosea* ao cupim *C. gestroi* e 2. avaliar qualitativamente e quantitativamente os hemócitos em operários deste inseto desafiado por isolado patogênico e virulento. Todos isolados se mostraram patogênicos, na concentração 10^7 conídios mL^{-1} , ocasionando mortalidades acima de 60% e virulentos, apresentando uma sobrevivência média de 2,0 a 3,9 dias. Porém, o isolado URM-4995 de *I. farinosa* destacou-se como um dos mais virulentos, sendo selecionado para a determinação da CL_{50} , estimada em $6,7 \times 10^5$ conídios mL^{-1} , e estudo da resposta imunológica celular. A média total de hemócitos encontrada na hemolinfa de operários tratados com este isolado, na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} , não foi diferente da média de hemócitos registradas para a testemunha, nos intervalos de 12h, 24h, 36h e 48h. Com relação aos tipos celulares, a análise em microscopia de luz revelou que as células mais frequentes foram plasmatócitos. A contagem

diferencial nos insetos infectados e não infectados, não diferiu significativamente nos intervalos de tempo avaliado, constatou-se somente uma variação em função do tempo para os plasmatócitos e prohemócitos. Assim, os resultados das contagens total e diferencial apresentados demonstram que *I. farinosa*, na concentração 10^7 conídios mL^{-1} , não interferiu quantitativamente e qualitativamente no número de hemócitos de *C. gestroi* e que tal patógeno apresenta-se como promissor para o controle deste inseto.

PALAVRAS-CHAVE: Térmita subterrâneo, controle microbiano, virulento, sobrevivência, resposta imunológica, hemolinfa

PATHOGENICITY OF THE FUNGI GENUS *Isaria* (PERSOON) ON *Coptotermes gestroi*
(WASMANN) (ISOPTERA: RHINOTERMITIDAE) AND IMMUNOLOGIC ASPECTS

by

ELIANA MARIA DOS PASSOS

(Under the Direction of Professor Auristela Correia Albuquerque)

ABSTRACT

The termite *Coptotermes gestroi* (Wasmann) is an urban and agricultural pest that has been established in many areas of the world. The use of entomopathogenic fungi is an option to minimize the economic loss caused by this termite. It is known, however, that physiological disorders caused by a pathogen trigger defence reactions of the insects, such as humoral and cellular responses (hemocytes). Thus, this research had as objectives: 1. to verify the pathogenicity of *Isaria farinosa* and *I. fumosorosea* to the termite *C. gestroi* and 2. to qualify and quantify the hemocytes in workers of this insect challenged by the pathogenic and virulent isolates. All fungi isolates tested, in the concentration of 10^7 conidia mL^{-1} , were pathogenic and virulent causing more than 60% mortality, with an average survival of 2.0 to 3.9 days. However, the isolate URM-4995 of *I. farinosa* was one of the most virulent, being selected for the LC_{50} determination, estimated at 6.7×10^5 conidia mL^{-1} , and to study the cellular immune response. The total average of hemocytes found in the hemolymph of workers termites treated with that isolate, in the concentration of 10^7 conidia mL^{-1} , was not different from the hemocytes average recorded for the control, within 12, 24, 36 and 48 hours intervals. Regarding the cell types, the analysis in light microscopy revealed that the most frequent cells were plasmatocytes. The differential counts in infected and uninfected insects, did not differ significantly within the time

intervals assessed, there was only a change in function of time for plasmatocytes and prohemocytes. Thus, the results of total and differential counts show that *I. farinosa* in the concentration 10^7 conidia mL^{-1} , did not affect quantitatively and qualitatively in the number of hemocytes of *C. gestroi* and that this pathogen appears as a promising candidate for controlling this insect.

KEY WORDS: Subterranean termite, microbial control, virulent, survival, imunological response, hemolymph

PATOGENICIDADE DE FUNGOS DO GÊNERO *Isaria* (PERSOON) SOBRE *Coptotermes gestroi* (WASMANN) (ISOPTERA: RHINOTERMITIDAE) E ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

por

ELIANA MARIA DOS PASSOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Fevereiro - 2009

PATOGENICIDADE DE FUNGOS DO GÊNERO *Isaria* (PERSOON) SOBRE *Coptotermes gestroi* (WASMANN) (ISOPTERA: RHINOTERMITIDAE) E ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

por

ELIANA MARIA DOS PASSOS

Comitê de Orientação:

Auristela C. de Albuquerque – UFRPE

Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Edmilson Jacinto Marques – UFRPE

PATOGENICIDADE DE FUNGOS DO GÊNERO *Isaria* (PERSOON) SOBRE *Coptotermes gestroi* (WASMANN) (ISOPTERA: RHINOTERMITIDAE) E ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

por

ELIANA MARIA DOS PASSOS

Orientador:

Auristela Correia Albuquerque - UFRPE

Examinadores:

Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Edmilson Jacinto Marques - UFRPE

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

A meu Pai, Elisio Passos, exemplo de
honestidade e determinação;
e as minhas irmãs Edna, Ivanete e Neguinha,
pelo incentivo e apoio.

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao doador e mantenedor da vida, Deus, pela infinita misericórdia e amor demonstrado ao permitir mais uma vitória.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação de Entomologia Agrícola pela realização deste curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

Aos professores Genésio Ribeiro (UFS) e Marcelo Mendonça (DEAGRO), culpados por eu está aqui, foram eles que inventaram essa história de fazer mestrado.

As minhas orientadoras Auristela Albuquerque e Valéria Wanderley pelo respeito. Se mereço algum aplauso pelo que fiz é devido a confiança que vocês depositaram em mim.

Ao prof. Edmilson, meu co-orientador, por me acolher no Laboratório de Patologia e pela indispensável colaboração.

Ao professor Álvaro Teixeira, pela ajuda concedida em etapas distintas do curso.

Ao meu Pai, Elisio Passos, por me ensinar na prática como investir em mim mesma e ser determinada.

As minhas irmãs, Edna, Ivanete e Neguinha pelo cuidado e amor. Elas se tornaram minhas mães, depois que nossa mãe descansou.

Aos meus dez irmãos e os dois agregados (cunhados), Edilvan e Raimundo, sou um pouco de cada um de vocês.

Aos meus “trinta e pouco” sobrinhos, em especial a Eduarda, Beatriz, Elaine, Jéssica e Rayane minhas fãs de carteirinha.

As meninas super poderosas: Shênia, Aleuny e Suêrda. Muito obrigado pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Inseto e agregados. Cinthia, Rodrigo, Cléo, Eduardo, Gisely, Fábio, Ricardo e Marco sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido.

Ao pessoal do Labotermes e aos caçadores de cupim Marco, Adelmo, Simone e Rosineide. Esse povo ama procurar cupim!

Ao povinho da hemolinfa, Franklin, Lilian e Alicely. Obrigada pela paciência em me ensinar como brincar de coletar hemolinfa e identificar hemócitos.

A família de Ivano Ferro por me adotarem. Ganhei uma nova família com direito a avós e irmãos mais novos.

Aos velhos e bons amigos da IASD de Campo do Brito-Se e aos novos amigos da IASD de Recife, obrigada mesmo pelas orações e grande amizade.

Ao professor Jorge Braz Torres pela consultoria estatística e aos demais professores da área de Entomologia Agrícola do programa de pós-graduação, obrigada pelo aprendizado.

Aos colegas de curso, especialmente a turma do almoço pelas nossas conversas e desabafos e a André Malacarne pela amizade desenvolvida.

SUMÁRIO

	Páginas
AGRADECIMENTOS	viii
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	01
LITERATURA CITADA.....	06
1 AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DO FUNGO <i>Isaria</i> (PERSON) SOBRE <i>Coptotermes gestroi</i> (WASMANN) (ISOPTERA: RHINOTERMITIDAE).....	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO.....	13
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
LITERATURA CITADA.....	19
3 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DOS HEMÓCITOS EM OPERÁRIOS DE <i>Coptotermes gestroi</i> (WASMANN) (ISOPTERA: RHINOTERMITIDAE) DESAFIADOS PELO FUNGO <i>Isaria farinosa</i> (HOLMSK).....	26
RESUMO	27
ABSTRACT	28
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAL E MÉTODOS.....	30

RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
AGRADECIMENTOS	36
LITERATURA CITADA.....	36

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Os cupins são insetos que apresentam uma ampla distribuição geográfica com grande diversidade e abundância de indivíduos, que os tornam importantes para os ecossistemas (Donovan *et al.* 2000). No mundo, existem mais de 2.900 espécies distribuídas principalmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo que algumas habitam lugares de clima temperado e outras em regiões desérticas (Potenza & Zorzenon 2006). O Brasil possui uma das termitofaunas mais diversas do mundo com registro de cerca de 290 espécies (Constantino 1999).

Embora os cupins sejam mais conhecidos mundialmente por sua importância como pragas de madeira e de outros materiais celulósicos, apenas cerca de 70 a 80 espécies foram assinaladas como praga (Edwards & Mill 1986). Estes insetos, além de provocar considerável dano econômico em áreas urbanas e rurais, são importantes componentes da fauna do solo, exercendo papel essencial nos processos de decomposição e ciclagem de nutrientes (Constantino 1999). Junto com as formigas, constituem enorme parte da biomassa dos sistemas ecológicos, funcionando como consumidores primários e decompositores (Brandão & Canello 1999).

Com a gradual substituição do ambiente natural por áreas urbanas e espaços agrícolas algumas espécies nativas de cupins tem se revelado como praga, enquanto o impacto causado pelas constantes expansões das fronteiras agrícolas e da facilidade de transporte de produtos promovem a introdução de novas espécies pragas, tanto urbanas quanto agrícolas (Constantino 2002, Vasconcellos *et al.* 2002).

Cerca de 10% das espécies de cupins tem sido apontada como agente de algum tipo de dano às plantas (Constantino 2002). Na América do Sul as culturas da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) arroz (*Oryza sativa* L.) e eucalipto (*Eucaliptus spp.*), são as mais danificadas pelos cupins, embora plantios de café (*Coffea arabica* L.), milho (*Zea mays* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), fruteiras (Novaretti & Fontes 1998, Constantino 2002), amendoim (*Arachis hypogea* L.), soja (*Glycine max* L.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e cenoura (*Daucus carota* L.) também possam ser atacados (Constantino 2002). Já em áreas urbanas mundiais, as poucas espécies pragas são responsáveis por prejuízos expressivos, onde se estima que os gastos com tratamentos, reparos e substituições de peças atacadas, alcance valores da ordem de US\$ 5 a 10 bilhões anuais (Milano & Fontes 2002a).

Dentre as famílias de térmitas conhecidas, as espécies da família Rhinotermitidae possuem hábito subterrâneo e são responsáveis pela maior parte dos danos a culturas e estruturas. Segundo Wright *et al* (2003), estes térmitas subterrâneos são pragas destrutivas particularmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo, somente nos Estados Unidos são gastos anualmente cerca de um bilhão de dólares em medidas preventivas e reparos. Eles infestam materiais a base de celulose, incluindo árvores vivas, raízes de plantas, estruturas de madeira e livros.

Neste contexto, destacam-se os cupins do gênero *Coptotermes*, em particular o *Coptotermes gestroi* (Wasmann), uma espécie oriental considerado o cupim subterrâneo mais destrutivo (Milano & Fontes 2002a). Não existem registros de sua localidade típica, no entanto acredita-se que seja originária do sudeste da Ásia e Indonésia (Gay 1967). É uma praga de estruturas e agrícola economicamente importante que vem se estabelecendo em muitas áreas do mundo (Jenkins *et al.* 2007). Encontrado na Malásia, Java, Tailândia, Sri Lanka, Brasil, Cuba, Jamaica, Ilha Cayman, Antigua, Barbados, Estados Unidos (Flórida), Porto Rico, México,

Paraguai, Thaiti, África do Sul, Gana, Madagascar, Ilhas Maurício, La Reunion e Seychelles (Su *et al.* 1997, Milano & Fontes 2002b).

No Brasil, acredita-se que foi introduzida provavelmente no século passado, via navio havendo registro no Rio de Janeiro em 1923 e em Santos em 1934 (Araújo 1958). Atualmente existem grandes infestações na região Sudeste, nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais, além de ocorrências registradas nos Estados de Pernambuco (Fontes & Veiga 1998), Ceará, Bahia, Pará e Paraná (Ferraz 2000).

O controle de cupins é diferenciado de outros insetos por serem insetos sociais, a eliminação de parte da colônia, muitas vezes, não é suficiente para extinguí-la, devido à recuperação das partes restantes e conseqüente reinfestação. Além disso, as técnicas de controle usadas para cupins subterrâneos não devem ser iguais àquelas utilizadas para os cupins de madeira seca e arborícolas, pois existem diferenças na biologia e ciclo de vida desses térmitas (Costa-Leonardo, 2002). Um fator importante no controle convencional de cupins reside no desconhecimento do tamanho das colônias de cupim, de hábito subterrâneo, e no caso de algumas espécies, a existência de ninhos satélites interligados (Potenza *et al.* 2004).

Tendo em vista que *C. gestroi* é um térmita subterrâneo e que o solo também é habitat favorável ao desenvolvimento de microorganismos, os fungos entomopatogênicos podem ser uma alternativa no controle destes insetos. Segundo Rosengaus & Traniello (1997), fatores como temperatura, umidade e alta densidade populacional pode aumentar o potencial de transmissão destes patógenos. Os fungos entomopatogênicos exibem ainda propriedades como capacidade de auto-replicação e segurança em relação aos animais não alvo (Wright *et al.* 2005).

Estudos com fungos entomopatogênicos para o controle de térmitas tiveram início em 1965 (Yendol & Paschke 1965), onde a maior parte dos trabalhos tem focado os fungos *Metarhizium*

anisopliae (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Embora, os melhores resultados encontrados se restrinjam a bioensaios em laboratório, alguns produtos comerciais a base de fungo tem sido utilizados. Atualmente encontra-se disponível, no mercado mundial, quatro produtos a base de fungos entomopatogênicos para o controle de cupins, destes, três são à base de *M. anisopliae* e um de *B. bassiana* (Faria & Wraight 2007).

No Brasil, o Setor de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”) desenvolveu ainda um método de iscas atrativas (Temitrap), nas quais são inseridos fungos entomopatogênicos virulentos aos cupins, associados ou não a inseticidas (Alves, 1998). Em experimentos de campo, já se demonstrou que uma unidade da isca pode atrair milhares de operários e soldados, estes morrem ou são estressados pelo inseticida tornando-se mais sensíveis ao fungo presente na isca. Além disso, as estruturas reprodutivas do fungo (conídios), que crescem sobre os insetos mortos, representam uma fonte de inóculo para o controle das demais castas (Alves *et al.* 2008).

Pesquisas mais recentes com fungos do gênero *Isaria* (= *Paecilomyces*) têm demonstrado eficiência no controle de térmitas. Wright *et al.* (2003) patentearam linhagens das espécies *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (Wize) *Isaria javanica* (= *Paecilomyces javanicus*) (Friedrichs & Bally) para o controle de cupins subterrâneos. Este gênero reúne diversas espécies entomopatogênicas, entre elas *Isaria farinosa* (Holmsk) 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, tripses, cochonilhas, ácaros, coleóptero e cigarrinhas (Faria & Magalhães 2001, Alves *et al.* 2008).

Devido à grande variabilidade genética, um mesmo patógeno pode ter ação diferente sobre hospedeiros distintos, e os distúrbios fisiológicos causados podem depender da dose à qual o

hospedeiro foi submetido (Alves 1998). Fungos entomopatogênicos causam distúrbios fisiológicos, que refletem alterações no tegumento e nos sistemas circulatório, reprodutor, respiratório, digestivo e nervoso (Alves & Pereira 1998). Quando as hifas dos fungos atingem a hemocele do inseto, após a penetração no processo de colonização, são formadas estruturas como protoplastos, blastósporos e outros corpos hifais visando uma possível proteção contra o sistema de defesa, esses patógenos secretam ainda toxinas que podem afetar as células do hospedeiro (Alves 1998).

O reconhecimento e a eliminação de materiais estranhos injetados na hemocele dos insetos desencadeiam uma resposta imune complexa, com a participação de hemócitos e de uma série de fatores humorais. Este reconhecimento é feito pelos hemócitos, podendo ser de forma direta, através da interação de receptores de superfícies destas células com as moléculas do organismo invasor, ou indiretamente, pelo reconhecimento de receptores humorais que se ligam e opsonizam a superfície do patógeno. Assim, em contato com corpo estranho os hemócitos desencadeiam mecanismos de defesa tais como a fagocitose, encapsulação e a formação de nódulo (Lavine & Strand 2002).

A literatura cita ainda que em alguns casos a baixa velocidade de mortalidade, promovida por alguns isolados ou pela baixa concentração do fungo, torna-se um inconveniente para uso no controle biológico, pois nas relações entre patógeno/hospedeiro os primeiros distúrbios detectados na hemolinfa disparam reações de defesa dos hemócitos, na tentativa de eliminar o agente invasor ou limitar seu desenvolvimento. Estudos sobre esses mecanismos podem sugerir o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para o controle de pragas (Gunnarsson & Lackie 1985, Alves & Pereira 1998). Assim, pesquisas na tentativa de encontrar isolados de *Isaria* sp.

que sejam patogênicos ao cupim *C. gestroi*, bem como conhecer a resposta imunológica celular desse cupim frente a esse patógeno surge como uma estratégia de controle para essa praga.

Literatura Citada

Alves, S.B. 1998. Fungos Entomopatogênicos, p.289-370. In S.B. Alves, Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163 p.

Alves, S.B., R.B. Lopes, S.A. Vieira & M.A. Tamai. 2008. Fungos Entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina, p.69-110. In S.B. Alves & R.B. Lopes, Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba: FEALQ, 414 p.

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

Araújo, L. R. 1958. Contribuição à Biogeografia dos Térmitas de São Paulo, Brasil (Insecta, Isoptera). Arq. Inst. Biol. 25: 185-217.

Brandão, R.F. & Cancellato E.M. (ed). 1999. Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: Síntese do conhecimento ao final do século XX, 5: invertebrados terrestres. São Paulo: FAPESP, Cap. 5, p.58-68.

Constantino, R. 1999. Chave ilustrada para identificação dos gêneros de cupins (Insecta: Isoptera) que ocorrem no Brasil. Pap. Avul. Zool. 40: 387-448.

Constantino, R. 2002. The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. J. Appl. Ent. 126: 355-365.

Costa-Leonardo, A.M. 2002. Cupins-Praga: Morfologia, Biologia e Controle. Rio Claro, UNESP, 128p.

- Donovan, S.E., D.T. Jones, W.A. Sands & P. Eggleton. 2000.** Morphological phylogenetics of termites (Isoptera). *Biol. J. Linn. Soc.* 70: 467-513.
- Edwards, R. & A.E. Mill. 1986.** Termites in buildings. Their biology and control. Rentokil Ltd., England, 261p.
- Faria, M.R. & B.P. Magalhães. 2001.** O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. *Biotecnol. Cienc. Desenvolv.* 22: 18-44.
- Faria, M.R & S.P. Wraight. 2007.** Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulations types. *Biol. Control* 43: 237-256.
- Ferraz, M.V. 2000.** Estudo taxonômico e aspectos da biologia de *Coptotermes* Wasmann, 1896 (Isoptera, Rhinotermitidae) nas Américas. Tese de doutorado, IB, USP, São Paulo, 213p.
- Fontes, L. R. & A.F.S.L. Veiga, 1998.** Registro do cupim subterrâneo, *Coptotermes havilandi* (Isoptera, Rhinotermitidae), na área metropolitana de Recife, PE. Congresso Brasileiro de Entomologia, 7°. Resumos. Rio de Janeiro. 1005 p.
- Gay, F.J. 1967.** A world review of introduced species of termites. *Bull. Com. Sci. Ind. Res. Org.* 286: 1-88.
- Gunnarsson, S.G.S. & A.M. Lackie. 1985.** Hemocytic aggregation in *Schistocerca gregaria* and *Periplaneta americana* as a response to injected substances of microbial origin. *J. Invertebr. Pathol.* 46: 312-319.
- Jenkins, T.M., S.C. Jones, C. Lee, B.T. Forschler, Z. Chen, G. Lopez-Martinez, N.T. Gallagher, G. Brown, M. Neal, B. Thistleton & S. Kleinschmidt. 2007.** Phylogeography illuminates maternal origins of exotic *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Mol. Pylogenet. Evol.* 42: 612–621

- Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Molec.* 32: 1295-1309.
- Milano, S. & L.R. Fontes, 2002a.** Cupim e Cidade: Implicações ecológicas e controle. São Paulo, Conquista Artes Gráficas, 141p.
- Milano, S. & L.R. Fontes, 2002b.** Termites as an urban problem in South America. *Sociobiology* 40: 103-149.
- Novaretti, W.R.T. & L. R. Fontes. 1998.** Cupins: Uma grande ameaça à cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil, p. 163-171. In R.L. Fontes & Berti Filho. Cupins: O desafio do conhecimento. Piracicaba FEALQ/USP, 512p.
- Potenza, M.R., F.J. Zorzenon, J. Justi Junior & S.L. de Almeida. 2004.** Determinação da área de forrageamento e estimativa da população de *Heterotermes tenuis* (Isoptera: Rhinotermitidae) e controle com isca a base de hexafluron. *Arq. Inst. Biol.* 71: 189-195.
- Potenza, M.R. & F.J. Zorzenon. 2006.** Cupins: Pragas em áreas urbanas, 2° ed. São Paulo, Boletim Técnico Instituto Biológico, 66p.
- Rosengaus, R.B. & J.F.A. Traniello. 1997.** Pathobiology and disease transmission in dampwood termites *Zootermopsis angusticollis* (Isoptera: Termopsidae) infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina:Hypomycetes). *Sociobiology* 30: 185-195.
- Su, N.-Y., R.H. Scheffrahn & T. Weissling. 1997.** A new introduction of a subterranean termite, *Coptotermes havilandi* Holmgren (Isoptera: Rhinotermitidae) in Miami, Florida. *Fla. Entomol.* 80: 408-411.
- Vasconcellos, A., A.G. Bandeira, C.S. Miranda & M.P. Silva. 2002.** Termites (Isoptera) pests in buildings in João Pessoa. *Sociobiology* 40: 639-644.

- Wright, M.S., W.J. Connick & M.A. Jackson. 2003.** Use of *Paecilomyces* spp. as pathogenic agents against subterranean termites. U.S. Patent 20030095951.
- Wright, M.S., A.K. Raina & A.R. Lax. 2005.** A Strain of the Fungus *Metarhizium anisopliae* for Controlling Subterranean Termites. J. Econ. Entomol. 98: 1451-1458.
- Yendol, W.G. & J.D. Paschke. 1965.** Pathology of an entomophthora infection in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Kollar). J. Invertebr. Pathol. 7: 414-422.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DO FUNGO *Isaria* (PERSOON) SOBRE *Coptotermes gestroi* (WASMANN) (ISOPTERA: RHINOTERMITIDAE)

ELIANA M. PASSOS¹, AURISTELA C. ALBUQUERQUE², EDMILSON J. MARQUES¹, VALÉRIA
WANDERLEY TEIXEIRA³, CINTHIA C. M. SILVA¹ E MARCO A. P. OLIVEIRA¹

¹Departamento de Agronomia – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av.

Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE.

²Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

³Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

¹Passos, E.M., A.C Albuquerque, E.J. Marques, V. Wanderley-Teixeira, Cinthia C.M. Silva & Marco A.P. Oliveira. Efeitos de isolados de *Isaria* (Persoon) sobre *Coptotermes gestroi* (Wasmann) (Isoptera: Termitidae). Ciência Rural.

RESUMO: O cupim *Coptotermes gestroi* (Wasmann) é considerado a espécie subterrânea mais destrutiva, causa danos a edificações, a arborização urbana e a culturas. Uma alternativa no controle deste inseto pode ser o desenvolvimento e uso de agentes biocontroladores, como os fungos entomopatogênicos. *Isaria* (Persoon) tem sido indicado no controle de térmitas subterrâneos, inclusive do gênero *Coptotermes*. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo selecionar isolados de *Isaria* patogênicos ao cupim *C. gestroi*. Inicialmente, foi avaliada a patogenicidade e a virulência de *Isaria farinosa* e *Isaria fumosorosea* sobre operários de *C. gestroi*. Os insetos foram pulverizados com suspensões fúngicas ajustadas a 10^7 conídios mL^{-1} e as médias de mortalidade comparadas pelo teste de Tukey. Para determinar porcentagem de sobrevivência, os dados de mortalidade confirmada foram submetidos ao teste de Long-Rank, através do método de Kaplan-Meyer. Posteriormente a CL_{50} foi estimada a partir da mortalidade, empregando-se o Proc Probit (SAS), ocasionada pelas concentrações 10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 conídios mL^{-1} . Todos isolados se mostraram patogênicos, ocasionando uma mortalidade acima de 60%, e virulento apresentando uma sobrevivência média de 2,0 a 3,9 dias. Contudo, os isolados ESALQ-1205, URM-4995, URM-4993 de *I. farinosa* e o isolado ESALQ-1296 de *I. fumosorosea* mostraram-se mais virulentos. A CL_{50} estimada para o isolado URM- 4995 de *I. farinosa* resultou em valores de $6,7 \times 10^5$ conídios mL^{-1} .

PALAVRAS-CHAVE: Térmitas, controle microbiano, patogenicidade, sobrevivência

EVALUATION OF *Isaria* (PERSOON) ISOLATES ON THE SUBTERRANEAN TERMITE

Coptotermes gestroi (Wasmann) (ISOPTERA: RHINOTERMITIDAE)

ABSTRACT – The termite *Coptotermes gestroi* (Wasmann) is considered the most destructive subterranean species, causing damage and edifications to trees and crops. An alternative to control to these insects is the development and use of biological control agents, such as entomopathogenic fungi. *Isaria* spp. have been indicated to control subterranean termites, including *Coptotermes*. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo selecionar isolados de *Isaria* patogênicos ao cupim *C. gestroi*. Thus, this work aimed to select *Isaria* pathogenic isolates of the *C. gestroi*. Initially, the viability, pathogenicity, and virulence of *Isaria farinosa* and *Isaria fumosorosea* were evaluated on workers of *C. gestroi*. Insects were sprayed with fungi suspension adjusted to 10^7 conidia mL^{-1} and the mortality averages were compared by the Tukey test. To determine the survival percentage, data of the confirmed mortality were tested by the Long-Rank test, through the Kaplan-Meyer method. Furthermore, the LC_{50} was estimated from the mortality, using the Proc Probit (SAS), caused by the following concentrations: 10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 conidia mL^{-1} . All fungi isolates tested were pathogenic and virulent to *C. gestroi* causing more than 60% mortality, with an average survival of 2.0 to 3.9 days. However, isolates ESALQ-1205, URM-4995, URM-4993 of *I. farinosa* and isolate ESALQ-1296 of *I. fumosorosea* were more virulent. The estimated LC_{50} for the *I. farinosa* isolate URM- 4995 was 6.7×10^5 conidia mL^{-1} .

KEY WORDS: Termites, microbial control, pathogenicity, survival

Introdução

Coptotermes gestroi (Wasmann) é um térmita subterrâneo de origem Asiática, praga agrícola e de edificações, que vem se estabelecendo em muitas áreas do mundo (Jenkins *et al.* 2007). No Brasil, existem grandes infestações na região Sudeste, além de ocorrências registradas nos Estados de Pernambuco (Fontes & Veiga 1998), Ceará, Bahia, Pará e Paraná (Ferraz 2000). Os indivíduos desta espécie além de causar enormes danos a edificações urbanas ou rurais, danificam produtos armazenados em geral e comprometem a arborização urbana (Fontes 1995). De acordo com Costa-Leonardo (2002) *C. gestroi* é praga agrícola na Tailândia, Malásia e Indonésia.

Com relação ao controle de térmitas subterrâneos como o *C. gestroi*, mesmo com a substituição dos clorados por outros grupos de inseticidas de menor poder residual como piretróides, neonicotinóides, fenil pirazol, reguladores de crescimento e éter difenílico ainda existem algumas limitações no uso destes produtos (Portenza & Zorzenon 2006). Segundo estes autores os cupinidas necessitam de cuidados específicos na aplicação, não eliminam a colônia de cupins, necessita de perfurações dentro e ao redor da estrutura, as pessoas devem se ausentar do imóvel e apresentam efeito residual. Além da dificuldade no controle por ser um cupim subterrâneo de hábito críptico, segundo Costa-Leonardo (2002) o controle de *C. gestroi* torna-se ainda mais difícil devido ao enorme tamanho de suas populações, ninhos policíclicos, presença de neotênicos e forrageamento a longas distâncias.

Uma alternativa no controle deste inseto pode ser o desenvolvimento e uso de agentes biocontroladores, especialmente os fungos entomopatogênicos, pois as condições dos ninhos dos cupins, tais como temperatura moderada e umidade alta, contribuem para o crescimento de

espécies de fungos e são fatores importantes para sua sobrevivência e propagação (Kramm *et al.* 1982, Ignoffo 1992).

Fungos do gênero *Isaria* (Persoon) parasitam diversas ordens de insetos e são empregados 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 (Alves 1998, Faria & Magalhães 2001, Alves *et al.* 2008). No Brasil, *Isaria* spp. tem sido produzido no Estado de Mato Grosso para o controle do percevejo de renda da seringueira, *Leptopharsa heveae* (Drake & Poor) (Alves *et al.* 2008). Também têm se mostrado eficiente no controle de térmitas, Wright *et al.* (2003) patentearam linhagens das espécies *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (Wize) *Isaria javanica* (= *Paecilomyces javanicus*) (Friedrichs & Bally) para o controle dos cupins subterrâneos, *Coptotermes formosanus* (Shiraki) e *Reticulitermes flavipes* (Kollar). Segundo os autores, estas espécies produzem grande quantidade de inóculo em meios sólidos, fáceis e baratos de serem preparados, além de não serem repelentes, o que facilita a disseminação entre os indivíduos da colônia.

Tendo em vista que em programas de controle microbiano, a seleção de isolados patogênicos para o inseto alvo é a uma etapa de fundamental importância, o trabalho teve como objetivo selecionar isolados de *Isaria* patogênicos ao cupim *C. gestroi*.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Insetos da Área de Fitossanidade, do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Obtenção dos Insetos. Os insetos foram coletados mediante o uso de armadilhas de papelão corrugado envoltas em tubo plástico de acordo com a metodologia descrita por Costa-Leonardo (2002). As armadilhas foram colocadas diretamente no solo próximo a um tronco de abacateiro (*Persea americana* Mill) infestado, localizada no bairro de Iputinga, Recife-PE. Em laboratório, as iscas com os cupins foram mantidas em caixa plástica a temperatura aproximada de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade acima de 60% e escotofase constante.

Obtenção e Multiplicação dos Isolados. Os isolados investigados de *Isaria farinosa* (Holmsk) e *Isaria fumosorosea* (Wize) foram obtidos de diferentes hospedeiros e localidades (Tabela 1) foram mantidos na micoteca do Laboratório de Patologia de Insetos da UFRPE, após revigoramento em operários de *C. gestroi*. Em seguida, os isolados foram repicados para placas de Petri, contendo meio batata-dextrose-ágar mais antibiótico (BDA+A). Após sete dias foram feitas placas cheias contendo meio completo (MC), constituído de extrato de levedura, glucose, sais minerais, ágar, e água destilada, sendo os isolados uniformemente espalhados por toda a extensão da placa, com o auxílio da alça de Drigalsky. As placas permaneceram em estufa incubadora B.O.D. a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotofase de 12h para a germinação e crescimento dos isolados.

Patogenicidade dos Fungos. A partir das placas cheias, foram preparadas suspensões fúngicas, adicionando-se 10mL de água destilada esterilizada mais espalhante adesivo Tween 80 (0,01%), sendo os conídios removidos com ajuda de uma espátula de borracha. As suspensões resultantes após filtradas em gaze esterilizada foram aferidas e ajustadas para concentração de 10^7 conídios mL^{-1} , mediante quantificação em câmara de Neubauer utilizando-se microscópio óptico.

A viabilidade dos isolados foi avaliada por meio de plaqueamento em BDA+A, após 20h, em câmara climatizada tipo B.O.D. a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12h de fotofase. Para tanto, utilizou-se duas

placas Petri com BDA+A para cada isolado, sendo pulverizados sobre estas 0,1mL da suspensão correspondente, espalhando-se uniformemente este volume com alça de Drigalsky. As leituras foram efetuadas em microscópio óptico mediante a determinação do percentual de conídios germinados e não germinados seguindo a metodologia descrita por Alves & Moraes (1998).

Na avaliação da patogenicidade 70 operários de *C. gestroi* agrupados em uma placa de Petri (15 x 2,0 cm) foram pulverizados de maneira uniforme e simultânea com 1mL de suspensão a 10^7 conídios mL⁻¹, utilizando-se microatomizador “Paasche Airbrush” elétrico, modelo “VL”, acoplado a um compressor regulado para 5 libras de pressão. Na testemunha, os insetos foram pulverizados com água destilada esterelizada mais espalhante adesivo a 0,01%. Após a aplicação, com auxílio de um pincel umedecido transferiu-se os cupins em grupos de 10 para placas de Petri (9,0cm) forradas com papel de filtro umedecido e contendo pedaços de papelão corrugado (2,0 x 2,0cm), o qual servia como abrigo e fonte de alimento. Para a manutenção da umidade, as placas com os cupins eram fechadas com filme plástico. Os cupins tratados foram mantidos em temperatura ambiente aproximadamente $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e escotofase constante. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 7 tratamentos e 7 repetições, sendo cada parcela constituída por 10 operários.

A mortalidade foi avaliada diariamente até o último inseto, onde os cupins mortos foram transferidos para câmara úmida e mantidos em B.O.D. a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 h de fotofase para confirmação do agente causal. Os dados de mortalidade média foram analisados mediante análise de variância (ANOVA) utilizando o Proc ANOVA do SAS (SAS Institute, 1999-2001) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade quando significativo, sendo os dados transformados para raiz ($x + 0,5$).

A partir dos dados de mortalidade confirmada determinou-se a porcentagem de sobrevivência média, sendo os dados submetidos ao teste Long-Rank, através do método Kaplan-Meyer, por pares de isolados usando o Proc Lifetest do SAS (SAS Institute, 1999-2001).

Estimativa da CL₅₀. A partir dos resultados obtidos no teste de patogenicidade, o isolado URM 4995 foi selecionado para investigação da Concentração Letal. Suspensões, do referido isolado foram ajustadas a 10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 conídios mL⁻¹ e usadas para pulverizar os cupins, compondo os tratamentos. No grupo controle foi aplicado água destilada esterilizada mais Tween (80) a 0,01%. Para cada tratamento utilizaram-se seis repetições com 12 operários pulverizados com 1mL de cada suspensão. Na preparação e aplicação das suspensões, determinação da viabilidade de conídios, acomodação dos cupins e avaliações, foi utilizada a mesma metodologia empregada no experimento de patogenicidade. A mortalidade foi avaliada por um período de cinco dias e os insetos mortos transferidos para câmara úmida e mantidos em B.O.D. a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 h de fotofase para confirmação do agente causal. A partir dos dados de mortalidade confirmada estimou-se a CL₅₀ empregando-se o Proc Probit do programa estatístico SAS (SAS Institute 1999-2001).

Resultados e Discussão

Patogenicidade dos Isolados. Os isolados de *Isaria* testados apresentaram viabilidades superiores a 95%, o que demonstra a alta capacidade germinativa dos mesmos. A mortalidade confirmada, aos cinco e dez dias de avaliação, e a sobrevivência dos cupins, obtidos através dos isolados de *I. farinosa* e *I. fumosorosea* mostra que a patogenicidade dos isolados diferiram entre si, e que a mortalidade variou de 61,5 a 100%. Os valores médios de sobrevivência foram

significativamente diferentes, onde variaram de 2,0 a 3,9 dias ($\chi^2_{Gl=6} = 246,3$; $P < 0,0001$) (Tabela 2).

Em relação à mortalidade aos cinco dias, pode-se observar que apenas o isolado ESALQ-1205 de *I. farinosa* diferiu significativamente dos demais apresentando a maior mortalidade (96,7%). Aos dez dias de avaliação, houve diferença somente entre os isolados ESALQ-1297 de *I. fumosorosea* e URM-4995 de *I. farinosa* que ocasionaram mortalidades de 61,5% e 100%, respectivamente.

De acordo com os dados de mortalidade e sobrevivência gerados pode-se inferir que os isolados ESALQ-1205, URM-4995, URM-4993 de *I. farinosa* e o isolado ESALQ-1296 de *I. fumosorosea* se mostraram mais eficientes sobre o cupim *C. gestroi*, ocasionando os maiores percentuais de mortalidade e as menores sobrevivências (Fig. 1).

Resultados semelhantes foram observados por Meikle *et al.* (2005) que constataram uma mortalidade de 100% de *Coptotermes formosanus* (Shiraki), após dez dias, pulverizados com suspensões do fungo *I. fumosorosea* na mesma concentração (10^7 conídios mL^{-1}) a 23°C, UR 60% e escotofase. Estes autores, avaliando a sobrevivência dos cupins constataram que o isolado de *I. fumosorosea*, foi mais virulento que o produto comercial a base do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.

Também foram encontrados valores inferiores para a mortalidade de cupins subterrâneos do gênero *Coptotermes* tratados com suspensões do fungo *Isaria*. Yanagawa *et al.* (2008) em seis dias de avaliação verificaram uma mortalidade de apenas 40% de *C. formosanus* ocasionada por *I. fumosorosea* na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} , tendo somente alcançado 100% de mortalidade mediante o uso de suspensão na concentração 10^8 conídios mL^{-1} .

Essas diferenças na proporção de cupins mortos pelas suspensões fúngicas pode ser explicada, dentre outros fatores, devido à grande variabilidade genética de isolados de uma mesma espécie. Todavia a causa maior das diferenças aqui relatadas possivelmente esta relacionada com a forma de aplicação, visto que, neste último trabalho citado, os cupins foram tratados por imersão em suspensão durante 5 segundos, postos para secar e em seguida receberam um banho em solução de Tween® 80 a 0,025%.

Estimativa da Concentração Letal (CL₅₀) para o Isolado URM-4995. Como o isolado URM-4995 foi um dos que se destacaram como mais virulento, ocasionando 100% de mortalidade acumulada e período de sobrevivência de 2,0 dias, foi selecionado para a determinação da CL₅₀.

Estimou-se, portanto, a CL₅₀ para o isolado URM-4995 de *I. farinosa*, resultando em valores de $6,7 \times 10^5$ conídios mL⁻¹ com limites de $5,1 \times 10^5$ e $8,9 \times 10^5$, respectivamente (Tabela 3).

O conhecimento da concentração letal (CL₅₀), para fungos entomopatogênicos, é importante para estimar a dosagem mais econômica, visto que segundo Haddad (1998), esta conduz a conclusões a respeito da potência do patógeno, da sensibilidade dos insetos a doença e até mesmo sobre previsões de controle de pragas através de inseticidas microbianos.

Literatura Citada

Alves, S.B. 1998. Fungos Entomopatogênicos, p: 289-381. In: Alves, S.B. Controle microbiano de insetos. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1163 p.

Alves, S.B. & S.A. Moraes. 1998. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos, p.765-777.

In S.B. Alves, Controle Microbiano de Insetos. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1163p.

- Alves, S.B., R.B. Lopes, S.A. Vieira & M.A. Tamai. 2008.** Fungos Entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina, p.69-110. In S.B. Alves & R.B. Lopes, Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba: FEALQ, 414 p.
- Costa-Leonardo, A.M. 2002.** Cupins-Praga: Morfologia, Biologia e Controle. Rio Claro: UNESP, 128p.
- Faria, M.R. & B.P. Magalhães. 2001.** O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. Biotecnol. Cienc. Desenvolv. 22: 18-44.
- Ferraz, M.V. 2000.** Estudo taxonômico e aspectos da biologia de *Coptotermes* Wasmann, (Isoptera, Rhinotermitidae) nas Américas. Tese de Doutorado, USP, São Paulo, 213p.
- Fontes, L.R. 1995.** Cupins em áreas urbanas, p.57-75. In E. Berti Filho & L.R. Fontes, Alguns aspectos atuais da biologia e controle de cupins. Piracicaba: FEALQ, 128p.
- Fontes, L.R. & A.F.S.L. Veiga. 1998.** Registro do cupim subterrâneo, *Coptotermes havilandi* (Isoptera, Rhinotermitidae), na área metropolitana de Recife, PE. In: 7º Congresso Brasileiro de Entomologia, Rio de Janeiro – RJ (SEB, 1005 p).
- Haddad, M.L. 1998.** Utilização do Pólo-PC para análise de Probit, p.999-1014. In S.B. Alves, Controle Microbiano de Insetos. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1163p.
- Ignoffo, C.M. 1992.** Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. Fla. Entomol. 75: 516–525.
- Jenkins, T.M., S.C. Jones, C. Lee, B.T. Forschler, Z. Chen, G. Lopez-Martinez, N.T. Gallagher, G. Brown, M. Neal, B. Thistleton & S. Kleinschmidt. 2007.** Phylogeography illuminates maternal origins of exotic *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae). Mol. Phylogenet. Evol. 42: 612–621.

- Kramm, K.R., D.F. West & P.G. Rockenbach, 1982.** Termite pathogens: transfer of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* between *Reticulitermes* sp. termites. J. Invertebr. Pathol. 39: 1–5.
- Meikle, W.G., G. Mercadier, R.B. Rosengaus, A.A. Kirk, F. Derouane & P.C. Quimby. 2005.** Evaluation of an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith (Deuteromycota: Hyphomycetes) obtained from Formosan subterranean termites (Isop.: Rhinotermitidae). J. Appl. Entmol. 129: 315-322.
- Yanagawa, A., F. Yokohari & S. Shimizu. 2008.** Defense mechanism of the termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki, to entomopathogenic fungi. J. Invertebr. Pathol. 97: 165–170.
- Potenza, M.R. & F.J. Zorzenon. 2006.** Cupins: Pragas em áreas urbanas, 2.ed. São Paulo: Boletim Técnico Instituto Biológico, 66p.
- SAS Institute. 1999-2001.** SAS user's guide: Statistics, version 8.2, 6th ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Wright, M.S., W.J. Connick & M.A. Jackson. 2003.** Use of *Paecilomyces* spp. as pathogenic agents against subterranean termites. U.S. Patent 20030095951.

Tabela 1. Procedência (localidade e hospedeiro) dos isolados de *I. fumosorosea* e *I. farinosa* utilizados nos experimentos com *C. gestroi*.

Isolados	Localidade	Hospedeiros
<i>I. farinosa</i>		
ESALQ- 1205	Santa Fé do Sul- SP	<i>Bemisia tabaci</i>
ESALQ- 1355	Aldeia- PE	<i>Brassolis sopharae</i>
URM- 4993	Rio Grande do Sul	Coleóptero
URM- 4995	Rio Grande do Sul	Coleóptero
<i>I. fumosorosea</i>		
ESALQ- 1296	Piracicaba- SP	<i>B. tabaci</i>
ESALQ- 1297	Ipeúna- SP	<i>Lagria villosa</i>

Tabela 2. Mortalidade acumulada, corrigida e confirmada (%) aos cinco e dez dias de avaliação, e sobrevivência (dias) de *C. gestroi* por isolados de *Isaria spp.* (10^7 conídios mL⁻¹). Temp.: 26 ± 2 °C; UR $70 \pm 10\%$ e escotofase.

Isolados	Mortalidade (%)	Mortalidade (%)	Sobrevivência
	5 Dias ¹	10 Dias ¹	Dias ²
ESALQ- 1205	96,7±2,12a	93,8 ± 4,69ab	2,8 ± 0,09c
ESALQ- 1297	62,3 ± 1,60b	61,5 ± 14,03b	3,9 ± 0,18b
ESALQ- 1355	62,0 ± 1,64b	82,4 ± 9,88ab	3,7 ± 0,15b
ESALQ- 1296	62,1 ± 1,64b	86,9 ± 6,40ab	3,0 ± 0,10c
URM- 4993	62,2± 1,63b	69,7 ± 11,26ab	2,8 ± 0,12c
URM- 4995	62,2 ± 1,63b	100,0a	2,0 ± 0,09c
Testemunha	-	-	13,7 ± 0,80a
	$F_{5;41} = 58,16^{<0,0001}$	$F_{5;41} = 2,77^{<0,0323}$	$\chi^2 = 246,3^{<0,0001}$

¹Médias (±EP) seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey;

²Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Log-Rank por pares de isolados após análise de sobrevivência pelo método Kaplan-Meyer.

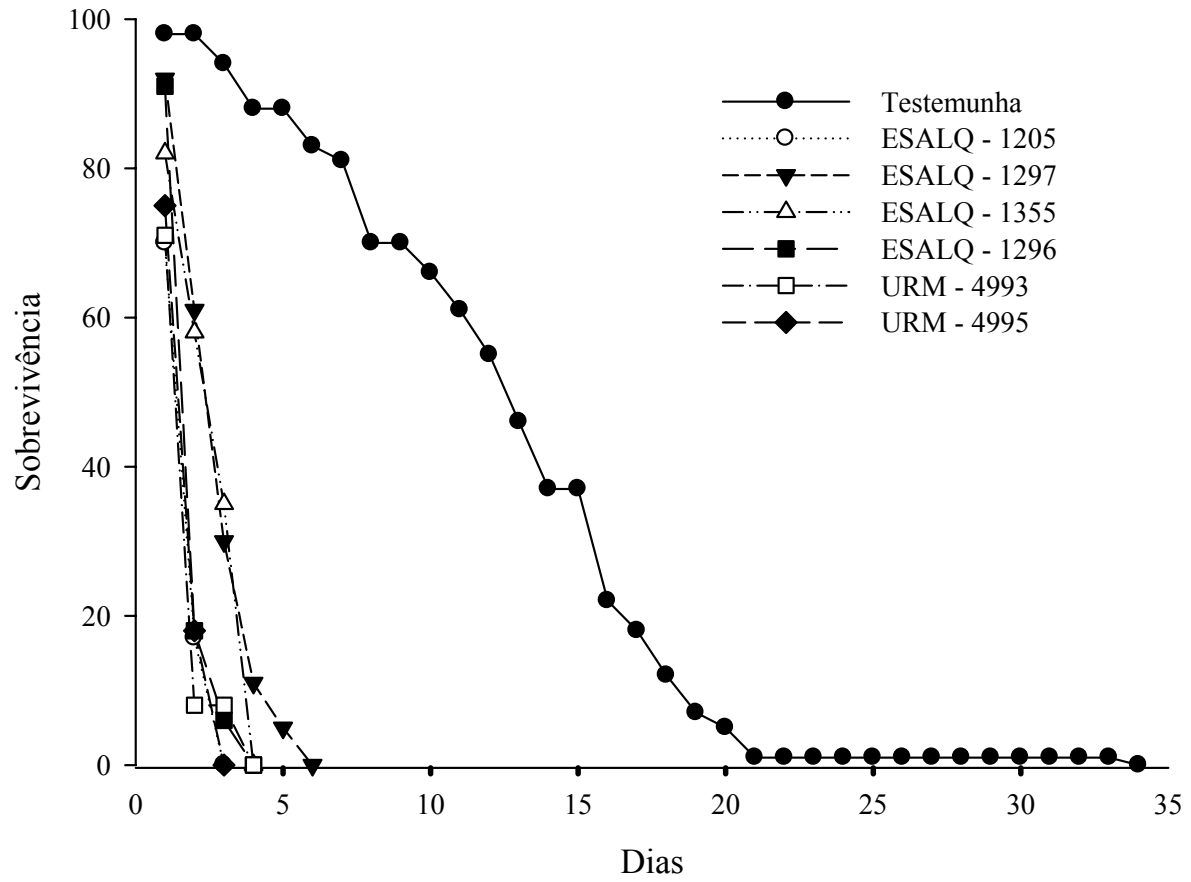


Figura 1: Sobrevivência do cupim *C. gestroi* tratado com isolados de *I. farinosa* e *I. fumosorosea* na concentração 10^7 conídios mL^{-1} , avaliada até a morte do ultimo indivíduo. Temp.: 26 ± 2 °C; UR $70 \pm 10\%$ e escotofase.

Tabela 3. Estimativa de CL_{50} do isolado URM-4995 de *I. farinosa* para o cupim *C. gestroi* (n = 447; g.l. = 4). Temp.: 26 ± 2 °C; UR $70 \pm 10\%$ e escotofase.

Isolado	$\chi^2(1)$	Inclinação da reta ($\beta \pm EP$) ⁽²⁾	CL_{50} (Conídios ml^{-1}) (95% IC) ⁽³⁾
URM - 4995	4,5	$2,01 \pm 0,19$	$6,7 \times 10^5 (5,1 \times 10^5 - 8,9 \times 10^5)$

$\chi^2(1)$ = Teste de qui-quadrado;

($\beta \pm EP$)⁽²⁾ = Coeficiente angular da reta \pm erro padrão;

(95% IC)⁽³⁾ = Intervalo de confiança, 5% significância

CAPÍTULO 3

CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DOS HEMÓCITOS EM OPERÁRIOS DE
Coptotermes gestroi (WASMANN) (ISOPTERA: RHINOTERMITIDAE) DESAFIADOS
PELO FUNGO *Isaria farinosa* (HOLMSK)

ELIANA M. PASSOS¹, AURISTELA C. ALBUQUERQUE², VALÉRIA WANDERLEY TEIXEIRA³, ÁLVARO
A. C. TEIXEIRA³ E EDMILSON J. MARQUES¹

¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de
Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE;

²Departamento de Biologia – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco

³Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco

¹Passos, E.M., A.C Albuquerque, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira & E.J. Marques. Contagem total e diferencial dos hemócitos em operários de *Coptotermes gestroi* (Wasmann) (Isoptera: Rhimotermetidae) desafiados pelo fungo *Isaria farinosa* (Holmsk). Artigo a ser submetido.

RESUMO – O reconhecimento e a eliminação de materiais estranhos presentes na hemocele dos insetos desencadeiam uma resposta imune complexa, que pode ocorrer com a participação de hemócitos e de uma série de fatores humorais. Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar qualitativamente e quantitativamente os hemócitos em operários do cupim *Coptotermes gestroi* (Wasmann) desafiados pelo fungo *Isaria farinosa* (Holmsk). A média do número total de hemócitos encontrada na hemolinfa dos operários dos cupins tratados com *I. farinosa*, na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} , não foi significativamente diferente da média de hemócitos registradas para a testemunha, nos intervalos de 12h, 24h, 36h e 48h. Com relação aos tipos celulares, a análise em microscopia de luz revelou a presença de prohemócito, granulócito, adipohemócito, esferulócito, oenocitóide e plasmatócito, sendo este o mais frequente. A contagem diferencial nos insetos infectados e não infectados, não diferiu significativamente nos intervalos de tempo avaliado, tendo sido constatado uma variação significativa somente em função do tempo, para os plasmatócitos e prohemócitos. Os resultados das contagens total e diferencial apresentados demonstram que o isolado URM-4995 de *I. farinosa* na concentração 10^7 conídios mL^{-1} não interferiu quantitativamente e qualitativamente no número de hemócitos de *C. gestroi*.

PALAVRAS-CHAVE: Resposta imunológica, térmita subterrâneo, hemolinfa, fungo entomopatogênico

TOTAL AND DIFFERENTIAL COUNT OF HEMOCYTES IN WORKERS OF *Coptotermes gestroi* (WASMANN) (ISOPTERA: RHINOTERMITIDAE) CHALLENGED BY *Isaria farinosa* (HOLMSK) FUNGI.

ABSTRACT: The recognition and the elimination of strange materials present in the insect's hemocoel trigger a complex immune response with the participation of hemocytes and a variety of humoral factors. Thus, this work aimed to evaluate qualitatively and quantitatively the hemocytes present in workers *Coptotermes gestroi* (Wasmann) challenged by the fungi *Isaria farinosa* (Holmsk). The total average total number of hemocytes found in the hemolymph of workers termites treated with *I. farinosa*, in the concentration of 10^7 conidia mL⁻¹, was not significantly different from the average recorded for the witness control hemocytes, within 12, 24, 36 and 48 hours intervals. Regarding the cell types, the analysis in light microscopy revealed the presence of prohemocyte, granulocyte, adipohemocyte, spherulocyte, oenocytoid and plasmatocyte, which is the most common. The differential counts in infected and uninfected insects, did not differ significantly within the time assessed, it was only a change in function of time for plasmatocytes and prohemocytes. The results of total and differential counts show that *I. farinosa* in concentration 10^7 conidia mL⁻¹, did not affect quantitatively and qualitatively in the number of hemocytes of *C. gestroi*.

KEYWORDS: Immunological response, subterranean termite, hemolymph, entomopathogenic fungi

Introdução

O cupim *Coptotermes gestroi* (Wasmann) é uma espécie proveniente do sudeste da Ásia que foi introduzida no Brasil onde se encontra bem estabelecida ao longo da região costeira. Além de serem encontrados em residências, danificando forros, móveis, batentes, livros, tecidos e cabos elétricos, infestam também árvores ornamentais (Costa-Leonardo 2002, Constantino 2002).

Fungos do gênero *Isaria* (Persoon) estão entre os três gêneros de fungos entomopatogênicos mais utilizados em programas de controle biológico no mundo, sendo empregados em escala comercial na Europa e nas Américas do Norte e Latina (Faria & Magalhães 2001, Faria & Wraight 2007). Em estudos recentes tem se mostrado eficiente no controle de térmitas, Wright *et al.* (2003) patentearam linhagens das espécies *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (Wize) e *Isaria javanica* (= *Pecilomyces javanicus*) (Friedrichs & Bally) para o controle dos cupins subterrâneos, *Coptotermes formosanus* (Shiraki) e *Reticulitermes flavipes* (Kollar).

Quando as hifas dos fungos entomopatogênicos atingem a hemocele do inseto, após a penetração no processo de colonização, são formadas estruturas como protoplastos, blastósporos e outros corpos hifais visando uma possível proteção contra o sistema de defesa dos insetos. Esses patógenos secretam ainda toxinas que podem afetar as células do hospedeiro (Alves 1998). O reconhecimento e a eliminação de materiais estranhos que atingem a hemocele dos insetos desencadeiam uma resposta imune complexa, com a participação de hemócitos e de uma série de fatores humorais (Lavine & Strand 2002).

Diante do exposto o presente trabalho objetivou avaliar qualitativamente e quantitativamente os hemócitos deste cupim frente ao fungo *Isaria farinosa* (Holmsk), visando verificar se a resposta imunológica celular é ou não desencadeada.

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Patologia de Insetos, Área de Fitossanidade do Departamento de Agronomia, e no Laboratório de Histologia, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Obtenção dos Insetos. Os insetos foram coletados mediante o uso de armadilhas de papelão corrugado envoltas em tubo plástico de acordo com a metodologia descrita por Costa-Leonardo (2002). As armadilhas foram colocadas diretamente no solo próximo a um tronco de abacateiro (*Persea americana* Mill) infestado, localizado no bairro de Iputinga, Recife-PE. Em laboratório, as iscas com os cupins foram mantidas em caixa plástica a temperatura aproximada de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade acima de 60% e escotofase constante.

Multiplicação do Isolado. Após revigoramento em operários de *C. gestroi*, o isolado URM-4995 de *I. farinosa* proveniente da micoteca do Laboratório de Patologia de Insetos da UFRPE e de patogenicidade comprovada foi repicado para placas de Petri, contendo meio batata-dextrose-ágar mais antibiótico (BDA+A). Após sete dias foram feitas placas cheias contendo meio completo (MC), constituído de extrato de levedura, glucose, sais minerais, ágar, e água destilada, sendo o isolado uniformemente espalhado por toda a extensão da placa, com o auxílio da alça de Drigalsky. As placas permaneceram em estufa incubadora B.O.D. a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotofase de 12h para a germinação e crescimento do isolado.

Aplicação do Fungo. A partir das placas cheias, foram preparadas suspensões fúngicas, adicionando-se 10mL de água destilada esterilizada mais espalhante adesivo Tween® 80 (0,01%), sendo os conídios removidos com ajuda de uma espátula de borracha. As suspensões resultantes foram aferidas e ajustadas para concentração de 10^7 conídios mL^{-1} , mediante quantificação em câmara de Neubauer. Cem operários de *C. gestroi* agrupados em uma placa de

Petri (15 x 2,0 cm) foram pulverizados de maneira uniforme e simultânea com suspensões fungicas, utilizando-se microatomizador “Paasche Airbrush” elétrico, modelo “VL”, acoplado a um compressor regulado para cinco libras de pressão. Na testemunha, os insetos foram pulverizados com água destilada esterelizada mais espalhante adesivo a 0,01%. Após a aplicação, com auxílio de um pincel umedecido transferiu-se os cupins em grupos de 10 para placas de Petri (9,0cm) forradas com papel de filtro umedecido e contendo pedaços de papelão corrugado (2,0 x 2,0cm). Para a manutenção da umidade, as placas com os cupins eram fechadas com plástico filme. Os cupins tratados foram mantidos em temperatura ambiente aproximadamente $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e escotofase constante.

Coleta da Hemolinfa. A hemolinfa foi coletada nos intervalos de 12h, 24h, 36h e 48h, após a pulverização, tanto para os dois tratamentos. A técnica de perfusão descrita por Brayner *et al.* (2005) foi utilizada para a coleta de hemolinfa, a qual consiste na utilização de um micro capilar de vidro contendo solução anticoagulante II para insetos. Para tanto, o capilar foi introduzido na região abdominal de operários de *C. gestroi* e a hemolinfa aspirada foi depositada diretamente em lâminas de vidro, deixando-as secar por 20 minutos em temperatura ambiente. Após este período, a fixação das células foi realizada em metanol durante cinco minutos e coradas com Giemsa por quatro minutos. Em seguida o excesso de corante foi retirado, submetendo estas lâminas a uma lavagem rápida com água destilada e deixando-as secar em temperatura ambiente, para posterior montagem com Entellan. A análise morfológica foi realizada utilizando-se microscópio OLYMPUS BX-49, e fotografada em fotomicroscópio OLYMPUS BX-51.

Contagem Total e Diferencial dos Hemócitos. Para cada intervalo a contagem total e diferencial dos hemócitos foi realizada utilizando-se cinco lâminas, as quais continham a hemolinfa mais anticoagulante de 10 indivíduos distribuídas em pequenos poços de

aproximadamente 0,125 μ L, onde cada lâmina representava uma repetição. Na contagem total foram computadas todas as células de cada poço, enquanto para a contagem diferencial foram identificadas 300 células de cada repetição, segundo metodologia adaptada de Falleiros *et al.* (2003), das quais obteve-se a porcentagem dos tipos celulares de cada repetição. Os resultados da contagem total foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas através do teste t a 5% de probabilidade, sendo os dados transformados para $\log(x + 1)$, utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS Institute, 1999-2001). Enquanto os dados obtidos na contagem diferencial foram transformados em arcoseno da raiz ($x/100$), para análise dos plasmatócitos, e em raiz ($x + 0,5$), para as demais células identificadas, e ambos submetidos à análise de variância com as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

A análise em microscopia de luz da hemolinfa de operários de *C. gestroi* tratados e não tratados com o fungo *I. farinosa* revelou a presença dos seguintes tipos celulares: plasmatócitos, prohemócitos, granulócitos, adipohemócitos, esferulócitos e oenocitóides (Fig. 1). Os seis tipos de hemócitos encontrados são reportados na literatura como as células mais frequentes na hemolinfa dos insetos, podendo ser encontrado em diferentes ordens (Silva *et al.* 2000, Silva *et al.* 2002), inclusive Isoptera (Cunha, 2007).

A média total de hemócitos encontrada na hemolinfa dos operários de *C. gestroi* tratados com *I. farinosa* não foi significativamente diferente da média de hemócitos registradas para a testemunha, nos quatro períodos de avaliação ($F_{1,32} = 0,74$; $P = 0,3969$). No entanto, constatou-se uma variação significativa na quantidade de hemócitos em função do tempo ($F_{3,32} = 5,41$; $P = 0,0040$), tendo sido observado um aumento significativo no número de hemócitos no intervalo de

36 horas, apenas na testemunha. Tal fato resultou em interação significativa entre tratamento e tempo ($F_{3,32} = 3,90$; $P = 0,0176$) (Fig. 2).

A ausência de variação nos hemócitos totais pode está relacionado ao não reconhecimento por parte dos hemócitos das partículas estranhas, visto que segundo Pendland & Boucias (1993) os fungos possuem a habilidade para expressar uma variedade de diferentes componentes da superfície celular, as quais podem diferir de célula para célula em função da fase de crescimento ou de mudanças morfológicas. Tais autores constataram que a presença de resíduos de carboidratos em blastósporos e hifas de *I. farinosa*, produzidas em vitro, variam entre si. Estudos semelhantes demonstraram que blastósporos de *I. farinosa* produzidos in vivo não são reconhecidos pelos hemócitos, enquanto as hifas são reconhecidas e ocorre uma tentativa de nodulação por parte dos hemócitos, no entanto são destruídos pelo crescimento das hifas (Pendland *et al.* 1995).

A oscilação significativa no número de hemócitos apenas na testemunha deve-se, possivelmente, a relativa abundância e variabilidade de hemócitos ocorrida com o desenvolvimento do indivíduo (Negreiro *et al.* 2004), pois operários de *C. gestroi* são classificados em cinco ínstares baseando-se na biometria (Barsotti & Costa-Leonardo 2005), e a uniformização torna-se difícil devido ao seu tamanho diminuto.

Os resultados da contagem diferencial dos hemócitos de operários de *C. gestroi* revelaram que as células mais frequentes foram plasmatócitos (96,30%), enquanto os demais tipos celulares representaram apenas 3,63 % das células identificadas, sendo 1,31% de esferulócitos, 1,09% de prohemócitos, 0,85% de granulócitos, 0,30% de oenocitóides e 0,15% de adipohemócitos. Com relação ao número dos diferentes tipos de hemócitos encontrados na hemolinfa, dos insetos infectados e não infectados por *I. farinosa*, não foi registrado diferença significativa nos

diferentes intervalos de tempo avaliado. Constatou-se uma variação significativa somente em função do tempo, para os plasmatócitos ($F_{3,32} = 2,35$; $P = 0,0007$) e prohemócitos ($F_{3,32} = 5,01$; $P = 0,0058$), onde foram registrados aumento no número de plasmatócitos e decréscimo de prohemócitos ao longo do tempo nos dois grupos, infectados e não-infectados (Figs. 3 e 4).

Os dados das contagens total e diferencial apresentados demonstram que o isolado URM-4995 de *I. farinosa* na concentração 10^7 conídios mL^{-1} não interferiu quantitativamente e qualitativamente no número de hemócitos de *C. gestroi*. Em contraste, Cunha (2007) ao realizar contagem diferencial dos hemócitos do térmita *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) em diferentes intervalos de tempo, tratado com *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} registrou significativa alteração no número de hemócitos.

Tal diferença pode ser atribuída a inúmeros fatores. A princípio, pode-se destacar que a resposta imunológica varia com a espécie de hospedeiro e patógeno estudada, fato também comprovado por Bogus *et al.* 2007 ao constatar diferentes estratégias de defesa utilizadas por duas espécies distintas de mariposas, *Dendrolimus pini* (Linnaeus) e *Galleria mellonella* (Linnaeus), em reação a infecção ocasionada pelo fungo, *Conidiobolus coronatus* (Brefeld). Os autores constataram ausência de resposta celular em *D. pini*, apesar da cavidade do corpo está completamente preenchida por hifas do fungo e os órgãos internos danificados, enquanto que em *G. mellonella* foi observado à formação de cápsulas melanizadas.

A invasão da hemocele pelas hifas do fungo pode ainda ter resultado em uma resposta imune humoral, visto que quando o corpo estranho (hifas) é muito grande para ser fagocitado pode ocorrer a encapsulação celular ou humoral. As cápsulas humorais consistem de material amorfo pigmentado, composto principalmente, entre outros elementos, por melanina (Vey & Götz 1975, Götz & Boman 1985). Além disso, os hemócitos podem participar das respostas

imunes humorais de forma indireta, sintetizando e/ou liberando determinadas substâncias que podem agir contra os invasores na porção amorfa ou dentro da própria célula. (Moncada *et al.* 1991, Hoffmann & Reichhart 1997).

Vale lembrar que a sociabilidade oferece interações comportamentais e adaptações bioquímicas, tanto individuais quanto coletivas para proteger a colônia (Cremer *et al.* 2007). Contudo esses mecanismos são onerosos ao indivíduo, e as várias formas de imunidade social podem reduzir o investimento fisiológico na atividade imune (Feldhaar & Gross 2008), como demonstrado para formigas (Castella *et al.* 2008) e abelhas, (Evans *et al.* 2006). Em cupins vários mecanismos de defesa são citados, incluindo produção de secreções químicas antifúngicas (Rosengaus *et al.* 1998, 2000) mecanismos comportamentais (Rosengaus *et al.* 1999a) e mecanismos imunes (Rosengaus *et al.* 1999b, 2007). Para o gênero *Coptotermes*, foi encontrado de 50,56 a 214,6 microgramas de naftaleno por quilo de material do ninho (carton) de *Coptotermes formosanus* (Shiraki) (Chen *et al.* 1998). Segundo os autores a volatilidade deste produto permite-lhe permear o sistema fechado do ninho. Desta forma, o uso de agentes anti-sépticos é um indicativo do investimento em outros mecanismos de defesa por estes térmitas subterrâneos.

Embora pareça contraditório ressaltar a baixa imunidade encontrada nos térmitas em virtude dos resultados apresentados por Cunha (2007), tal contraste é explicado devido a diferentes estratégias de defesa utilizadas por térmitas inferiores e superiores. Por exemplo, soldados de *Coptoterme*, cupins inferiores, apresentam os dois mecanismos de defesa da colônia, mecânico e químico enquanto *Nasutitermes*, cupim superior, possui apenas a defesa química. No entanto segundo Rosengaus *et al.* (2000) as secreções defensivas de *Nasutitermes costalis*

(Holmgren) e *Nasutitermes nigriceps* (Haldeman) apresentam propriedades antifúngicas que os tornam menos suscetível a infecção por *M. anisopliae* em relação a *C. formosanus*.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa ao primeiro autor, possibilitando a realização deste trabalho e a Jorge Braz Torres pela ajuda nas análises estatísticas.

Literatura Citada

- Alves, S.B. 1998.** Fungos Entomopatogênicos, p.289-370. In S.B. Alves, Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163 p.
- Altre, J.A. & J. D. Vandenberg 2001.** Penetration of Cuticle and Proliferation in Hemolymph by *Paecilomyces fumosoroseus* Isolates That Differ in Virulence against Lepidopteran Larvae. J. Invertebr. Pathol. 78: 81-86.
- Barsotti, R.C. & A.M. Costa-Leonardo. 2005.** The caste system of *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae). Sociobiology. 46: 87-103.
- Brayner, F.A. & H.R.C. Menezes. 2005.** Ultrastructural characterizatio of the hemobytes os *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Micron 36: 359-367.
- Bogus, M.I., E. Kedra, J. Bania, M. Szczepanik, M. Czygier, P. Jablonski, A. Pasztaleniec, J. Samborski, J. Mazgajska & A. Polanowski. 2007.** Different defense strategies of *Dendrolimus pini*, *Galleria mellonella*, and *Calliphora vicina* against fungal infection. J. Insect Physiol. 53: 909–922.
- Castella, G., M. Chapuisat, Y. Moret & P. Christe. 2008.** The presence of conifer resin decreases the use of the immune system in wood ants. Ecol. Entomol. 33: 408-412.

- Chen, J., G. Henderson, C.C. Grimm, S.W. Lloyd & R.A. Laine. 1998.** Termites fumigate their nests with naphthalene. *Nature* 392: 558-559.
- Constantino, R. 2002.** The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. *J. Appl. Ent.* 126: 355-365.
- Costa-Leonardo, A.M. 2002.** Cupins-Praga: Morfologia, Biologia e Controle. Rio Claro, UNESP, 128p.
- Cremer, S., S.A.O. Armitage & P. Schmid-Hempel. 2007.** Social Immunity. *Curr. Biol.* 17: 693-702.
- Cunha, F.M. 2007.** Aspectos imunológicos e morfologia do canal alimentar de operários de *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). Dissertação, URPE, Recife, 44p.
- Evans, J.D., K. Aronstein, Y. P. Chen, C. Hetru, J.L. Imler, H. Jiang, M. Kanost, G. J. Thompson, Z. Zou & D. Hultmark. 2006.** Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera* *Insect Mol. Biol.* 15: 645–656.
- Falleiros, A.M.F., M.T.S. Bombonato & E.A. Gregório. 2003.** Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Braz. Arch. Technol.* 46: 287-294.
- Faria, M.R. & B.P. Magalhães. 2001.** O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. *Biotechnol. Cienc. & Desenvol.* 22:18-44.
- Faria, M.R & S.P. Wraight. 2007.** Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulations types. *Biol. Control* 43: 237-256.

- Feldhaar, H. & R. Gross. 2008.** Immune reactions of insect on bacterial pathogens and mutualists. *Microbes Infect.* 10: 1082-1088.
- Götz, P. & Boman, H.G. 1985.** Insect immunity, p.454-485. In: G.A Kertut, L.I Gilbert. (eds.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology.* Oxford, Pergamon Press, 711p.
- Hoffmann, J.A & J.M. Reichhart. 1997.** *Drosophila* immunity. *Trends in Cell Biol.* 7: 309-315.
- Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol.* 32: 1295-1309.
- Moncada, S., R.M.J Palmer & E.A. Higgs. 1991.** Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-42.
- Negreiro, M.C.C., Andarde, F.G. & Falleiros, A.M.F. 2004.** Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes no AgMNPV. *Semina: Cienc. Agr.* 25: 293-3008.
- Pendland, J.C. & D.G. Boucias. 1993.** Variations in the ability of galactose and mannose-specific lectins to bind to cell wall surfaces during growth of the insect pathogenic fungus *Paecilomyces farinosus*. *Eur. J. Cell Biol.* 60:322-330.
- Pendland, J.C., S. Hung & D.G. Boucias. 1995.** In vivo development of the entomogeneous hyphomycete *Paecilomyces farinosus* in host *Spodoptera exigua* (beet armyworm) larvae. *Mycopathologia* 130: 151-158.
- Rosengaus, R.B, M.R. Guldin & J.F.A. Traniello. 1998.** Inhibitory effect of termite fecal pellets on fungal spore germination. *J. Chem. Ecol.* 24: 1697-1706

- Rosengaus, R.B., C. Jordan, M.L. Lefebvre & J.F.A. Traniello. 1999a.** Pathogen alarm behavior in a termite: A new form of communication in social insects. *Naturwissenschaften* 86: 544–548.
- Rosengaus, R.B., F.A.J. Traniello, T. Chen & J.J. Brown. 1999b.** Immunity in a Social Insect. *Naturwissenschaften*. 86: 588–591.
- Rosengaus, R.B., M.L. Lefebvre & J.F.A. Traniello. 2000.** Inhibition of fungal spore germination by *Nasutitermes*: evidence for a possible antiseptic role of soldier defensive secretions. *J. Chem. Ecol.* 26: 21–39.
- Rosengaus, R.B., T. Cornelisse, K. Guschanski & J.F.A. Traniello. 2007.** Inducible immune proteins in the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis*. *Naturwissenschaften* 94: 25–33.
- Silva, C De.; G.B. Dunphy & M.E. Rau. 2000.** Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. *Dev. Compar. Immunol.* 24: 367-379.
- Silva, J.E.B.; I.C. Boleli & Z.L.P. Simões. 2002.** Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. *Braz. J. Biol.* 62:689-699.
- SAS Institute. 1999-2001.** SAS user's guide: Statistics, version 8.2, 6th ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Vey, A. & P. Götz. 1975.** Humoral encapsulation in Diptera (Insecta): comparative studies in vitro. *Parasitology* 70: 77-86.
- Wright, M.S., W.J. Connick & M.A. Jackson. 2003.** Use of *Paecilomyces* spp. as pathogenic agents against subterranean termites. U.S. Patent 20030095951.

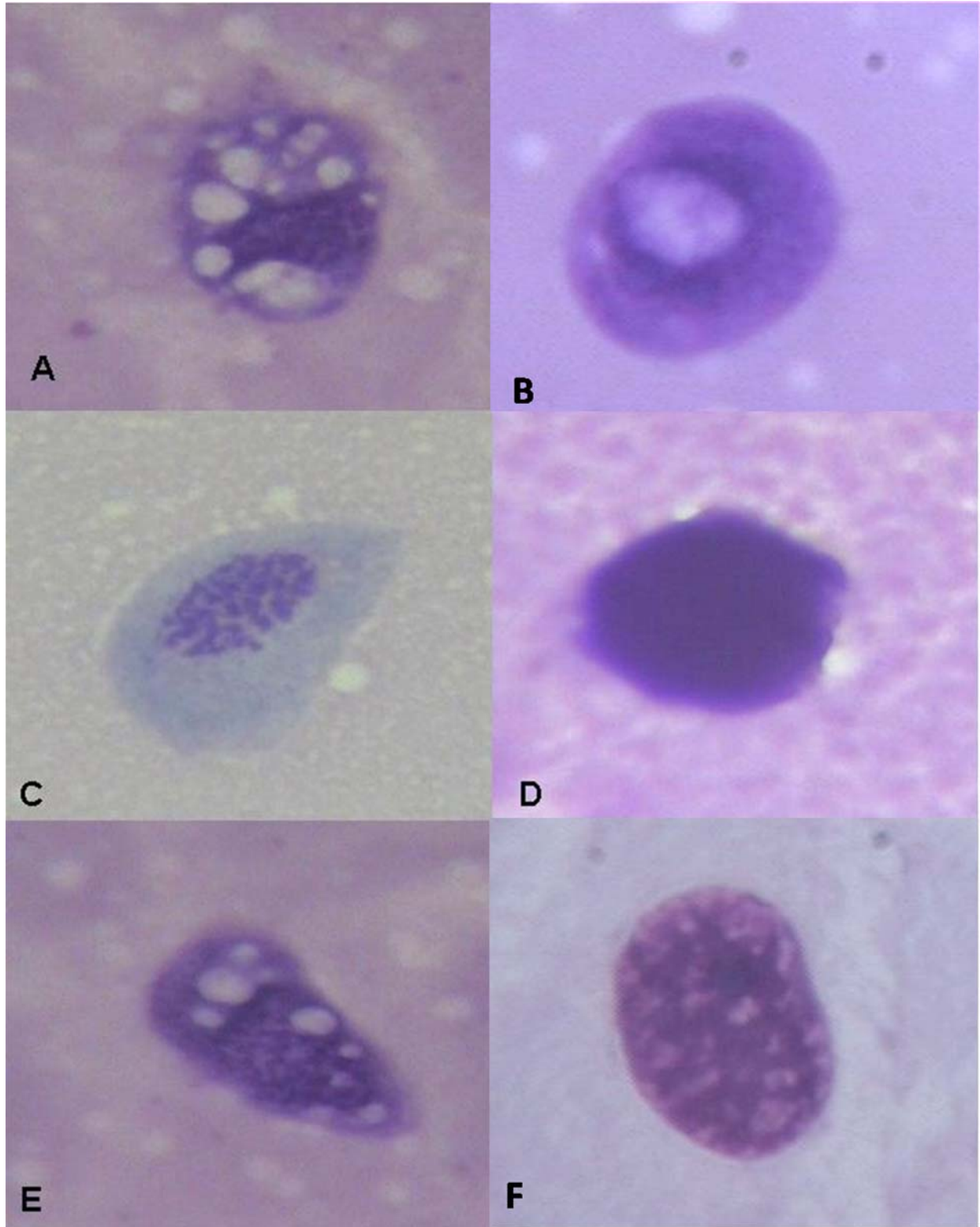


Figura 1: Hemócitos de *C. gestroi*: Esferulócito (A); Oenocitóide (B); Plasmátocito (C); Prohemócito (D); Adipohemócito (E); Granulócito (F). Coloração Giemsa. Aumento $\pm 1071X$

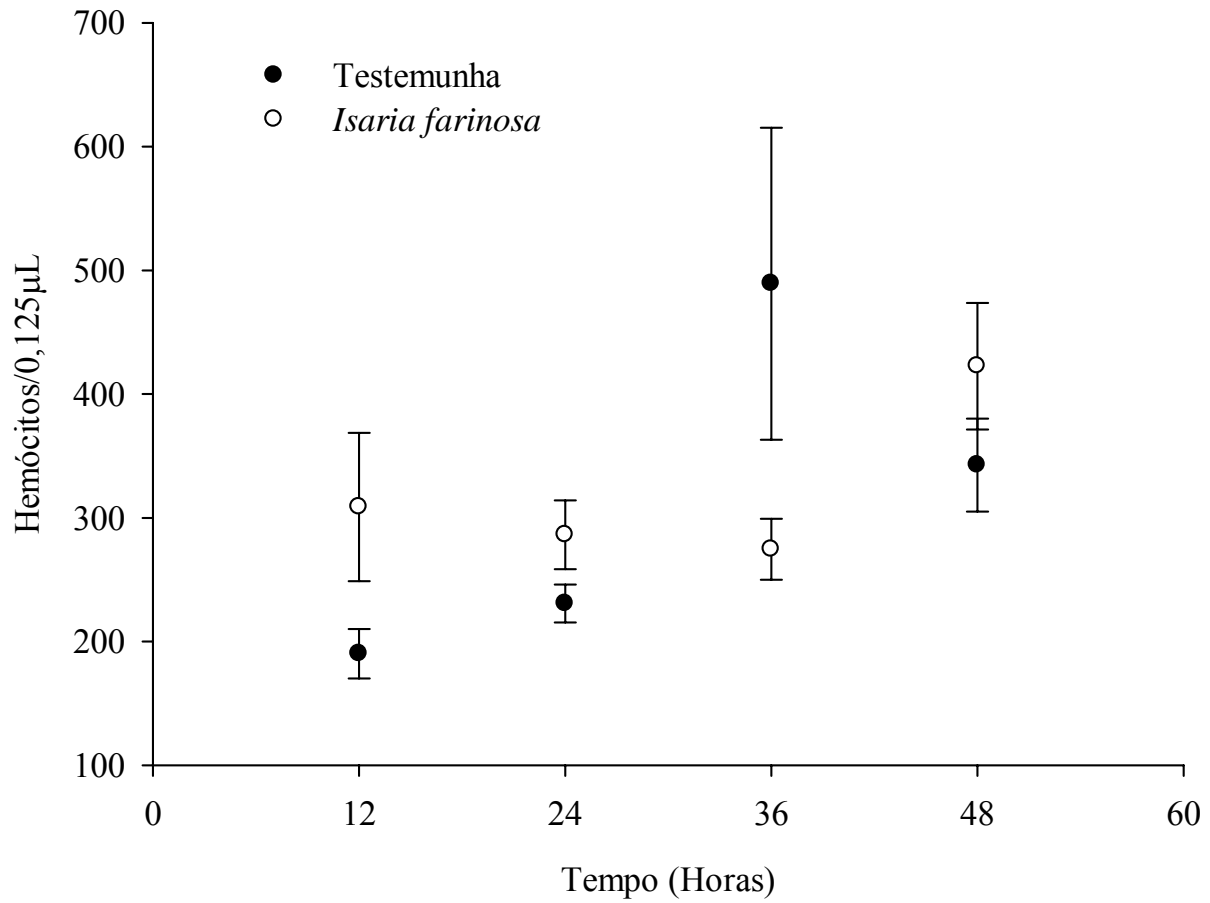


Figura 2: Número de hemócitos em aproximadamente 0,125µL de hemolinfa mais anticoagulante de operários de *C. gestroi* tratados ou não com o isolado URM 4995 de *I. farinosa*, durante o período adotado para avaliação (12, 24, 36 e 48 horas).

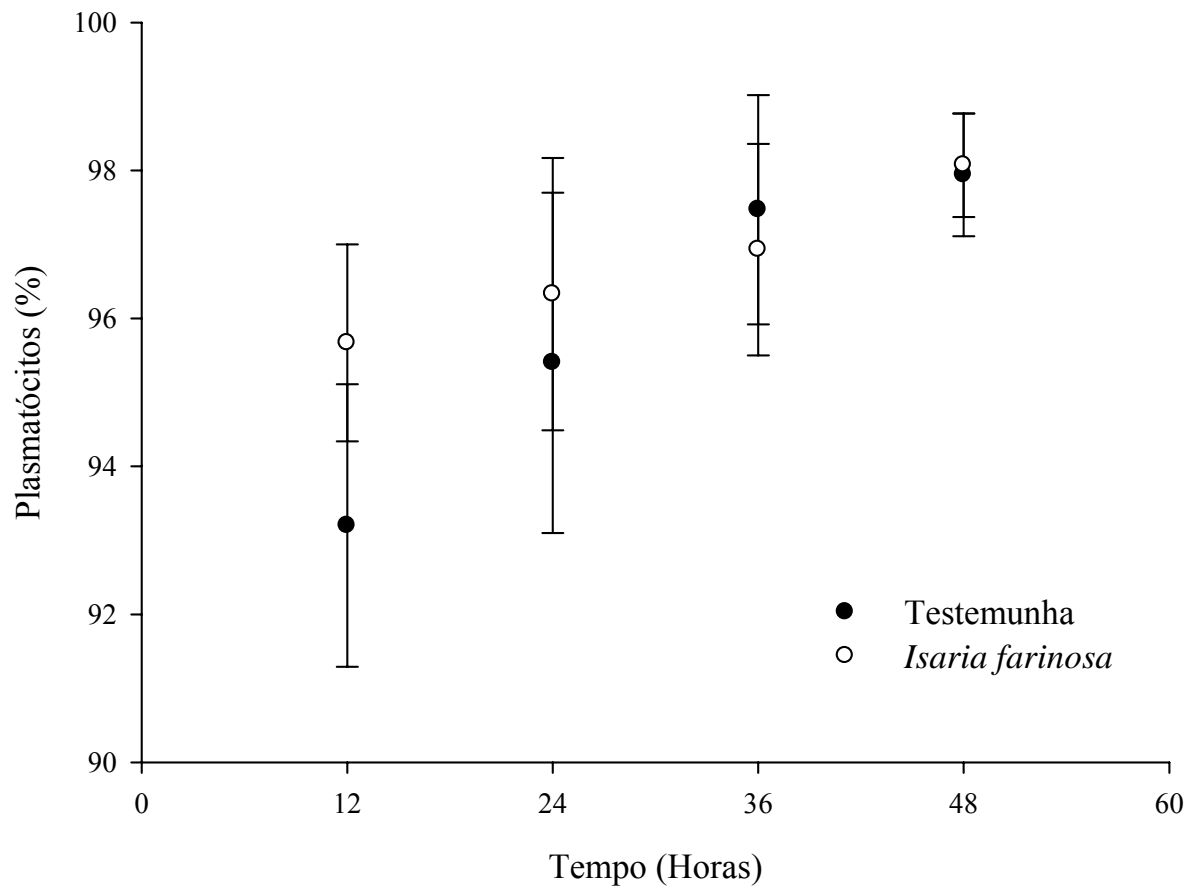


Figura 3: Percentual de plasmatócitos encontrados na hemolinfa de operários de *C. gestroi* tratados ou não com o isolado URM 4995 de *I. farinosa*, durante o período adotado para avaliação (12, 24, 36 e 48 horas).

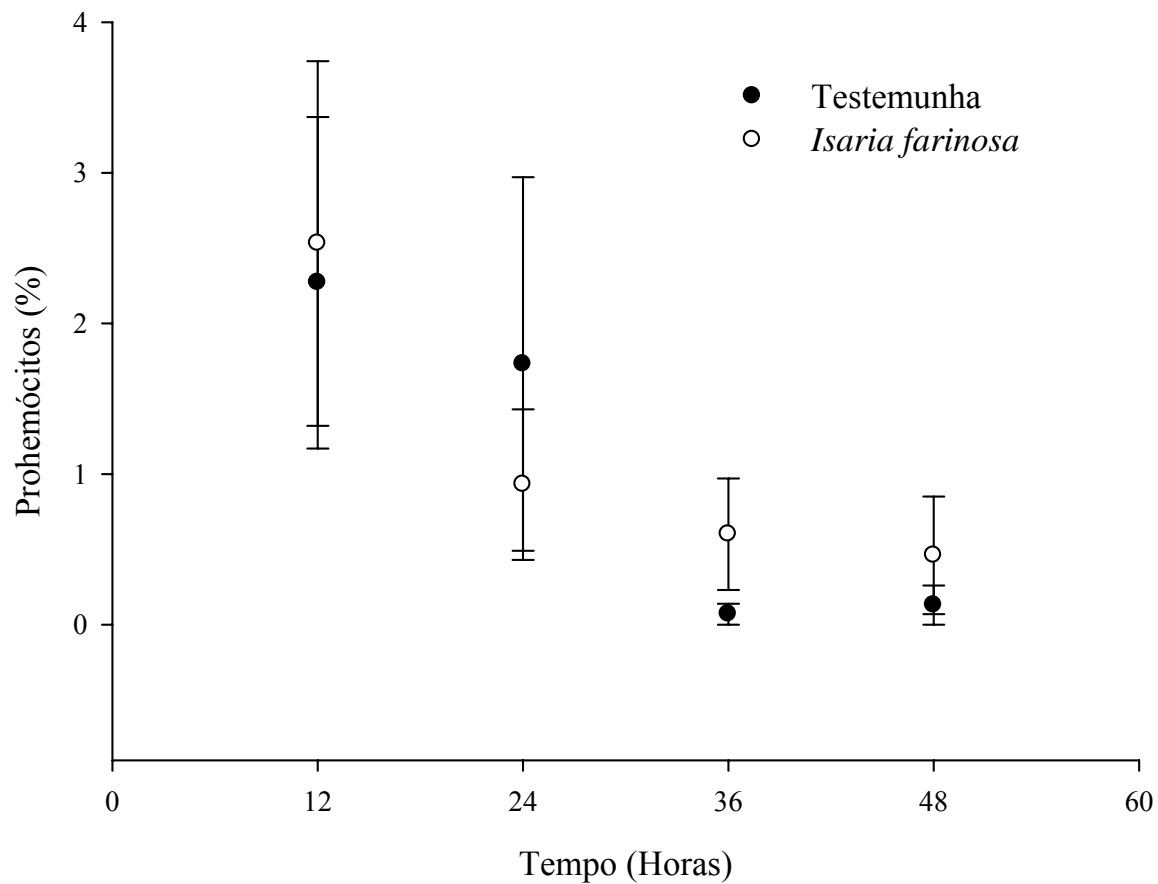


Figura 4: Percentual de prohemócitos encontrados na hemolinfa de operários de *C. gestroi* tratados ou não com o isolado URM 4995 de *I. farinosa*, durante o período adotado para avaliação (12, 24, 36 e 48 horas).