

Diseminación de *Beauveria bassiana* entre operarios de *Heterotermes tenuis*

Luciana G. de Gusmão*

Enrique A. Castiglioni**

Sérgio B. Alves*

RESUMEN. *Heterotermes tenuis* es la especie de termita que causa mayores daños en caña de azúcar en Brasil, llegando a reducir la producción en 10 ton/ha/año. En este trabajo se evaluó la diseminación de *Beauveria bassiana*, cepa 634, para el control de *H. tenuis* en condiciones de laboratorio. Los tratamientos utilizados fueron diferentes proporciones de individuos inoculados y no inoculados y se evaluaron durante 5 días. Los tratamientos con 2,5; 12,5; 25,0; 50,0 y 75,0% de individuos inoculados presentaron mayor mortalidad, comparado con la proporción inicial de inoculación. Al final del período, con excepción del testigo, todos los tratamientos presentaron una mortalidad superior a 50%. En los tratamientos con más de 50 insectos inoculados inicialmente, la mortalidad fue mayor a 80%, sin diferencias estadísticas entre ellos.

Palabras clave: *Heterotermes tenuis*, Termita subterránea, *Beauveria bassiana*, Hongos entomopatógenos.

ABSTRACT. *Dissemination of Beauveria bassiana in Heterotermes tenuis workers.* *H. tenuis* is the termite species that causes most damage to sugarcane in Brazil, reducing productions by 10 ton/ha/year. In this study the dissemination of *Beauveria bassiana*, strain 634, for the control of *H. tenuis* in laboratory conditions was evaluated. The treatments used were different proportions of inoculated and not inoculated individuals, and these were evaluated over 5 days. The treatments with 2.5, 12.5, 25.0, 50.0, and 75.0; % of inoculated insects showed a higher percentage mortality compared with the initial proportion inoculation. At the end of the assay, all treatments except for the control showed a mortality greater than 50%. In the treatments with more than 50 insects inoculated initially, mortality was greater than 80%, with no statistical differences between them.

Key words: *Heterotermes tenuis*, Subterranean termite, *Beauveria bassiana*, Entomopathogenic fungi.

Introducción

La caña de azúcar es uno de los principales cultivos de Brasil, tanto por el área dedicada a su producción, la cual es de aproximadamente 4 200 000 ha, como por la importancia económica para el país por la exportación de azúcar y el programa nacional de alcohol (Ministério do Planejamento e Orçamento 1994). Sin embargo, las plagas ocasionan grandes pérdidas en este cultivo. Actualmente, las termitas constituyen una de las plagas más importantes de la caña de azúcar, principalmente *Heterotermes tenuis* (Isoptera: Rhinotermitidae), una de las especies más frecuentes y de mayor distribución (Arrigoni *et al.* 1989). En Brasil, las termitas llegan a ocasionar reducciones de 10 ton/ha/año en caña de azúcar (Novaretti 1985).

Los estudios referentes a *H. tenuis* son escasos, pues su ocurrencia como plaga, en Brasil, es relativamente reciente. Como especie perteneciente a la familia Rhinotermitidae, construyen nidos subterráneos, acartonados y difusos, donde vive una parte o toda la colonia. Cuando, eventualmente, transitan por áreas expuestas construyen túneles con detritos vegetales, suelo y heces. Se alimentan de material leñoso en varias fases de descomposición, siendo muy común que alcancen partes vitales de las plantas, como toletes de caña recién plantados, sistema radicular y entrenudos basales de caña en formación o adulta (Macedo 1995).

En la estructura social de la colonia de *H. tenuis*, la reina y el rey son responsables de la reproducción

Recibido: 30/09/98. Aprobado: 30/06/99.

* Departamento de Entomología, ESALQ/USP, Caixa Postal 9, 13418-900, Piracicaba-SP, Brasil.

** Estación Experimental Dr. M.A. Cassinoni, Facultad de Agronomía, Ruta 3, Km 373, Paysandú, Uruguay.

de la colonia, y se conoce la existencia de reinas sustitutas, no funcionales, mientras viva la reina principal. Los soldados cumplen funciones de defensa y los operarios son los encargados de la alimentación de los integrantes del nido. Los operarios buscan alimento fuera de la colonia (forrajean) alimentándose ellos y sirviendo a los demás integrantes de las misma, a través de trofolaxia (alimentación proctodeica). Los soldados son incapaces de alimentarse por si mismos. La proporción natural de operarios y soldados no es totalmente conocida. En trampas dispuestas en el campo, el número de individuos de ambas castas es variable, pero la proporción de soldados raramente es superior a 1:20.

En los últimos años han surgido nuevas estrategias para el control de las termitas subterráneas, como el cebo trampa basado en el comportamiento social del insecto, trofalaxis, hábitos de limpieza y tigmotropismo. El principio de esta estrategia es la transmisión directa al insecto de agentes químicos o microbianos, con el propósito de llegar a toda la colonia mediante el contagio e intercambio de alimento (Myles 1992). Así, el uso de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* constituye una alternativa viable. Además las colonias de *H. tenuis* ofrecen condiciones favorables de temperatura y humedad. También el comportamiento social de esta especie facilita el uso del hongo, en cebos trampa muy atractivos como el Termitrap®. Este cebo ha sido utilizado para el monitoreo de poblaciones de esta plaga en caña de azúcar y bosques, así como para su control, mediante la introducción de inóculo. Además puede ser empleado en asociación con un insecticida químico en subdosis (Almeida 1994; Almeida & Alves 1995).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la diseminación de *B. bassiana* para el control de *H. tenuis* en condiciones de laboratorio.

Materiales y métodos

El trabajo fue realizado en el laboratorio de Patología de Insectos del Departamento de Entomología de la "Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz" de la Universidade de São Paulo en Piracicaba, SP, Brasil.

Se utilizó la cepa 634 de *B. bassiana* proveniente de la colección de microorganismos entomopatógenos del mismo laboratorio. Según Almeida (1994), ésta es la cepa más promisoría para ser usada en un programa de control microbiano de *H. tenuis*, debido a su virulencia y productividad. Las termitas utilizadas en el

experimento fueron recolectadas en Santa Helena, Piracicaba, SP, con ayuda de trampas Termitrap®, distribuidas en los entresurcos de una plantación de caña de azúcar. Los especímenes utilizados fueron operarios de edad no determinada, pero ágiles y sanos.

Se evaluaron siete tratamientos y tres repeticiones de 200 insectos cada uno, para un total de 4200 operarios. Se probaron las siguientes proporciones de termitas inoculadas/no inoculadas: 200/0, 150/50, 100/100, 50/150, 25/175, 5/195 y 0/200 (testigo).

La inoculación de las termitas se realizó mediante pulverización directa, de 3 ml de una suspensión de *B. bassiana* conteniendo 5×10^8 conidios viables/ml, por repetición, utilizando una Torre de Potter calibrada $0,35 \mu\text{l}/\text{cm}^2$. De esta manera, cada individuo recibió un potencial de inóculo de aproximadamente 7 000 conidios viables, estimados por el cálculo del área corporal. Los insectos no inoculados fueron asperjados con agua esterilizada más dispersante adhesivo Tween 20 a 1% de concentración. Después de la aplicación del patógeno, las termitas fueron colocadas en cajas de Petri, donde permanecieron hasta el final de la evaluación.

En las cajas de Petri (13,5 x 1,0 cm) se revistió el fondo con papel de filtro humedecido con 1 ml de agua destilada y cartón corrugado humedecido hasta punto de saturación sin alcanzar el escurrimiento. Para facilitar el conteo de los insectos, las dos hojas del cartón fueron separadas.

En cada repetición se utilizaron operarios procedentes de la misma trampa para evitar la mezcla de individuos de diferentes colonias. Después de la inoculación, las cajas fueron colocadas en cámara climatizada (B.O.D.) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y de oscuridad completa. La humedad relativa se mantuvo en un valor cercano a la saturación, mediante adición de 1 ml de agua destilada sobre un trozo cilíndrico de algodón de aproximadamente 1 cm de largo por 1 cm de diámetro ($\pm 0,14$ g), colocado entre la hoja superior de cartón y la tapa de la caja. Se evaluó la mortalidad diaria durante 5 días, por conteo de especímenes sobrevivientes, debido a que los individuos muertos no debían ser retirados de las cajas hasta la finalización del experimento y porque en pruebas preliminares se observaron muchos cadáveres mutilados.

El diseño utilizado fue un factorial (tratamientos x días de evaluación), los resultados de mortalidad fueron sometidos a un análisis de varianza. Para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($P < 0,05$).

Resultados y discusión

La metodología utilizada para el mantenimiento de los insectos fue adecuada, observándose una mortalidad del 15% en el testigo al 5° día de evaluación, lo cual es un valor razonable para esta especie y tipo de prueba. Almeida (1994) logró mantener vivos operarios y soldados de *H. tenuis*, durante 10 días en laboratorio, en cajas de plástico (6 x 1 cm) con tapa de tejido y celulosa. El control diario de la humedad dentro de las cajas de Petri fue muy importante para la sobrevivencia de los insectos (Becker 1969, Adamson 1941, Ahmad *et al.* 1982).

Inicialmente, muchos insectos presentaron coloración rosada y posteriormente signos de esporulación del hongo. También se observó disminución de la movilidad y agregación de las termitas, lo cual coincide con lo señalado por Moino (1998).

No se determinó un efecto de repelencia al hongo por parte de los especímenes sanos, porque estos caminaron normalmente alrededor de los cadáveres y los insectos enfermos. Varios de los insectos muertos se encontraron mutilados, validando los resultados de las pruebas preliminares, que afirman que la evaluación de la mortalidad debe basarse en el conteo de los especímenes sobrevivientes. Durante las evaluaciones se observó contacto directo entre los insectos, posiblemente, como un intento de limpiar el cuerpo de las termitas contaminadas. Inicialmente se observó que los especímenes intentaron aislar los cadáveres, los cuales fueron agrupados entre las hojas de cartón, pero este comportamiento cesó con el aumento de la mortalidad. Almeida (1994) señaló que termitas enfermas, de esta misma especie, convivían normalmente con las sanas, sugiriendo la incapacidad de *H. tenuis*

para detectar la presencia de individuos enfermos o contaminados con patógenos. Sin embargo, esta observación en condiciones de laboratorio podría diferir de las manifestadas en condiciones de campo.

Se consideró un período de evaluación de 5 días, porque a partir del 6° día, el testigo presentó mortalidad superior a 21,4% y los demás tratamientos alcanzaron como mínimo 50% (Fig. 1).

En forma general, la mortalidad de los insectos por contaminación con *B. bassiana* se presentó desde el primer días después de la inoculación, pero sin diferencias significativas entre tratamientos. La mortalidad se incrementó después del tercer día de inoculación (Cuadro 1), lo cual coincide con los resultados obtenidos por Moino (1998), quien registró bajos niveles de mortalidad en *H. tenuis* hasta el segundo ddi de *B. bassiana*. Almeida *et al.* (1997) determinaron valores de TL₅₀ de 2,91 a 4,91 días para operarios y soldados de *H. tenuis*, inoculados con 15 cepas de *B. bassiana*, aún cuando los intervalos de confianza mostraron diferencias significativas únicamente entre las cepas 678 y las cepas 447 (padrón) y 900.

Para la especie *Cornitermes cumulans*, Fernandes (1991) informó de una mortalidad acumulada entre 44% y 80%, al tercer día después de la inoculación de cinco cepas de *B. bassiana*. En una evaluación de siete cepas de este entomopatógeno y siete de *Metarhizium anisopliae*, 12 de las 14 cepas evaluadas provocaron cerca de 100% de mortalidad en *C. cumulans* y *C. snyderi*, 84 horas después de la inoculación (Fernandes *et al.* 1993).

Jones *et al.* (1996) determinaron un TL₅₀ de 2,9 días, para operarios de *Coptotermes formosanus*, en un experimento de transmisión horizontal de *B. bassiana* (cepa 787).

CUADRO 1. Porcentaje de mortalidad media acumulada [m + s(m)] de operarios de *Heterotermes tenuis*, en días después de la inoculación (d.d.i.) con *Beauveria bassiana* (cepa 634) y para tratamientos de diferente proporción de insectos inoculados.

| Tratamientos | Porcentaje de mortalidad de acuerdo a los ddi | | | | | Media |
|--------------|---|--------------|-------------|---------------|---------------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| 200/0 | 11,2 ±2,55a* | 20,4 ±4,21ab | 55,9 ±4,59a | 96,5 ± 0,63a | 100,0 ±0,0a | 56,8a |
| 150/50 | 9,9 ±0,49a | 14,6 ±0,66ab | 55,3±5,19a | 88,6 ± 1,49a | 99,5 ±0,28a | 53,6a |
| 100/100 | 24,6 ±6,21a | 35,1 ±6,96a | 62,2 ±8,95a | 85,7 ± 7,11a | 98,9 ±1,10a | 61,3a |
| 50/150 | 7,9 ±1,07a | 10,0 ±2,26ab | 27,7 ±9,76b | 51,1±11,40b | 82,0 ±14,01ab | 35,7b |
| 25/175 | 3,7 ±0,17a | 5,2 ±0,38b | 14,7±1,20b | 33,1 ± 3,01bc | 58,7 ± 7,97b | 23,1c |
| 5/195 | 7,3 ±0,14a | 8,8 ±0,35b | 13,8 ±2,41b | 25,8 ± 6,33bc | 63,0 ±21,28b | 23,7c |
| 0/200 | 0,7 ±0,66a | 2,0 ±1,04b | 3,6 ±1,68b | 7,6 ± 2,33c | 15,9 ± 3,27c | 5,0d |
| Media | 9,3 D | 13,7 D | 33,3 C | 55,5 B | 74,0 A | |

C.V. = 28,5%

*Medias seguidas de la misma letra minúscula en la columna y mayúscula en la fila no difieren significativamente entre sí por la prueba de Tukey (P < 0,05).

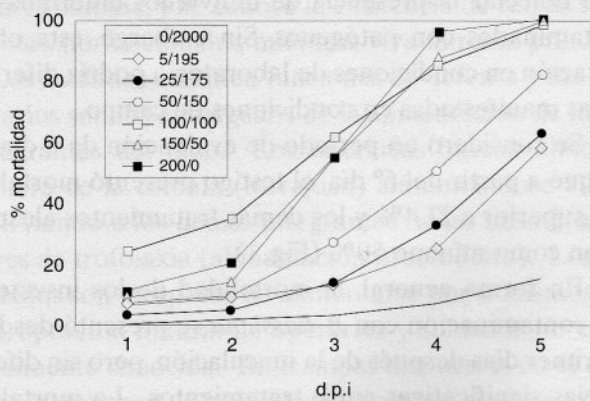


Figura 1. Porcentagem de mortalidade acumulada de operários de *Heterotermes tenuis* dias depois da inoculação (d.d.i.) com *Beauveria bassiana* (cepa 634), em tratamentos com diferente proporção de indivíduos inoculados.

La mortalidad de *H. tenuis*, en el tercer día de evaluación y para los tratamientos con más de 50 individuos inoculados fue significativamente mayor ($P < 0,05$) que los demás tratamientos. En los tratamientos con 50 o más insectos inicialmente inoculados, al quinto día de evaluación se registró una morta-

Literatura citada

- ADAMSON, A.M. 1941. Laboratory technique for the study of living termites. *Ecology* 22: 411-414.
- ALMEIDA, J.E.M. 1994. Avaliação de fungos entomopatogênicos visando ao controle do cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858) (Isoptera, Rhinotermitidae). Tese de Mestrado. Piracicaba, Brasil, ESALQ/USP. 105 p.
- AHMAD, M.; AFZAL, M.; SALIHAN, Z. 1982. The effects of different relative humidities on survival and moisture loss of workers and soldiers of *Heterotermes indicola* (Wasman) (Isoptera: Rhinotermitidae) under starvation conditions. *Pakistan Journal Zoology* 14:65-70.
- ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. 1995. Seleção de armadilhas para captura de *Heterotermes tenuis* (Hagen). *An. Soc. Entomol. Brasil*, 24:619-624.
- ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. 1997. Selection of *Beauveria* spp. isolates for control of the termite *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858). *J. Appl. Ent.* 121:539-543.
- ARRIGONI, E.B.; ALMEIDA, L.C.; KASTEN Jr., P.; PRECETTI, A.A.C.M. 1989. Distribuição de espécies de cupins, em cana-de-açúcar, em unidades cooperadas das regiões de Jaú e Sertãozinho. *Bol. Tec. Copersucar* 48:38-47.
- BECKER, G. 1969. Rearing of termites and testing methods used in the laboratory. In Krishna, K.; F. Weesner (eds.). *Biology of termites*. New York, Academic Press. p. 351-385.
- FERNANDES, P.M. 1991. Controle microbiano de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera-Termitidae) utilizando *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Tese de Doutorado. Piracicaba, Brasil. ESALQ/USP, 114 p.

lidad superior a 80% (Cuadro 1), y todos los tratamientos difieren significativamente ($P < 0,05$) de grupo de insectos no inoculados (testigo). Así, a pesar de la elevada capacidad de las termitas para la limpieza de conidios, observada por Moino Jr. (1998) también en condiciones de laboratorio, se determinó transmisión de los conidios de un insecto a otro, provocando la ocurrencia de la enfermedad.

Los tratamientos 150/50, 100/100 y 50/150 difieren estadísticamente del 200/0 (todos inoculados) al final del período de evaluación (Cuadro 1). La transmisión fue constatada, porque en todos los tratamientos con insectos inoculados se presentó una alta mortalidad final comparada con el número inicial de insectos inoculados. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Almeida (1994), quien verificó la transmisión de la cepa 634 de *B. bassiana* en *H. tenuis* entre individuos contaminados y no contaminados días después de la inoculación.

Agradecimientos

A la FINEP por el financiamiento de la investigación y a la técnica Solange Aparecida Vieira, por el apoyo durante la investigación.

- FERNANDES, P.M.; FAGANELLO, F.S.; TEIXEIRA, A. 1993. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. para o controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) y *snyderi* Emerson. In Congresso Brasileiro de Entomologia (14, 1993, Piracicaba, Brasil). Resumos. p. 311.
- JONES, W.E.; GRACE, J.K.; TAMASHIRO, M. 1996. Virulence of seven isolates of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to *Coptotermes formosanus*. *Environ. Entomol.* 25:481-487.
- MACEDO, N. 1995. Atualização no controle de cupins subterrâneos em cana-de-açúcar. In Berti Filho, E.; L.R. (eds.). *Alguns aspectos actuais da biologia e controle de cupins*. Piracicaba, Brasil, FEALQ. p. 121-126.
- MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO E ORÇAMENTO (Brasil). 1994. Dados de produção vegetal-IBGE. *Arquivos do IBGE* 54:3-29.
- MOINO Jr., A. 1998. Fatores que afetam a eficiência de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no controle de *Heterotermes tenuis* (Isoptera, Rhinotermitidae). Tese de Doutorado. Piracicaba, Brasil, ESALQ/USP. 134 p.
- MYLES, T.G. 1992. The trap-treat-releax technique for control of subterranean termites. In International Congress of Entomology (19, 1992, Beijing). Resumos. p. VIII.
- NOVARETTI, W.R.T. 1985. Controle de cupins em cana-de-açúcar através do emprego de inseticidas de solo. *Bol. Copersucar* 33:39-44.