

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

ANÁLISE DE SUBSTRATOS PARA TESTES DE SOBREVIVÊNCIA COM *NASUTITERMES COXIPOENSIS* (HOLMGREN) (ISOPTERA: TERMITIDAE)A.C. Albuquerque¹, F.M. Cunha¹, M.A.P. Oliveira¹, A.F.S.L. Veiga¹, E.A. Luna-Alves Lima²¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Laboratório de Entomologia, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/nº, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

Pesquisas sobre patogenicidade necessitam de conhecimentos básicos em biologia e ecologia dos organismos envolvidos no estudo. O presente trabalho descreve uma técnica de manutenção do cupim *Nasutitermes coxipoensis* em condições de laboratório a fim de realização de testes com fungos entomopatogênicos. Os cupins foram mantidos em caixas plásticas contendo pedaço de ninho (20 g) e substratos alimentares diferentes: madeira em decomposição, madeira seca, colmo de cana-de-açúcar e papel madeira. Utilizou-se a função de sobrevivência $S(t)$ com o objetivo de verificar a probabilidade de vida dos insetos até um tempo t (18 dias), a fim de mantê-los em condições de laboratório. Os resultados indicaram que o substrato que possibilitou maior tempo de sobrevivência foi cana-de-açúcar, seguido de papel madeira picado. Tais informações possibilitarão a realização de testes diversos com cupins, em condições de laboratório.

PALAVRAS-CHAVE: Cupim, substratos, sobrevivência.

ABSTRACT

ANALYSES OF SUBSTRATES FOR SURVIVAL TESTS WITH *NASUTITERMES COXIPOENSIS* (HOLMGREN) (ISOPTERA: TERMITIDAE). Investigations concerning pathogenicity require basic knowledge in the biology and ecology of the target species involved in the study. The present work describes a technique to maintain the termite *Nasutitermes coxipoensis* under laboratory conditions to conduct tests with entomopathogenic fungi. The termites were maintained in plastic boxes with a piece of the original nest (20 g) and different food substrates: rotting wood, dry wood, sugarcane pulp, and wood paper. The survival function $S(t)$ was applied to determine the best substrate for maintaining the termites under laboratory conditions, considering an ending time for the experiment of 18 days (t). The results indicated the sugarcane pulp, followed by wood paper as the best substrates for maintaining *N. coxipoensis*. This information will open opportunities for studies with termites under laboratory conditions.

KEY WORDS: Termite, substrates, survive.

Estudos de patogenicidade de fungos sobre insetos exigem, em muitos casos, a manutenção de populações em laboratório, a fim de se observar os sintomas de desenvolvimento da doença. A longevidade dos insetos em laboratório pode ser alterada devido a uma série de fatores tais como: temperatura, umidade, fotoperíodo e alimentação. Além disso, a mudança de habitat constitui, muitas vezes, um fator limitante. Com relação aos insetos sociais, tais questões tornam-se ainda mais complexas, visto que esses animais constroem ninhos com condições ambientais controladas e comportam-se de maneira específica de acordo com o tipo de relação social envolvida (TRANIELLO; LEUTHOLD, 2000).

Os cupins ou térmitas são insetos sociais e polimórficos que vivem em colônias constituídas por centenas, milhares e até milhões de indivíduos. Realizam divisão de tarefas entre grupos especializados, denominados castas, e as colônias são compartilhadas por pais e filhos de diferentes idades, que vivem em completa interdependência, não existindo indivíduos vivendo isoladamente (WILSON, 1971; MARANHÃO, 1978; GALLO *et al.*, 2002).

O estudo de cupins em laboratório apresenta dificuldades específicas devido à sensibilidade dos indivíduos ao serem separados da colônia, tendo como consequência redução da longevidade. A sobrevivência

²Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, Laboratório de Controle Biológico, Recife, PE, Brasil.

da população experimental em testes de patogenicidade com fungos é de fundamental importância para a análise dos resultados. Diversos fatores estimulam as pesquisas sobre controle de cupins, especialmente aquelas que visam minimizar a utilização de inseticidas químicos. A proibição de produtos organoclorados na cultura da cana-de-açúcar no Brasil incentivou a racionalização no uso de inseticidas para o controle de cupins (PIZANO, 1995). Assim sendo, o desenvolvimento de algum produto alternativo e que não agrida o meio ambiente será de grande importância para a redução das populações desses insetos (MARTIUS, 1998).

Estudos de controle biológico com fungos entomopatogênicos foram efetuados em cupins das espécies: *Nasutitermes exitiosus* (HANEL, 1981, 1982a, 1982b; HANEL; WATSON, 1983), *Coptotermes formosanus* (KO *et al.*, 1982; LAI *et al.*, 1982), *Reticulitermes* sp. (KRAM *et al.*, 1982, KRAM; WEST, 1982), *Cornitermes cumulans* (FERNANDES, 1991), *Nasutitermes* sp. (MALAGODI; VEIGA, 1994) *Nasutitermes coxipoensis* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2005).

A realização de testes de patogenicidade com o cupim *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) e fungos entomopatogênicos em laboratório exigiram a pesquisa de substrato específico que favorecesse uma maior longevidade da população teste. Dentro desta perspectiva, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a sobrevivência de *N. coxipoensis* submetido a diferentes substratos alimentares em laboratório.

Foram utilizados os seguintes substratos: ninho de cupinzeiro (20 g retirados da parte intermediária do ninho); tronco de sombrairo (*Clitoria fairchildiana*) em decomposição (pedaços de 20 g), pó de serra, considerado madeira seca; pedaços de colmo de cana-de-açúcar e papel madeira picado. O experimento foi distribuído em cinco tratamentos com cinco repetições cada. Os tratamentos foram assim discriminados: ninho de cupinzeiro sem alimento; madeira em decomposição; madeira seca; cana-de-açúcar e papel madeira picado. Nos tratamentos onde foi adicionado o alimento também foi colocado um pedaço de ninho de cupinzeiro para servir de abrigo. Cada parcela experimental foi constituída de um recipiente plástico transparente, medindo 5,5 cm de altura por 5 cm de diâmetro, forrado com papel filtro, dentro do qual foram colocados aproximadamente 20 g de ninho do cupinzeiro seco, uma pequena porção do substrato fago estimulante mais os cupins. Os dados foram obtidos a partir do tempo de sobrevivência de 1.500 cupins durante o período de 18 dias. Os cupins foram igualmente subdivididos entre os cinco substratos, sendo que em cada substrato foram obtidas 3 réplicas de 100 cupins cada dos quais 20 eram soldados e 80 eram operárias, na

proporção 1:4 (um soldado para quatro operários) segundo VASCONCELLOS (1999). O material foi mantido em BOD sob condições de temperatura de 28°C e umidade relativa de 90%. Para análise dos dados foram utilizadas técnicas de análise de sobrevivência, sendo obtidas: a função de sobrevivência através do método de Kaplan-Meier, o teste comparativo de LogRank entre os substratos e os tempos medianos segundo ALTMAN (1991). O nível de significância utilizado foi de 5,0% de probabilidade e o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Versão 11.

Utilizou-se a função de sobrevivência $S(t)$ com o objetivo de verificar a probabilidade de vida dos insetos até um tempo t (18 dias), a fim de mantê-los em condições de laboratório para a realização de bioensaios com fungos entomopatogênicos.

Foram designadas por $S_1(t)$, $S_2(t)$, $S_3(t)$, $S_4(t)$ e $S_5(t)$ as funções de sobrevivência de cupins para os substratos: sem alimento, madeira decomposta, madeira seca, cana-de-açúcar e papel madeira, respectivamente (Tabela 1). Nesta tabela verifica-se que, até o quarto dia de observação, $S_1(t) \leq S_2(t)$, ou seja, o tempo de sobrevivência dos cupins no substrato 1 (sem alimento), foi menor ou igual ao dos cupins no substrato 2 (madeira decomposta), enquanto que do quinto dia em diante, $S_1(t) > S_2(t)$ o tempo de sobrevivência dos cupins no substrato 1 foi superior ao dos cupins no substrato 2. Em Isoptera ocorre o fenômeno da trofalaxia que consiste na transferência de alimento dos operários para os demais indivíduos, podendo ocorrer pela boca (alimento estomodéico) ou pelo ânus (alimento proctodéico) (TRANIELLO; LEUTHOLD, 2000). Esse fenômeno, provavelmente, foi o que manteve vivas parte dos indivíduos do tratamento sem alimento, $S_1(t)$, por um tempo maior em relação a $S_2(t)$ após o quinto dia. Provavelmente, os cupins adaptaram-se às condições oferecidas no tratamento sem alimento e realizaram o processo da trofalaxia, apesar da ausência de alimento, durante este intervalo do tempo, visto que os testes foram realizados levando-se em consideração a proporcionalidade entre soldados e operários (1:4), segundo VASCONCELLOS (1999).

No substrato 3 (madeira seca), a probabilidade de um cupim sobreviver ao menos cinco dias (ou mais) foi zero. Esse fato pode ter ocorrido devido à baixa umidade do substrato (pó de serra). Com relação à questão umidade relativa, COLLINS (1970) afirmou que, de um modo geral, os cupins são muito sensíveis à dessecação devido a pouca quitinização da cutícula e baixa capacidade de retenção de água e, por isso, a umidade relativa no interior do ninho é sempre mantida alta (maior que 90%), o que justifica a rápida mortalidade no substrato pó de serra.

PARRA *et al.* (1974) também discutem a importância da umidade relativa e temperatura no interior de cupinzeiros; estes autores observaram durante 24 horas as variações desses fatores, constatando para *C. cumulans* temperaturas variando de 18 a 22° C e umidade relativa próxima a 100%. Tais informações indicam a manutenção térmica realizada pelos cupins em condições naturais, sugerindo possível influência negativa do substrato madeira seca (pó de serra) na sobrevivência de *N. coxipoensis* em laboratório.

Durante todo o período de avaliação, o tempo de sobrevivência dos cupins no substrato cana-de-açúcar foi superior ao tempo de sobrevivência nos demais substratos, o que indica uma boa adaptação desses animais às condições oferecidas quando o fago estimulante fornecido foi cana-de-açúcar.

Após o segundo dia de observação, o tempo de sobrevivência dos cupins no substrato cinco (papel madeira) foi superior ao dos cupins nos substratos 1, 2 e 3, colocando esse tipo de alimento em segundo lugar em relação à manutenção dos cupins em laboratório.

Observa-se ainda que: para os cupins do substrato 1, cerca de 34% deles ainda estavam vivos após 5 dias do início do estudo; para os cupins dos substratos 2, 3, 4 e 5 estes percentuais são de 26%, 0,0%, 78,0% e 51,0%, respectivamente. A última linha da Tabela 1 mostra, para cada substrato, o tempo mediano de sobrevivência (tempo no qual cerca de 50% dos cupins sobrevivem). Assim sendo, no substrato quatro, a probabilidade de um cupim sobreviver ao menos 13 dias (tempo mediano de sobrevivência) é 0,50. O teste estatístico de Logrank mostra que existe diferença fortemente significativa entre os substratos ($p < 0,001$).

Os resultados indicaram que o substrato cana-de-açúcar foi o mais adequado para utilização em bioensaios, seguido de papel madeira picado. Essas informações permitem a realização de testes diversos com esses cupins, em condições de laboratório e mostra a importância de pesquisas básicas para a obtenção de conhecimentos que facilitem a execução de outros trabalhos na biologia animal.

Tabela 1 - Probabilidade de sobrevivência de *Nasutitermes coxipoensis* e tempo de vida mediano (dias) com relação ao substrato fago estimulante.

Dias	Sem alimento	Madeira decomposta	Madeira seca	Cana-de-açúcar	Papel madeira	Valor p ⁽¹⁾
0	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	
1	0,6600	0,9267	0,8033	0,9467	0,8900	
2	0,5200	0,5933	0,2333	0,8967	0,7533	
3	0,4400	0,4667	0,1133	0,8433	0,6700	
4	0,3733	0,3733	0,0033	0,8167	0,5467	
5	0,3400	0,2567	0,0000	0,7767	0,5067	
6	0,3100	0,2233		0,7167	0,4300	< 0,001*
7	0,2900	0,1800		0,6900	0,3733	
8	0,2733	0,1533		0,6667	0,3700	
9	0,2633	0,1467		0,6267	0,3567	
10	0,2233	0,0867		0,5800	0,3300	
11	0,1800	0,0700		0,5567	0,3167	
12	0,1400	0,0533		0,5433	0,2967	
13	0,1133	0,0367		0,4967	0,2667	
14	0,0867	0,0233		0,4700	0,2267	
15	0,0567	0,0133		0,4300	0,2000	
16	0,0133	0,0000		0,3833	0,1533	
17	0,0000			0,3300	0,1100	
18				0,3067	0,1033	
Tempo mediano ² (dias)	3,0000	3,0000	2,0000	13,0000	6,0000	

(*) - Diferença significativa a 5%.

¹Através do teste de LogRank.

²Valores obtidos a partir de interpolação nas curvas de sobrevivência.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, A.C.; PEREIRA, K.C.A.; CUNHA, F.M.; VEIGA, A.F.S.L.; ATHAYDE, A.C.R.; LIMA, E.A.L.A. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Metsch.) Sorokin sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). *Neotropical Entomology*, v.33, p.585-591, 2005.
- ALTMAN, D.G. *Practical statistics for medical research*. London: Chapman and Hall, 1991. 611p.
- COLLINS, M.S. Water relations in termites. In: KRISHNA, K.F.M.; WEESNER. (Ed.). *Biology of termites*. New York: Academic Press, 1970. v.1, p.433-458.
- FERNANDES, P.M. *Controle microbiano de Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera - Termitidae) utilizando *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. 1991. 114f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.
- GALLO, D.; NAKANO O.; SILVEIRA NETO S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. *Entomologia agrícola*. São Paulo: FEALQ/USP, 2002. v.10, 920p.
- HANEL, H. A bioassay for measuring the virulence of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Fungi Imperfect) against the *Nasutitermes exitiosus* (Hill) (Isoptera, Termitidae). *Zeitschrift fur Angewandte Entomologie*, v.92, 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 fur Angewandte Entomologie*, v.94, p.237-245, 1982a.
- HANEL, H. The life cycle of a fungus species, suitable for the biological control of the termite *Nasutitermes exitiosus* (Hill). *Mycopathologia*, v.80, p.137-145, 1982b.
- HANEL, H.; WATSON, J.A.L. Preliminary field test on the use of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Nasutitermes exitiosus* (Hill) (Isoptera: Termitidae). *Bulletim of Entomological Research*, v.73, p.305-313, 1983.
- KRAMM, K.R.; WEST, D.F. Effects of ingested *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria* e *Gliocadium* conidia on worker termites (*Reticulitermes* sp.). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 40, p.7-11, 1982.
- KRAMM, K.R.; WEST, D.F.; ROCKENBACH, P.G. Termite pathogens transfer of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* between *Reticulitermes* sp. termites. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.40, p.1-6. 1982.
- KO, W.H.; FUJII, J.K.; KANEGAWA, K.M. The nature of soil pernicious to *Coptotermes formosanus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.39, p.38-40, 1982.
- LAI, P.Y.; TAMASHIRO, M.; FUJII, J.K. Pathogenicity of six strains of entomogenous fungi to *Coptotermes formosanus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.39, p.1-5, 1982.
- MALAGODI, M.; VEIGA, A.F.S.L. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill sobre o cupim *Nasutitermes* (Dudley) (Isoptera-Termitidae) em laboratório. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.24, p.315-322, 1994.
- MARANHÃO, Z.C. *Entomologia Geral*. 3.ed. São Paulo: Livraria Nobel, 1978. 514p.
- MARTIUS, C. Perspectivas do controle biológico de cupins (Insecta, Isoptera). *Revista Brasileira de Entomologia*, v.41, p.179-184, 1998.
- PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; VILLA NOVA, N.A. Determinação de temperatura e umidade relativa no interior de colônias de insetos sociais para estudos bioecológicos. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.3, p.20-33, 1974.
- PIZANO, M.A. Controle de cupins de cana-de-açúcar. In: BERTI FILHO E.; FONTES, L.R. (Ed.). *Alguns aspectos atuais da biologia e controle de cupins*. Piracicaba: FEALQ, 1995. p.115-120.
- TRANIELLO, J.F.A.; LEUTHOLD, R.H. Behavior and ecology of foraging in termites. In: ABE, T.; BIGNELL, D.E. (Ed.). *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.141-168.
- VASCONCELLOS, A. *Estrutura e dinâmica de ninhos policíclicos de uma espécie de Nasutitermes* (Isoptera, Termitidae) em Mata Atlântica e no meio urbano de João Pessoa, Paraíba. 1999. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Zoologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1999.
- WILSON, E.O. *The Insects Societies*. Cambridge: The Belknap Press of Harvard University Press, 1971. 548p.

Recebido em 24/3/07

Aceito em 9/11/08