



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

MARÍLIA PEREIRA RODRIGUES DE MELO

**PATOGENICIDADE DA MICROBIOTA NATIVA CONTRA O CUPIM ARBORÍCOLA
Nasutitermes corniger (BLATTODEA: TERMITIDAE)**

RECIFE, 2022

MARÍLIA PEREIRA RODRIGUES DE MELO

**PATOGENICIDADE DA MICROBIOTA NATIVA CONTRA O CUPIM ARBORÍCOLA
Nasutitermes corniger (BLATTODEA: TERMITIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestra em Biologia de Fungos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patricia Vieira Tiago

Coorientador: Prof. Dr. Roger Fagner Ribeiro Melo

RECIFE, 2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Melo, Marília Pereira Rodrigues de.

Patogenicidade da micobiota nativa contra o cupim arborícola *Nasutitermes corniger* (Blattodea: Termitidae). / Marília Pereira Rodrigues de Melo. – 2022.

62 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Patrícia Vieira Tiago.

Coorientador: Roger Fagner Ribeiro Melo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de fungos, Recife, 2022.

Inclui referências.

1. Biocontrole. 2. Compleo de espécies *fusarium fujikuroi*. 3. Fungos entomopatogênicos. 4. *Paecilomyces*. 5. *Purpureocillium*. I. Tiago, Patrícia Vieira. II. Melo, Roger Fagner Ribeiro. III. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-031

MARÍLIA PEREIRA RODRIGUES DE MELO

**PATOGENICIDADE DA MICROBIOTA NATIVA CONTRA O CUPIM ARBORÍCOLA
Nasutitermes corniger (BLATTODEA: TERMITIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestra em Biologia de Fungos.

Aprovada em: _18___/_07___/_2022___

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Patricia Vieira Tiago (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr.^a Athaline Gonçalves Diniz (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Virginia Michelle Svedese (Examinadora Externa)
Universidade Federal do Vale do São Francisco

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Senhor, grande e poderoso em minha vida, me deu forças, saúde e proteção para realizar e concluir o mestrado em meio a uma pandemia.

Aos meus sogros, Maria Lúcia e Tomaz Edson por todo amor, carinho, cuidado e compreensão. Obrigada por todo acolhimento e amor de pais.

Ao meu namorado, Francisco, por toda essa caminhada de quase oito anos desde meu pré-vestibular. Sempre com carinho, confiando mais em mim do que eu mesma, eu te amo e obrigada.

À minha mãe Renata e meu padrasto, Marcos por toda torcida, apoio e educação proporcionada.

À minha irmã, Manuely, minha carinhosa 'Nunu', obrigada pelas inúmeras risadas e visitas, todas as palavras de conforto e todo carinho, eu amo você.

As minhas amigas que fiz no ensino remoto do mestrado, que mesmo acabando estamos lá firmes e fortes, Mayara, Jailma, Victória e Vitória, obrigada por tudo de coração.

Agradeço também ao Laboratório de Fungos Fitopatogênicos e Biocontroladores por ser minha casa durante todo esse tempo, meu carinho por cada um dos integrantes é inexplicável.

À Athaline e Ana Carla, minhas amigas "Atha" e "Aninha", sem vocês duas eu ainda estaria perdida nas análises e fazendo bobagens na molecular. Obrigada por todo suporte, toda atenção sempre com enorme paciência, vocês foram de extrema importância para a realização desse trabalho.

Agradeço a minha orientadora Patricia, por se preocupar comigo e antes de perguntar sobre o trabalho, perguntar sobre minha saúde. Esteve sempre disposta a sanar dúvidas e me ajudar a entender o mundo do controle biológico.

Ao meu coorientador Roger, por todos os momentos de aprendizado, brincadeiras e por sempre acreditar e confiar em mim, eu não poderia ter um professor melhor em minha vida, é um grande amigo que admiro muito. Obrigada!

Aos membros da banca por terem aceitado ao convite de avaliar e colaborar com a melhoria do trabalho, muito obrigada.

Agradeço ao meu cãozinho, Pipoca que me alegrava sempre que estava triste e angustiada com as complicações ao longo da pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro ofertado para realização desse trabalho.

À Universidade Federal de Pernambuco por ter proporcionado a mim os melhores momentos da vida acadêmica, é o lugar que aprendi muito e decidi o que queria para vida.

A todos que de alguma forma torceram, contribuíram e me apoiaram para que fosse possível a conclusão dessa etapa, meus sinceros agradecimentos!

Obrigada!!

“Não fui eu que ordenei a você?
Seja forte e corajoso!
Não se apavore nem desanime,
pois o Senhor, o seu Deus,
estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9

RESUMO

Nasutitermes corniger Motschulsky (Blattodeae: Termitidae) é uma espécie de cupim arborícola comum no Brasil, considerada uma das mais importantes deste gênero; destaca-se pelos danos causados a edificações, árvores ornamentais e/ou de cultivos e ao patrimônio histórico. Para controlar ou eliminar a presença desses insetos, o controle químico é o método mais aplicado, causando contaminação e a degradação do meio ambiente. O biocontrole por fungos entomopatogênicos vem sendo aceito e estudado no Brasil como uma alternativa ao controle químico. O objetivo foi identificar os fungos da microbiota nativa isolados de *Nasutitermes corniger* e selecionar aqueles com potencial entomopatogênico contra adultos deste inseto. A identificação morfológica foi feita por técnicas de microcultivo e literatura específica para cada gênero, as análises moleculares foram feitas com regiões de DNA indicadas para cada grupo: os primers ITS1 e ITS4, TEF-EF1 e TEF-EF2 foram utilizados para cada gênero e combinados com RPB1 e RPB2 para confirmação de um novo registro de *Fusarium*. Os isolados foram testados contra o cupim arborícola com suspensões de conídios a 1×10^7 por mL. Os valores de mortalidade acumulada confirmada, ao quinto dia após pulverização dos fungos, foram submetidos a análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5%. As variáveis (isolado e tempo) foram submetidas à análise de regressão com ($p < 0,05$). Seis dos isolados foram identificados como do Complexo de Espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC) sendo três *F. sacchari*, um *F. verticillioides* e um *F. musae*. Dois do gênero *Paecilomyces* sendo identificados como *P. formosus* e três isolados do gênero *Purpureocillium* como *P. sodanum*. Foi observada uma nova espécie para o grupo *Fusarium* com registro para *N. corniger*. Foi observada patogenicidade dos isolados contra o cupim que diferiram do controle. O isolado *F. sacchari* (URM 8510) causou mortalidade confirmada acumulada de 38,33% e *P. sodanum* (URM 8532) causou 23,33%. Embora os isolados tenham capacidade de causar doenças no cupim, os valores de mortalidade observados revelam que não têm potencial para uso no biocontrole de *N. corniger*. Nas condições testadas, não obteve potencial para o uso no biocontrole. Todavia, a microbiota é fonte de novos registros para a ciência.

Palavras-chave: Biocontrole; Complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*; Fungos entomopatogênicos; *Paecilomyces*; *Purpureocillium*.

ABSTRACT

Nasutitermes corniger Motschulsky (Blattodea: Termitidae) is a common arboreal termite species in Brazil, considered one of the most important of this genus; it stands out because of the damage it causes to buildings, ornamental trees or crops, and historic places. Chemical control is the most applied method to control or eliminate the presence of these insects, causing contamination and degradation of the environment. Biocontrol by entomopathogenic fungi has been accepted and studied in Brazil as an alternative to chemical control. The objective was to identify fungi from the native mycobiota isolated from *Nasutitermes corniger* and to select those with entomopathogenic potential against adults of this insect. Morphological identification was done by microcultivation techniques and specific literature for each genus, molecular analyses were done with DNA regions indicated for each group: primers ITS1 and ITS4 for the genus *Purpureocillium* and *Paecilomyces* and also primers TEF-EF1 and TEF-EF2 for the genus *Fusarium*, combined with RPB1 and RPB2 to confirm a new record for FFSC. The isolates were tested against arboreal termite with conidia suspensions at 1×10^7 per mL. Confirmed cumulative mortality values at day 5 after spraying the fungi were subjected to Analysis of Variance (ANOVA) and means compared by Tukey's 5% Test. The variables (isolate and time) were subjected to regression analysis with ($p < 0.05$). Six of the isolates were identified as from the *Fusarium fujikuroi* Species Complex (FFSC) being three as *F. sacchari*, one as *F. verticillioides* and one as *F. musae*. Two of the genus *Paecilomyces* being identified as *P. formosus* and three isolates of the genus *Purpureocillium* as *P. sodanum*. The taxonomic results revealed a new species to the *Fusarium* group with a record in the termite species *N. corniger*. Pathogenicity of the isolates against the termite was observed which differed from the control. The isolate *F. sacchari* (URM 8510) caused the highest cumulative confirmed mortality rate (38.33%) and the lowest rate was caused by the isolate *P. sodanum* (URM 8532) with 23.33%. Although the isolates have the ability to cause termite diseases, the observed mortality values reveal that they have no potential for use in biocontrol of *N. corniger*.

Keywords: Biocontrol; Entomopathogenic fungi; *Fusarium fujikuroi* species complex; *Paecilomyces*; *Purpureocillium*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Ciclo reprodutivo dos cupins, com distribuição das castas. 18
- Figura 2 -** Castas de *Nasutitermes corniger*, com soldados e operários estéreis e reprodutores alados. 19
- Figura 3 -** Placa com papel filtro umedecido com água destilada esterilizada e recortes de papel madeira para simular o ambiente natural dos cupins. 35
- Figura 4 -** Placa com papel filtro umedecido com água destilada esterilizada, com subdivisões indicando as repetições I, II e III. Fungos cobrindo o corpo dos cupins com micélio e esporos de cor rosada a vinácea do gênero *Fusarium*. 35
- Figura 5 -** Características morfológicas de isolados do gênero *Fusarium* e *Purpureocillium*. **(A), (B), (C)** URM 8510 *Fusarium sacchari*. **(D), (E), (F)** URM 8511 *Fusarium verticillioides*. **(G), (H), (I)** URM 8512 *Fusarium sacchari*. **(J), (K), (L)** URM 8513 *Fusarium sacchari*. **(M), (N), (O)** URM 8532 *Purpureocillium sodanum*. Culturas em BDA com sete dias de crescimento a 25 °C. 38
- Figura 6 -** Características morfológicas de isolados do gênero *Fusarium*, *Purpureocillium* e *Paecilomyces*. **(A), (B), (C)** URM 8515 *Fusarium musae*. **(D), (E), (F)** URM 8530 *Purpureocillium sodanum*. **(G), (H), (I)** URM 8516 *P. sodanum*. **(J), (K), (L)** URM 8531 *Paecilomyces formosus*. **(M), (N), (O)** URM 8533 *P. formosus*. Culturas em BDA com sete dias de crescimento a 25 °C. 39
- Figura 7 -** Árvore de inferência bayesiana (BI) baseada em sequências ITS de membros do gênero *Paecilomyces*. Os valores de probabilidade a posteriori da Inferência Bayesiana (>0,7) são indicados nos entrenós. A barra representa as substituições esperadas por sítio. *Thermoascus verrucosus* (CBS 605.74) foi usado como grupo externo. 40

- Figura 8 -** Árvore de inferência bayesiana (BI) baseada em sequências ITS de membros do gênero *Purpureocillium*. Os valores de probabilidade a posteriori da Inferência Bayesiana (>0,7) são indicados nos entrenós. A barra representa as substituições esperadas por sítios. *Drechmeria gunnii* (OSC 76404) foi usado como grupo externo 41
- Figura 9 -** Árvore de inferência bayesiana (BI) baseada em TEF1, RPB1 e RPB2 combinados. Os valores de probabilidade a posteriori da Inferência Bayesiana (>0,7) são indicados nos entrenós. A barra representa as substituições esperadas por sítio. T indica cepas do tipo ex. *Fusarium triseptatum* (CBS 258.50) foi usado como grupo externo. 42
- Figura 10 -** Mortalidade acumulada confirmada de *Nasutitermes corniger* ao longo de cinco dias após aplicação de 1×10^7 conídios/mL de isolados do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. URM 8510 *Fusarium sacchari*, URM 8511 *Fusarium verticilloides*, URM 8512 *Fusarium sacchari*, URM 8513 *Fusarium sacchari*, URM 8514 *Fusarium* sp. nov., URM 8515 *Fusarium musae*. 44
- Figura 11-** Mortalidade acumulada confirmada de *Nasutitermes corniger* ao longo de cinco dias após aplicação de 1×10^7 conídios/mL de isolados de *Purpureocillium* e *Paecilomyces*. URM8530 *Purpureocillium sodanum*, URM 8516 *Purpureocillium sodanum*, URM 8531 *Paecilomyces formosus*, URM 8532 *Purpureocillium sodanum*, URM 8533 *Paecilomyces formosus*. 46

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -** Isolados fúngicos obtidos de *Nasutitermes corniger* com base na sequência de DNA com regiões TEF1, RPB1 e RPB2 para *Fusarium* e a ITS para *Purpureocillium* e *Paecilomyces*. 33
- Tabela 2 -** Viabilidade dos conídios de isolados do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*, *Paecilomyces formosus* e *Purpureocillium sodanum* selecionados para o teste de patogenicidade contra o cupim *Nasutitermes corniger*. 43
- Tabela 3 -** Mortalidade acumulada confirmada (percentual médio \pm desvio padrão) de *Nasutitermes corniger* após cinco dias de aplicação de 1×10^7 conídios/mL de isolados do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. 45
- Tabela 4 -** Mortalidade acumulada confirmada (percentual médio \pm desvio padrão) de *Nasutitermes corniger* após cinco dias de aplicação de 1×10^7 conídios/mL de isolados de *Paecilomyces formosus* e *Purpureocillium sodanum*. 47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	15
1.1.1	<i>Geral</i>	15
1.1.2	<i>Específicos</i>	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	<i>NASUTITERMES CORNIGER</i> MOTCHULSKY (BLATTODEA: TERMITIDAE)	16
2.2	ASSOCIAÇÕES FUNGO-INSETO	20
2.3	CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS	21
2.4	GÊNEROS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS	24
2.4.1	<i>Fusarium Link ex Grey</i>	25
2.4.2	<i>Purpureocillium Luangsa-ard, Hywel-jones, Houbraken & Samson</i>	27
2.5	TESTES DE PATOGENICIDADE FUNGO × INSETO	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	COLETA DE CUPINS E ISOLAMENTO FÚNGICO	31
3.2	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DOS FUNGOS	32
3.3	TESTE DE PATOGENICIDADE DOS FUNGOS CONTRA <i>NASUTITERMES CORNIGER</i>	33
3.3.1	<i>Teste de viabilidade dos conídios</i>	33
3.3.2	<i>Coleta dos cupins e testes de patogenicidade</i>	34
3.3.3	<i>Análise de dados</i>	36
4	RESULTADOS	37
4.1	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS	37
4.2	PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DO COMPLEXO DE ESPÉCIES <i>FUSARIUM FUJIKUROI</i> (FFSC) CONTRA <i>NASUTITERMES CORNIGER</i>	43
4.3	PATOGENICIDADE DE <i>PURPUREOCILLIUM SODANUM</i> E <i>PAECILOMYCES FORMOSUS</i> CONTRA <i>NASUTITERMES CORNIGER</i>	45
5	DISCUSSÃO	48

6	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Nasutitermes corniger Motschulsky (Blattodae: Termitidae) é uma espécie de cupim arborícola comum no Brasil, considerada uma das mais importantes deste gênero; destaca-se pelos danos causados a edificações, árvores ornamentais e/ou de cultivos e ao patrimônio histórico (ALBUQUERQUE; MATIAS; OLIVEIRA; COUTO *et al.*, 2014). Na região Nordeste do Brasil, *N. corniger* apresenta alta plasticidade ecológica, característica importante para uma espécie-praga (CONSTANTINO, 2002).

Para controlar ou eliminar a presença desses insetos, o controle químico é o método mais aplicado, com produtos como Attamix 400P, Bioinset 800 SC e Cypermaster® 250 CE; no entanto, a utilização de produtos químicos causa contaminação e a degradação do meio ambiente (FREITAS; PORTO; MOREIRA; PIVETTA *et al.*, 2002). O uso de alternativas menos agressivas e eficientes, como o biocontrole promovido por fungos entomopatogênicos, tem se difundido pelo meio científico e sido amplamente estudado no Brasil (POTRICH M; ALVES LFA; HASS J; SILVA ERL *et al.*, 2009).

A natureza da associação fungo-inseto é diversa e complexa, envolvendo aspectos por vezes pouco conhecidos de sua ecologia e evolução, e são exibidos múltiplos espectros de padrões de interação e de estratégias de vida associados (VEGA; BLACKWELL, 2005b). Por conseguinte, o potencial do uso dos fungos no controle de populações-praga de insetos requer acesso a padrões ecológicos exibidos tanto pelos agentes controladores quanto pelos animais (EMBRAPA, 2020).

Fungos entomófilos utilizam estratégias para a dispersão de seus propágulos, podem ser predadores, parasitos com longa história co-evolutiva ou podem ainda viver em associações mutualísticas intrincadas, sendo fungos e insetos beneficiados (VEGA; BLACKWELL, 2005b). O estudo de fungos endógenos (da microbiota) para o biocontrole do inseto dos quais foram obtidos, pode selecionar novos isolados com alto potencial de controle, de alta viabilidade e baixo custo, minimizando danos causados por estes insetos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

O objetivo foi identificar os fungos da microbiota nativa isolados de *Nasutitermes corniger* e selecionar aqueles com potencial entomopatogênico contra adultos deste inseto.

1.1.2 Específicos

- Identificar fungos filamentosos isolados de *N. corniger* com potencial relevância em seu controle;
- Relatar a ocorrência de novas espécies e de novos registros de fungos filamentosos nessa espécie de cupim;
- Determinar a patogenicidade dos fungos isolados de *N. corniger* contra indivíduos desse inseto e selecionar os mais eficientes no controle.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *NASUTITERMES CORNIGER* MOTSCHULSKY (BLATTODEA: TERMITIDAE)

Os cupins pertencem à ordem Blattodea, composta por insetos cosmopolitas, com mais de 7.000 espécies modernas conhecidas no mundo, das quais 3000 são cupins e aproximadamente 4.640 são baratas — ambos possuem hábito noturno, alimentação onívora e grande potencial reprodutivo (BECCALONI; EGGLETON, 2013; EVANS; IQBAL, 2015).

Cupins são insetos eussociais terrícolas e/ou arborícolas, de hábito xilófago em sua maioria, o que os tornam notórios pelos prejuízos causados em madeira na maioria das regiões do Brasil. Destacam-se pelos danos em plantações, afetando vasta gama de cultivos, tais como cana-de-açúcar, arroz, milho, trigo, café e cacau (ROULAND-LEFÈVRE, 2010).

Os cupins são facilmente encontrados em regiões urbanas e rurais, podendo ser vistos em árvores nas praças ou em móveis de madeira dentro das casas; são amplamente distribuídos, com taxa mais alta de aparecimento em florestas tropicais (BIGNELL; EGGLETON, 2000).

Possuem também um papel de alta importância na manutenção da fertilidade dos solos, auxiliando na produtividade dos ecossistemas. Além disso, esses insetos promovem aeração e drenagem do solo, facilitando assim a penetração e fixação das raízes, realizando a ciclagem de elementos minerais ao consumir madeira morta caída e restos de plantas (FREYMAN; BUITENWERF; DESOUZA; OLFF, 2008).

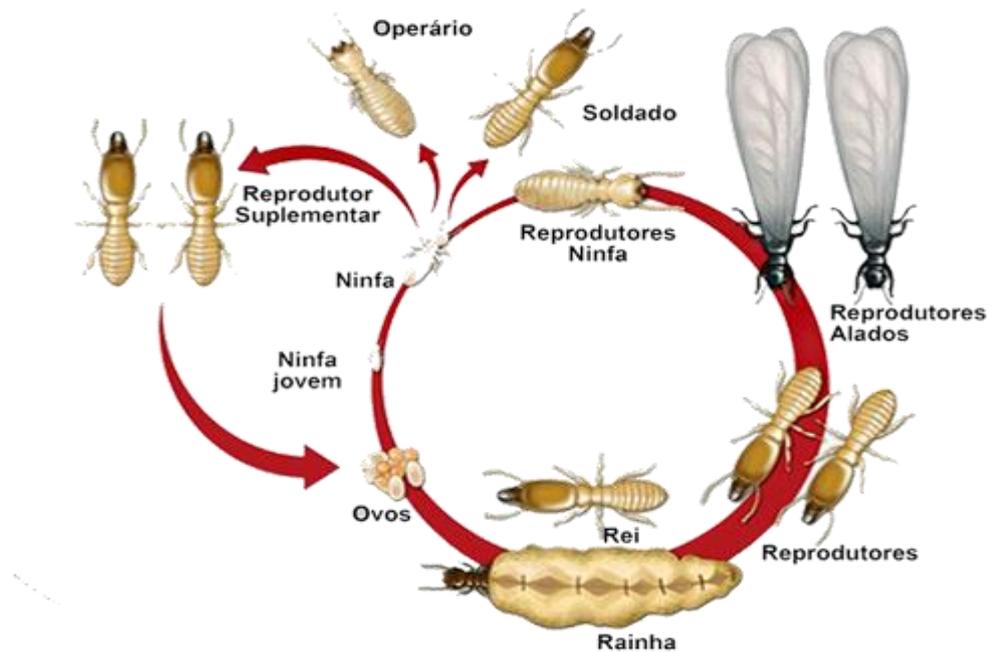
Dentre os Termitidae, alguns podem se alimentar de madeira, folhas, húmus e fungos cultivados. Baseado nisso, os cupins são divididos em dois grupos: os inferiores, que necessitam da simbiose com protozoários flagelados para a quebra da celulose, e superiores, o qual o gênero *Nasutitermes* da família Termitidae está incluído. Os cupins inferiores dependem de seus simbioses intestinais para a nutrição e os simbioses se beneficiam com seus comensais em vários aspectos, pois são regularmente supridos com partículas de alimentos, são protegidos dos inimigos naturais e mantidos em um ambiente mais estável. Os cupins classificados como superiores, não apresentam essa simbiose com bactérias, fungos e protozoários flagelados em seu aparelho digestivo (BRUGEROLLE; RADEK, 2006; CORREIA; AGUIAR-MENEZES; DE AQUINO, 2008).

As castas operários e soldados possuem uma depressão com poro frontal na cabeça, denominada fontanela, que é ligada a uma glândula cefálica e expele um líquido viscoso e espesso, com função de defesa contra predadores e ameaças ao ninho (FERREIRA; MARTINS; INDA JUNIOR; GIASSON *et al.*, 2011).

A casta fértil é representada pelo rei e pela rainha que são alados, é a única casta fértil do ninho. O rei constitui par permanente com a rainha, com a qual copula diversas vezes ao longo da vida para suprir a demanda de indivíduos na colônia (WILSON, 1971). Ao contrário das outras castas, os reprodutores possuem asas, olhos e tem uma fertilidade maior, sendo sua principal função a de reproduzir e apenas saem do ninho em época de revoada ou época reprodutiva (BOULOGNE; CONSTANTINO; AMUSANT; FALKOWSKI *et al.*, 2016; KRISHNA; WEESNER, 1969).

Na colônia também há presença das larvas e ninfas que são integrantes imaturos, podendo se diferenciar por meio da linhagem áptera ou reprodutiva. As ninfas podem apresentar os brotos alares que se originam das larvas ápteras, após passarem por sucessivas mudas onde em cada uma irá ocorrer a aparição de asas, olhos e os órgãos reprodutores até que atingem o estágio de imago (MYLES, 1999). Existem também os reprodutores secundários na colônia, eles substituem os reprodutores caso aconteça a morte dos mesmos (MYLES, 1999; WILSON, 1971). Os reprodutores secundários podem ser os operários, as ninfas em desenvolvimento ou os reprodutores alados na colônia (Figura 1) (MYLES, 1999).

Figura 1 -Ciclo reprodutivo dos cupins, com distribuição das castas.



Fonte: Extinset 35 anos (2022)

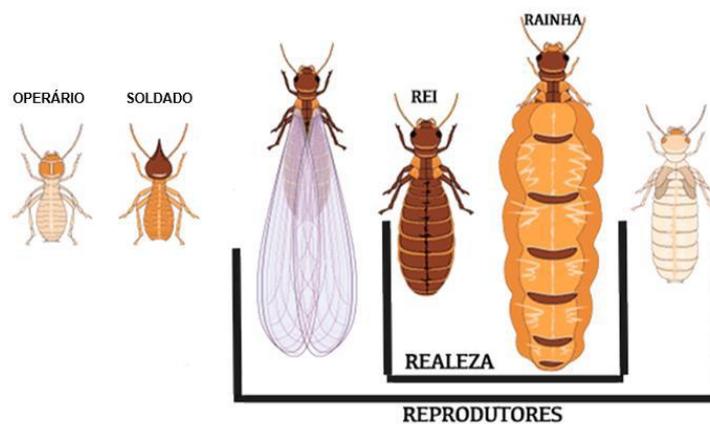
O gênero *Nasutitermes* apresenta taxonomia confusa e com variações. Contém 254 espécies válidas, sendo o gênero de cupins mais diverso e amplamente distribuído (BOULOGNE; CONSTANTINO; AMUSANT; FALKOWSKI *et al.*, 2016). Com 74 espécies de ocorrência restrita à região Neotropical, é um dos mais importantes gêneros de cupins em biodiversidade de espécies (cerca de 54% das espécies de cupins) (CONSTANTINO, 2002).

No Brasil, o gênero *Nasutitermes* é encontrado em ambientes de Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga (CONSTANTINO, 1999; POTENZA; CAMPOS; ZORZENON; CANCELLO, 1998), sendo relatado em estados das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (BANDEIRA; MIRANDA; VASCONCELLOS, 1988; CONSTANTINO, 2002; COSTA-LEONARDO, 2002). Espécies de *Nasutitermes* apresentam maior preferência alimentar por madeiras em decomposição do que por madeiras sadias (VASCONCELLOS, 2003). Todavia, estes insetos desenvolveram a capacidade de digerir as mais abundantes moléculas biológicas no planeta, celulose e lignina, devido às suas próprias enzimas digestivas (VEGA; BLACKWELL, 2005a).

Nasutitermes corniger é frequentemente associado a danos estruturais de residências, edifícios históricos, deterioração de livros, documentos antigos, pinturas e coleções de objetos, destruindo diferentes tipos de materiais em várias regiões brasileiras tanto em ambiente rural quanto urbano (MARICONI, 1999; VERMA;

SHARMA; PRASAD, 2009). Essa espécie é arborícola, eussocial e organizada em um sistema de castas que inclui soldados, operários e reprodutores alados (rei e rainha), cada um com atividades específicas na colônia. Os operários são indivíduos estéreis e cegos e representam a classe mais numerosa na colônia, sendo responsáveis pela construção de túneis de forrageamento, um caminho feito basicamente de solo, saliva e fezes. Eles também são responsáveis pela alimentação dos demais indivíduos da colônia por meio de trofalaxia, uma forma de alimentação em que o alimento é entregue boca-a-boca para cada indivíduo. Por se encontrarem mais no interior dos troncos das árvores e não participarem ativamente da defesa da colônia, os operários possuem um corpo mais frágil sendo mais mole e uma cor mais uniforme. Os soldados, não possuem olhos, se comunicam e sentem vibrações através das antenas no topo da cabeça. Eles também são estéreis, cuidam da defesa da colônia e do ninho, possuindo um corpo mais robusto comparado aos operários. A cabeça do soldado é piriforme, tem coloração marrom, a mandíbula é bem desenvolvida e possui um nasus (tubo frontal) estreito para a saída da secreção, o que permite atacar os inimigos à distância, evitando o contato direto, sendo mais escura que o resto do corpo, que é de cor amarelada a creme (Figura 2) (DE LA CRUZ MNS; SANTOS-JUNIOR HM; REZENDE CM; ALVES RJV *et al.*, 2014). Ambos representantes das castas possuem uma expectativa de vida de cinco anos (VERMA; SHARMA; PRASAD, 2009).

Figura 2 - Castas de *Nasutitermes corniger*, com soldados e operários estéreis e reprodutores alados.



Fonte: Encyclopedia Britannica (2008).

Os insetos das castas operários e soldados são encontrados mais facilmente fora do ninho, nos túneis de forrageamento nos troncos de árvores. Os reprodutores alados que apresentam sua morfologia diferenciada dos demais, se localizam no interior do ninho e podem ser facilmente vistos em épocas de inverno no seu período reprodutivo. Isso ocorre durante a revoada, fenômeno sazonal, desencadeado por fatores externos principalmente pelas chuvas ou mudanças na temperatura e umidade do ar, que pode variar de acordo com as regiões do país (PRESTES, 2012).

2.2 ASSOCIAÇÕES FUNGO-INSETO

Dentre os principais hábitos e estratégias de vida dos fungos, há determinados grupos ecológicos especializados, em maior ou menor grau, em utilizar a associação com insetos em toda ou parte de sua vida, e muitas dessas associações incluem os fungos entomófilos. Estes são capazes de utilizar mecanismos ou estratégias para a dispersão de seus propágulos, podem ser predadores de grande eficiência, parasitos com longa história co-evolutiva ou podem ainda viver em associações mutualísticas intrincadas, sendo tanto fungos quanto insetos beneficiados (VEGA; BLACKWELL, 2005b). Esses insetos, por sua vez, podem transmitir fungos potencialmente patogênicos de um vegetal para outro, assim como fungos potencialmente patogênicos a estes insetos, muitos possuem uso comprovado ou potencial para o controle biológico de insetos-praga (FURLONG; PELL, 2005).

A associação entre fungos e insetos é dividida de acordo com (VEGA; BLACKWELL, 2005b), em dois grandes grupos: (1) interações nas quais os fungos agem contra insetos e (2) aquelas em que os fungos formam associações mutualistas com insetos. O primeiro grupo inclui fungos entomopatogênicos que podem apresentar estratégias desde ocupantes ocasionais de tecidos de insetos até necrotróficos especializados, penetrando no corpo do animal e levando-o à morte, para então formar esporos sexuados e/ou assexuados em seu cadáver, como os representantes do gênero *Cordyceps* (KOBMOO et al., 2015). Esses grupos de fungos podem utilizar os insetos para a dispersão de seus esporos, ocasionando a morte do animal, assim alguns fungos entomófilos são conhecidos pela sua estratégia econutricional necrotrófica ou de predação natural. Eles se alimentam e se reproduzem sobre o corpo desses animais. Alguns são denominados entomopatógenos, e atuam na regulação de insetos em seu ambiente. Esses fungos

são comumente utilizados no controle biológico de pragas, que depende não só da constatação da interação ecológica com o inseto hospedeiro, mas da viabilidade de utilização, considerando também a produção de biomassa e disseminação no ambiente (ALVES; MOINO; ALMEIDA, 1998).

Porém, a susceptibilidade dos hospedeiros aos fungos está relacionada à natureza e quantidade dos componentes de seu tegumento. A quantidade de ácidos graxos com ação antibiótica presente no tegumento pode variar em função das condições abióticas, espécie do inseto e seu estágio de desenvolvimento, onde alguns insetos reagem à presença de patógenos com elevada produção desses materiais, evitando a penetração por ação mecânica ou antibiótica (ALVES; MOINO; ALMEIDA, 1998).

Os insetos que estão envolvidos em associações fúngicas incluem principalmente membros dos Coleoptera, Diptera, Homoptera, Hymenoptera e Isoptera. Porém, outros grupos possuem apenas membros ocasionais como os cogumelos cultivados por formigas e cupins em tais associações (REHNER, 2005). Algumas dessas espécies fúngicas demonstram uma elevada especificidade do hospedeiro, não danificam as plantas, e são facilmente cultivadas em laboratório (TEETOR-BARSCH; ROBERTS, 1983). A associação dos fungos com espécies de formigas, como as da tribo Attini (subfamília Myrmicinae), são conhecidas pelo cultivo dos fungos para sua alimentação na colônia. Os fungos, que são cultivados pelas formigas, são a principal fonte de nutrientes para os indivíduos adultos e a única para as larvas (SCHULTZ; MUELLER; CURRIE; REHNER, 2005).

2.3 CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS

O termo "controle biológico" foi utilizado pela primeira vez em 1919 pelo pesquisador Harry S. Smith, para se referir ao uso de inimigos naturais no controle de insetos. Logo, o controle biológico é definido como um evento natural em que inimigos naturais regulam populações de suas presas, e, por conseguinte de organismos cuja população cresça demasiadamente, considerados pragas, atacando estes organismos durante vários estágios do seu ciclo de desenvolvimento. Dessa forma, a presença de controladores naturais é determinada pela regulação de uma população sob certos limites e períodos de tempo, por meio da combinação de fatores adequados

(CHAGAS; POLONIO; RUVOLO-TAKASUSUKI; PAMPHILE *et al.*, 2016; DEBACH; ROSEN, 1991).

Dentre os fatores que influenciam na ocorrência de inimigos naturais destacam-se a abundância e a qualidade das presas (BURG; MAYER, 1999) assim como os fatores ecológicos, como por exemplo, a temperatura e umidade relativa que possuem ação direta sobre o desenvolvimento e comportamento dos insetos (BRITO; LOPES; ALBUQUERQUE; BATISTA, 2008). Os inimigos naturais de insetos são os agentes de controle biológico, derivados de classes de organismos que incluem predadores, parasitas e patógenos. Os predadores e os parasitas são tidos como entomófagos, enquanto que os patógenos são os entomopatógenos (COSTA; ESPÍRITO SANTO FILHO; BRANDÃO, 2009).

Os primeiros relatos da utilização de inimigos naturais como biocontroladores ocorreram no Século III pelos chineses, quando estes utilizaram formigas predadoras sobre inimigos naturais dos citros. A partir de 1830, micro-organismos como fungos, bactérias e protozoários foram identificados como sendo os agentes causais de doenças em insetos, no entanto, a primeira tentativa de controle de insetos utilizando estes patógenos ocorreu somente em 1870 (GALLO; NAKANO; SILVEIRA NETO; CARVALHO *et al.*, 2002; LAZZARINI, 2005; ONOFRE; MINIUK; DE BARROS; AZEVEDO, 2001). Os grupos de micro-organismos mais importantes para o controle biológico de insetos são os fungos, vírus e nematóides, sendo que, dentre esses grupos de organismos, os fungos são os responsáveis por aproximadamente 80% das enfermidades nos insetos (ALVES; MOINO; ALMEIDA, 1998; RHEINHEIMER, 2010).

A produção de fungos entomopatogênicos representa uma fase importante no processo de desenvolvimento de um bioinseticida, uma vez que esses patógenos precisam estar disponíveis em grandes quantidades, devido a necessidade de haver um elevado potencial de inóculo para que o processo de doença se inicie em determinada população de insetos e o controle seja estabelecido (ALVES; PEREIRA, 1998; JUNIOR, 1998; LOUREIRO EDE; OINO, 2006).

O controle biológico pode ser separado em três classes distintas: (1) controle biológico clássico, em que é realizada a importação e colonização de parasitóides ou predadores, tendo como objetivo controlar as pragas que são eventualmente nativas e espera-se que o inimigo natural que foi introduzido se estabeleça na área e controle as populações de insetos-praga; (2) controle biológico aplicado, que tem o objetivo de possibilitar o aumento na população de inimigos naturais que são nativos ou que foram

introduzidos sendo esses produzidos em laboratório, visando à redução rápida da praga para o seu nível de equilíbrio; e (3) controle biológico natural ou conservativo, que ocorre naturalmente nos diferentes ecossistemas naturais ou ambientes ainda não modificados pelo homem (PARRA; BOTELHO; CORRÊA-FERREIRA, 2002). O destaque da utilização do controle biológico se deve à crescente preocupação em diminuir os efeitos do controle químico sobre o meio ambiente, homem e animais visando o restabelecimento do equilíbrio natural (BALLAL; VERGHESE, 2015).

No Brasil, a prática do controle de insetos utilizando fungos é viável contra os insetos-praga, é segura e vem criando força ao longo dos anos. O controle biológico por fungos mantém as populações de pragas, predadores e polinizadores presentes no ambiente, sem interferir no equilíbrio biológico do mesmo (NEVES; RODRIGUES; DAYOUB; DRAGONE, 2001; PEREIRA; ALVES; REIS, 1998; RHEINHEIMER, 2010). A infecção de fungos entomopatogênicos nos insetos ocorre por meio de um mecanismo de penetração na cutícula do inseto. Esse mecanismo inicia quando os conídios entram em contato com a cutícula do inseto e germinam, dando origem a um tubo germinativo e estruturas como apressórios. O processo de penetração na cutícula do inseto ocorre por pressão mecânica, química e ação de enzimas que degradam os componentes cuticulares, chegando à hemolinfa, onde o fungo se nutre e produz toxinas que causam danos à célula do hospedeiro, levando-o a morte (ALVES; PEREIRA, 1998; TIAGO; FURLANETO, 2003). Após, os fungos produzem micélio e esporos sobre o cadáver, dando origem a um grande número de conídios, os quais se dispersam rapidamente no ambiente por meios distintos como os próprios insetos, o vento, por outros animais e pela água; assim acabam por infectar novos insetos hospedeiros (MEYLING; EILENBERG, 2007).

Contudo, esse modo de ação dos fungos pode mudar de acordo com a patogenicidade ou a forma de adesão do mesmo. Outro fator é a defesa que o hospedeiro irá apresentar contra o patógeno, como por exemplo, a liberação de várias enzimas como fenoloxidasas e alguns ácidos, além da melanina do hospedeiro (DUBOVSKIY; WHITTEN; YAROSLAVTSEVA; GREIG *et al.*, 2013).

A eficácia de agentes no controle biológico contra insetos é influenciada por fatores abióticos ambientais tais como temperatura, pH, água e radiação solar que tem efeito sobre a germinação, o crescimento vegetativo e viabilidade de fungos entomopatogênicos (HAN; JIN; KIM; LEE, 2014). Além desses fatores abióticos, alguns fatores bióticos podem também limitar ou melhorar a estabilidade e atividade

inseticida dos fungos. Isso acaba incluindo características do próprio fungo, os seus vários isolados e o tipo de propagação que será utilizada, todos esses podem ser responsáveis pela eficácia (LACEY; FRUTOS; KAYA; VAIL, 2001).

Os gêneros mais conhecidos para biocontrole como *Beauveria*, *Cordyceps* (= *Paecilomyces*), *Akanthomyces* (= *Lecanicillium*, = *Verticillium*) e *Metarhizium* são constantemente utilizados em programas de controle biológico de pragas (FINKLER, 2012). O gênero *Fusarium* vem se destacando pelo seu potencial e aplicabilidade no controle de insetos-praga (BARBOSA; SANTOS; DINIZ; ALVES *et al.*, 2021; CARNEIRO-LEÃO; TIAGO; MEDEIROS; DA COSTA *et al.*, 2017; DINIZ; CERQUEIRA; RIBEIRO; DA COSTA *et al.*, 2020; SANTOS; DINIZ; TIAGO; OLIVEIRA, 2020; VELEZ; DINIZ; BARBOSA; SANTOS *et al.*, 2019).

O uso dos fungos para o controle dos cupins é uma alternativa promissora, uma vez que os fungos patógenos irão apresentar lentidão no processo de colonização, ao entrarem em contato com todos os membros da colônia acabam se tornando uma fonte de disseminação dos conídios no interior da colônia, provocando mudanças no comportamento e na fisiologia dos cupins (NEVES; ALVES, 2004; PIRES; MARQUES; OLIVEIRA; ALVES, 2010). Além disso, o crescimento e o desenvolvimento do fungo entomopatogênico tende a ser facilitado visto que a temperatura e a umidade são constantes nas galerias dos cupins (DINIZ; CERQUEIRA; RIBEIRO; DA COSTA *et al.*, 2020)

2.4 GÊNEROS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Das 3,8 milhões de espécies fúngicas conhecidas, cerca de 3.000 espécies são entomopatogênicas (HAWKSWORTH; LUCKING, 2017). Assim como alguns gêneros ganham destaque por serem bons biocontroladores de pragas, alguns gêneros se destacam por apresentarem essa característica para insetos. Os gêneros que mais se destacam e se associam a insetos de maior importância no controle biológico são *Metarhizium*, *Beauveria*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* e *Verticillium* (LÓPEZ LLORCA; JANSSON, 2001). Os gêneros de maior importância são *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Fusarium* e *Rhizopus* (FAO, 2003).

A utilização desses entomopatógenos para o controle de cupins teve início em 1965 (YENDOL; PASCHKE, 1965). A maioria destes estudos é baseado na utilização de espécies com histórico potencial para insetos-praga como *B. bassiana* e *M. anisopliae* (FARIA; WRAIGHT, 2007).

Os fungos que causam doenças em insetos são cosmopolitas, o uso destes patógenos para o controle biológico, ganha destaque no Brasil e em outros países subtropicais, o que os torna um fator importante na redução de populações de insetos pelo clima (ALVES; MOINO; ALMEIDA, 1998).

Os fungos entomopatogênicos frequentemente são encontrados do corpo dos insetos no ambiente, produzem esporos no corpo desses animais, que quando espalhados pelo vento, chuva ou contato com outros insetos, podem causar epizootia (conceito utilizado para qualificar a ocorrência de um determinado evento em um número de animais ao mesmo tempo e na mesma região, podendo levar ou não a morte). Os insetos infectados param de se alimentar e tornam-se mais lentos, morrendo relativamente rápido. O corpo do inseto morto apresenta uma consistência emborrachada ou de aparência oca. Várias vezes observam-se insetos mortos de cor creme, verde, avermelhada ou marrom, em consequência do crescimento do fungo que está infectando o inseto, quer seja envolvendo o corpo do hospedeiro, quer seja saindo das juntas dos segmentos do corpo, olhos, antenas e/ou membros (ALVES; LOPES; VIEIRA; TAMAI, 2008; RHEINHEIMER, 2010; VALICENTE, 2009).

2.4.1 *Fusarium Link ex Grey*

Fusarium (Nectriaceae, Ascomycota) é um grande gênero parafilético com representantes amplamente distribuídos, podendo ser encontrados no solo, nas plantas, animais e alimentos, podendo causar prejuízos (ROBERTS, 1981 ; TEETOR-BARSCH; ROBERTS, 1983). Muitas espécies são conhecidas por causar doenças em plantas (fitopatógenos) e nos insetos (entomopatógenos). No caso de *Fusarium* controlando insetos, alguns estudos relataram a produção de micotoxinas que estão relacionadas a morte dos insetos como a beauvericina, fusaproliferina, ácido fusárico, picolínico, dipicolínico, fusarinas e moniliformina (BACON; PORTER; NORRED; LESLIE, 1996; CLAYDON; GROVE, 1982; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Os representantes desse grupo podem ser isolados em diversas condições climáticas, sendo predominantemente em ambientes temperados e tropicais

(COLEMAN; MUHAMMED; KASPERKOVITZ; VYAS *et al.*, 2011; SUMMERELL; LESLIE, 2011). Dentre os animais, os insetos são os membros com os quais as espécies de *Fusarium* são mais abundantemente associadas, frequentemente como patógenas. O gênero inclui várias espécies e isolados que são entomopatógenos fortes ou fracos e que penetram no hospedeiro e liberam toxinas debilitando o inseto (GARDIANO; FERRAZ; LOPES; FERREIRA *et al.*, 2009; O'DONNELL; HUMBER; GEISER; KANG *et al.*, 2012; TEETOR-BARSCH; ROBERTS, 1983).

O uso de fungos do gênero *Fusarium* que são entomopatogênicos no controle de insetos pode ser uma estratégia vantajosa, uma vez que alguns isolados demonstraram especificidade ao hospedeiro, são facilmente cultivados em laboratório, não danificam plantas e sobrevivem bem como sapróbios no solo (TEETOR-BARSCH; ROBERTS, 1983). Entretanto, a utilização de *Fusarium* no controle de insetos é possível, desde que marcadores moleculares sejam utilizados para distinguir os isolados entomopatogênicos dos fitopatogênicos (O'DONNELL; HUMBER; GEISER; KANG *et al.*, 2012).

Considerando todos os trabalhos avaliados na revisão de (SANTOS; DINIZ; TIAGO; OLIVEIRA, 2020), sem distinguir os complexos de *Fusarium*, os hemípteros foram à fonte mais frequente de isolamento de *Fusarium*, seguido dos coleópteros e himenópteros. A patogenicidade das espécies de *Fusarium* foi testada contra insetos das ordens Blattodea, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Orthoptera e Thysanoptera.

O Complexo de Espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC) foi inicialmente estabelecido por (WOLLENWEBER; SHERBAKOFF; REINKING; JOHANN *et al.*, 1925) como Liseola para espécies que produzem conídios esporoquianos (macroconídios), microconídios em cadeias e/ou falsas cabeças e não produzem clamidósporos.

No entanto, nos anos seguintes foram descritas várias espécies, nomeadamente *F. dlamini* (O'DONNELL; MCCORMICK; BUSMAN; PROCTOR *et al.*, 2018), *F. nygamai* (BURGESS; TRIMBOLI, 1986) e *F. napiforme* (MARASAS; BURGESS; ANELICH; LAMPRECHT *et al.*, 1988) que estavam em conformidade com as características do grupo Liseola, mas que também produziam clamidósporos. Para acomodar estas espécies, (KWASNA; CHELKOWSKI; ZAJKOWSKI, 1991) introduziram o grupo Dlaminia. Estudos moleculares subsequentes mostraram, no entanto, que Liseola era parafilética, com espécies de Dlaminia que estavam por resolver dentro da Liseola (O'DONNELL; KISTLER; CIGELNIK; PLOETZ, 1998). Isto

exemplificou claramente as complicações da utilização de características fenotípicas para prever a relação e as histórias evolutivas, sendo que a morfologia apresentava frequentemente discórdia com os dados da sequência de DNA. Por consequência destas divergências, foi introduzido o termo "complexo de espécies" que serviu essencialmente como uma forma de nomear clados filogenéticos (O'DONNELL; CIGELNIK, 1997; O'DONNELL; KISTLER; CIGELNIK; PLOETZ, 1998).

Quatro complexos de espécies se destacam como os mais frequentemente relatados nos estudos de fungos entomopatogênicos: *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC), *Fusarium fujikuroi* (FFSC), *Fusarium solani* (FSSC) e *Fusarium oxysporum* (FOSC) (SANTOS; DINIZ; TIAGO; OLIVEIRA, 2020). Estimativas filogenéticas da diversidade de estirpes de *Fusarium* isoladas de insetos, mas sem determinar a sua patogenicidade e mostraram que os complexos de espécies mais ricos em linhagens associadas a insetos eram os *F. fujikuroi* (O'DONNELL; HUMBER; GEISER; KANG *et al.*, 2012)

Alguns dos representantes de FFSC (*Fusarium fujikuroi* species complex) podem causar doenças em grãos como arroz, e a podridão da espiga e do talo do milho. As espécies de FFSC também produzem várias micotoxinas tais como fumonisina (RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002), moniliformina (MARASAS; NELSON; TOUSSOUN; VAN WYK, 1986), beauvericina (LOGRIECO; MORETTI; CASTELLA; KOSTECKI *et al.*, 1998), ácido giberélico (CERDA-OLMEDO; FERNANDEZ-MARTIN; AVALOS, 1994), e ácido fusárico (BACON; PORTER; NORRED; LESLIE, 1996). Estas micotoxinas causam toxicidade crônica e aguda nos seres humanos e outros animais. *F. fujikuroi*, *F. verticillioides*, e *F. proliferatum* são a causa da podridão da espiga e do talo do milho. Além do milho, *F. verticillioides* pode infectar arroz, bananas, cana-de-açúcar, sorgo, ervilhas e figueiras (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998; STEPIEN; KOCZYK; WASKIEWICZ, 2013).

2.4.2 *Purpureocillium Luangsa-ard, Hywel-Jones, Houbraken & Samson*

Purpureocillium (Ophiocordycipitaceae, Sordariomycetes) caracterizou-se anteriormente pela sua patogenicidade em invertebrados (LUANGSA-ARD; HOUBRAKEN; VAN DOORN; HONG *et al.*, 2011). *Purpureocillium* *ilacinum*, a espécie mais conhecida do gênero, é um fungo filamentoso que tem sido isolado de uma vasta gama de habitats, incluindo solos cultivados e não cultivados, florestas,

prados, desertos, sedimentos estuarinos, lamas de esgoto e insetos. Os conidióforos mononematosos ou sinematosos consistem em vários ramos verticilados, em forma de frasco, as fiáides em espiral, produzindo uma ou raramente duas células encadeadas, conídios hialinos, e com teleomorfo do tipo *Cordyceps* (LUANGSA-ARD; HYWEL-JONES; MANOCH; SAMSON, 2005).

Uma divergência no gênero *Purpureocillium* foi estabelecida em 2011 por (LUANGSA-ARD; HOUBRAKEN; VAN DOORN; HONG *et al.*, 2011). Descreveram a morfologia e característica molecular da nova combinação de *Purpureocillium lilacinum* e com base na análise filogenética do gene rRNA parcial 18S, o tipo de espécie *Purpureocillium lilacinum* pertenceu a Ophiocordycipitaceae, enquanto a espécie do tipo *Paecilomyces variotii* de *Paecilomyces* pertenceu a Trichocomaceae. Até 2011, *P. lilacinum* recebia o nome de *Paecilomyces lilacinus*. Seu nome foi alterado por ele apresentar discrepâncias com as características do gênero *Paecilomyces*, representada por fungos termoestáveis, por exemplo (LUANGSA-ARD; HOUBRAKEN; VAN DOORN; HONG *et al.*, 2011). Assim a espécie *Paecilomyces lilacinus* é atualmente classificada como *Purpureocillium lilacinum*. O fungo se caracterizou por apresentar conídios violeta ao iniciar sua esporulação em cultivos em placas de Petri e esse foi um dos motivos para moverem ele para o gênero *Purpureocillium* (LUANGSA-ARD; HOUBRAKEN; VAN DOORN; HONG *et al.*, 2011). A mudança nos nomes das espécies ocorreu há alguns anos, porém é possível encontrar publicações de artigos se referindo ao nome *Paecilomyces lilacinus* como sendo a mesma espécie (BURHAN; ANNON, 2020; ESPADALE; BUCKLEY; BORIO; MCEWAN *et al.*, 2018).

As colônias são de crescimento rápido, flocoso, de cor vináceas a cor violeta. Os conidióforos são eretos com 400-600 µm de comprimento, com ramos com feixes densamente aglomerados de fiáides. Os clamidosporos estão ausentes. Seu crescimento é viável a 38°C (DE HOOG; CHATURVEDI; DENNING; DYER *et al.*, 2015).

O principal objetivo dos pesquisadores para a exploração de agentes patogênicos de controle biológico é a recuperação de entomopatógenos da própria praga alvo que estejam no seu habitat nativo ou do seu ambiente onde foram coletados. No *Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures* são listadas espécimes de *Purpureocillium* em 27 países diferentes, incluindo América do Norte,

América Central, América do Sul, Europa, África, Austrália e Ásia (HUMBER; HANSEN, 2005).

Espécies do gênero *Purpureocillium* são comuns em zonas tropicais e em climas temperados, sendo já registradas em solos na África do Sul, no Nepal, no Japão, no Brasil, a antiga Checoslováquia e nos EUA, relatado em ordens como Blattodea e Isoptera (HUMBER; HANSEN, 2005; KREJZOVÁ, 1976).

2.5 TESTES DE PATOGENICIDADE FUNGO x INSETO

Os fungos apresentam várias vantagens como agentes de controle biológico por ter capacidade de atacar insetos em todos os estágios de desenvolvimento (ALVES; PEREIRA, 1998; SAMUELS; DODD; GAMS; CASTLEBURY *et al.*, 2002) e por estarem presentes como componentes naturais em muitos ecossistemas terrestres.

Dada a grande variabilidade genética apresentada pelos fungos entomopatogênicos, a capacidade do inseto em se defender e os fatos ambientais, deve ser destacada a importância da realização de bioensaios com testes de patogenicidade para a seleção de isolados altamente virulentos, persistentes e com boa capacidade de produção de esporos (ALVES; PEREIRA, 1998).

Entre os fatores que variam nos testes para avaliar a ação dos fungos em insetos, estão o modo de inoculação, número de insetos utilizados, viabilidade do patógeno, concentrações de conídios, período e modo de avaliação e mortalidade considerada (total, confirmada e corrigida) (BUTT; GOETTEL, 2000). Essas variações podem influenciar os resultados obtidos, portanto as condições de bioensaios devem estar o mais próximo possível daquelas em que o patógeno será aplicado, assim o experimento possibilitará melhor previsão do que ocorrerá em condições de campo (SANTORO; NEVES; ALEXANDRE; ALVES, 2007). Os fungos infectam os insetos, preferencialmente, pela superfície do tegumento (BOUCIAS; PENDLAND; LATGE, 1988); em decorrência, os métodos de inoculação mais utilizados são pulverização sobre o inseto (NEVES; HIROSE, 2005), imersão do inseto na suspensão (LOUREIRO; MONTEIRO, 2005) e tratamento da superfície com suspensão de conídios. Alguns exemplos de fungos entomopatogênicos utilizados em testes de patogenicidade para biocontrole são mostrados a seguir.

Cupins apresentaram associações com fungos de Ascomycota, Basidiomycota, Mucoromycotina e Chytridiomycota. Os resultados do trabalho de Větrovský que mostram essa associação se referem aos fungos endógenos e do ambiente em que os cupins foram encontrados (VĚTROVSKÝ; SOUKUP; STIBLIK; VOTÝPKOVÁ *et al.*, 2020). Testes de patogenicidade de *Isaria fumosorosea* = *Paecilomyces fumosoroseus* = *Cordyceps fumosorosea* foram realizados contra o cupim terrícola *Coptotermes formosanus* Shiraki (Blattodea: Rhinotermitidae) e o besouro *Bothynoderes punctiventris* Germ. (Coleoptera: Curculionidae), causando elevada mortalidade para ambos (98,5 e 100%, respectivamente). Estes resultados demonstram que *C. fumosorosea* é capaz de infectar cupins, podendo concluir que o fungo da família Cordycipitacea pode ser útil no controle dos cupins (ZIMMERMANN, 2008). Outras pesquisas também mostraram que espécies de *Purpureocillium* em laboratório possuem uma eficácia no controle biológico contra cupins subterrâneos como a espécie *C. formosanus* e contra o cupim arborícola *N. corniger* (DUNLAP; JACKSON; WRIGHT, 2007; GONÇALVES DINIZ; BARBOSA; SANTOS; OLIVEIRA *et al.*, 2020; LOPES; LIMA; CORREIA; DA COSTA *et al.*, 2017).

Hypothenemus hampei Ferrari (Coleoptera: Curculionidae) conhecido como broca do café, é uma importante praga da cultura do café nas principais regiões produtoras no Brasil, (CARRIÓN; BONET, 2004) encontraram *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Beauveria* associados à broca-do-café. (BUSTILLO; BERNAL; BENAVIDES; CHAVES, 1999) registraram pela primeira vez *Purpureocillium lilacinum* (= *Paecilomyces lilacinus*) atacando *H. hampei* (PEREZ; INFANTE; VEGA; HOLGUIN *et al.*, 2003) relataram a presença abundante de *Fusarium solani* na microbiota nativa desse inseto e (GAMA; TEIXEIRA; GARCIA; COSTA *et al.*, 2006) obtiveram o registro de 10 gêneros de fungos filamentosos associados ao corpo da broca-do-café incluindo *Akanthomyces*.

Estudos sobre o controle de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) evidenciam a eficácia das espécies de fungos entomopatogênicos: *Hirsutella citriformis*, *C. fumosorosea* (= *I. fumosorosea* = *P. fumosoroseus*), *A. lecanii* (= *L. lecanii* = *C. lecanii*), *Beauveria bassiana*, *Cladosporium sp.* sobre este inseto (MEYER; HOY; BOUCIAS, 2007; 2008; PADULLA; ALVES, 2009; SUBANDIYAH; NIKOH; SATO; WAGIMAN *et al.*, 2000). No trabalho de (BARBOSA; SANTOS; DINIZ; ALVES *et al.*, 2021) foram testados isolados do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* contra a mosca-negra-dos-citrus (*Aleurocanthus woglumi*).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DE CUPINS E ISOLAMENTO DE FUNGOS

Três coletas foram realizadas entre os meses de março a agosto de 2019, com intervalo de cinco semanas entre cada coleta. As árvores de jambeiro, mangueira e aroeira foram selecionadas aleatoriamente ao longo do campus da UFPE conforme a presença de cupins da espécie *Nasutitermes corniger*. Cerca de 50 soldados e 50 operários sadios foram coletados, um total de 100 insetos por árvore e 300 insetos por coleta. Os insetos foram coletados com o auxílio de pinça entomológica, utilizada para fragmentar os túneis de forrageamento e ter acesso aos cupins, que foram retirados com pincéis de cerdas macias e transferidos para placas de Petri esterilizadas e levados para o Laboratório de Fungos Fitopatogênicos e Biocontroladores, localizado no Departamento de Micologia no Centro de Biociências da UFPE, campus Recife.

Para o isolamento dos fungos, os soldados e operários de *N. corniger* foram condicionados a temperatura de -6°C por 15 minutos e após, procedeu-se o processo asséptico a partir da desinfestação dos insetos, que foram submersos em álcool 70% durante 1 minuto, hipoclorito de sódio a 2,5% durante 1 minuto e quatro enxágues em água destilada esterilizada. Os fungos foram isolados a partir de condições de crescimento distintas, como o crescimento direto em meio de cultura e em câmara úmida. Dessa forma, após a desinfestação dos insetos metade dos soldados e dos operários (cerca de 25 insetos de ambas as castas) foram distribuídos em tubos de ensaio contendo meio Ágar Batata Dextrose (BDA) + cloranfenicol a (0,01%) e a outra metade foi transferida para placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada esterilizada e acondicionados em estufa do tipo BOD à temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ durante oito dias.

Após o crescimento dos fungos, procedeu-se a purificação dos isolados por meio da técnica de esgotamento em placa, a partir da transferência dos fungos para placas de Petri contendo meio BDA + cloranfenicol a (0,010%).

3.2 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DOS FUNGOS

Os fungos foram estudados e previamente isolados de soldados e operários sadios de *N. corniger* coletados em jambeiro, mangueira e aroeira do Campus Recife da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A maioria dos fungos foram identificados em nível de gênero, por meio de análises de suas microestruturas, e entre os 499 fungos obtidos da micobiota de *N. corniger*, foram selecionados 11 com histórico de potencial uso no controle biológico de insetos.

A identificação dos 11 isolados foi realizada com base em análises morfológicas e moleculares. Para observação de caracteres morfológicos de valor taxonômico foi utilizado a técnica de microcultivo. Os isolados foram repicados em três pontos equidistantes de placas de Petri contendo meios de cultura sólidos adequados para sua identificação, de acordo com descrição de material tipo, incluindo Czapeck Yeast Ágar (CYA), Batata Dextrose Ágar (BDA), sobre os quais foram adicionadas lamínulas esterilizadas, seguindo-se de incubação em estufa BOD na temperatura adequada para seu crescimento. Para a avaliação das microestruturas fúngicas, as lamínulas foram retiradas do meio e transferidas para lâminas contendo uma gota de corante Azul de Aman, em seguida observadas ao microscópio óptico.

Para a identificação morfológica da nova espécie do gênero *Fusarium* foram utilizados os meios synthetic low-nutrient agar (SNA) e carnation leaf agar (CLA), em microcultivo. As placas foram preservadas em BOD 25 °C.

Para a identificação molecular dos fungos foram utilizadas as regiões marcadoras do DNA indicadas para cada grupo: os primers ITS1 e ITS4 para o gênero *Purpureocillium* e *Paecilomyces* e também os primers TEF-EF1 e TEF-EF2 para o gênero *Fusarium* juntamente com os primers RPB1 e RPB2. Para a extração de DNA foi utilizado o protocolo do kit Wizard Genomic DNA Purification. O DNA total foi extraído e as reações de amplificação feitas utilizando os seguintes componentes: tampão de reação (Tris-HCl pH 8,4; KCl), MgCl₂, dNTPs, primers, Taq DNA polimerase e DNA. Os produtos de PCR foram purificados usando Exosap Illustrative enzyme ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, New Jersey, USA) e sequenciado usando o laboratório multiusuário de sequenciamento e expressão gênica (UFPE). Os eletroferogramas foram analisados usando o software Sequencher 4.7 (Gene Codes, Ann Arbor, Michigan, USA), do qual as sequências nucleotídicas consensus foram obtidas e exportadas com um arquivo FASTA. Usando

estas sequências, foram pesquisados os dados por meio do BLAST usando o National Center for Biotechnology Information (NCBI) database para determinar os complexos a que pertencem.

Os isolados de todas as espécies identificadas, incluindo o novo registro, foram depositados na Micoteca do Departamento de Micologia URM da UFPE (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados fúngicos obtidos de *Nasutitermes corniger* com base na sequência de DNA com regiões TEF1, RPB1 e RPB2 para *Fusarium* e a ITS para *Purpureocillium* e *Paecilomyces*.

Código URM	Gênero	Espécie	CódigoGenBank
URM8510	<i>Fusarium</i>	<i>sacchari</i>	ON380501
URM8511	<i>Fusarium</i>	<i>verticillioides</i>	ON380502
URM8512	<i>Fusarium</i>	<i>sacchari</i>	ON380503
URM8513	<i>Fusarium</i>	<i>sacchari</i>	ON380504
URM8514	<i>Fusarium</i>	sp.nov.	ON380505
URM8515	<i>Fusarium</i>	<i>musae</i>	ON380506
URM8516	<i>Purpureocillium</i>	<i>sodanum</i>	ON858506
URM8530	<i>Purpureocillium</i>	<i>sodanum</i>	ON858505
URM8531	<i>Paecilomyces</i>	<i>formosus</i>	ON858508
URM8532	<i>Purpureocillium</i>	<i>sodanum</i>	ON858507
URM8533	<i>Paecilomyces</i>	<i>formosus</i>	ON858509

Fonte: A autora (2022).

3.3 TESTES DE PATOGENICIDADE DOS FUNGOS CONTRA *NASUTITERMES CORNIGER*

3.3.1 Análise de viabilidade dos conídios

A viabilidade dos conídios de cada isolado foi avaliada a partir do inóculo de 50 µl de uma suspensão de 1×10^7 conídios/mL em meio BDA (três repetições), seguido de incubação em BOD. Após 14 horas foi realizada a contagem de 200 conídios por repetição, verificando a quantidade de conídios germinados e não germinados em microscópio óptico (ALVES; MOINO; ALMEIDA, 1998).

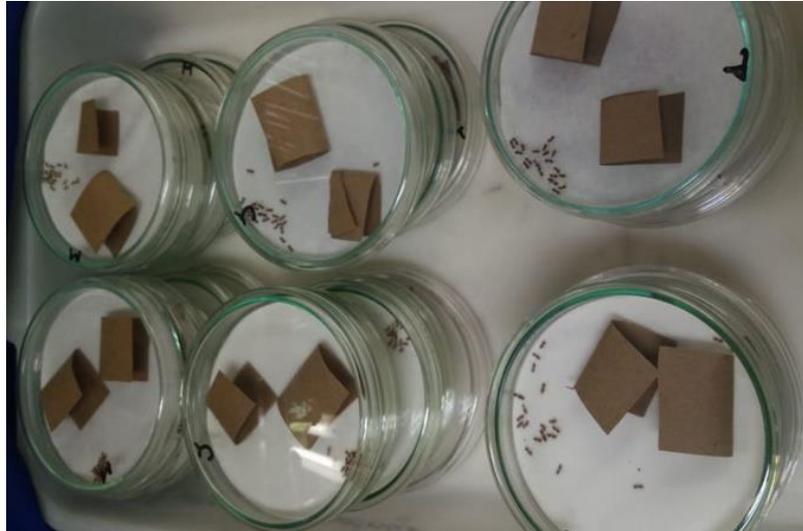
3.3.2 Coleta dos cupins e testes de patogenicidade

A coleta de soldados e operários de *N. corniger* foi realizada com o auxílio de pinças para fragmentar os túneis de forrageamento e os cupins foram retirados com pincéis de cerdas macias e colocados em placas de Petri esterilizadas. As coletas foram realizadas em árvores do Campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e os cupins levados para o laboratório de Fungos Fitopatogênicos e Biocontroladores no Centro de Biociências da UFPE, onde os bioensaios foram conduzidos.

Foram realizados dois bioensaios e o delineamento experimental foi em blocos casualizado em esquema de parcelas subdivididas no tempo, sendo os isolados dispostos nas parcelas (seis fungos + controle) e (cinco fungos + controle) e os dias de avaliação nas subparcelas (1, 2, 3, 4 e 5 dias de sobrevivência), com três repetições. Em cada uma das repetições foram utilizadas três Placas de Petri constando de 20 insetos, totalizando 60 insetos (entre soldados e operários).

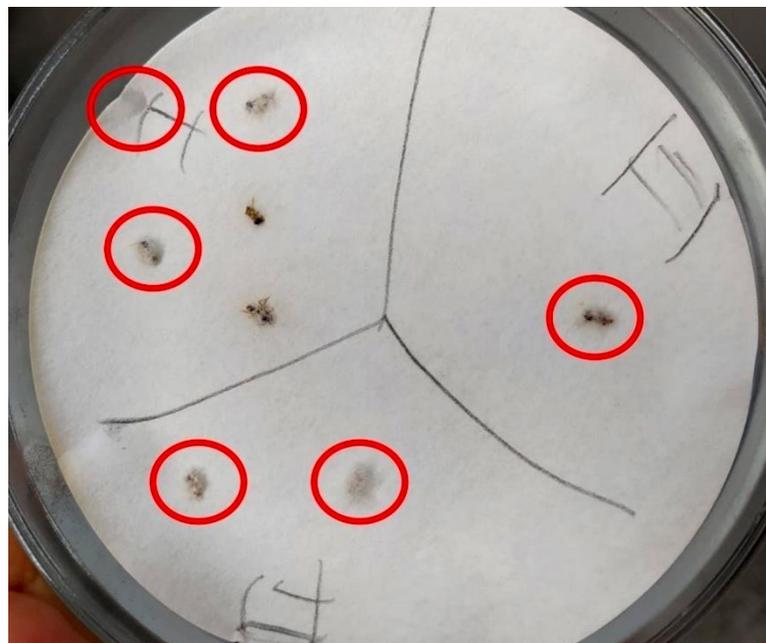
Os fungos foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA e após oito dias de crescimento foi obtida uma suspensão de 1×10^7 conídios/mL em Tween 80% (0,01%). Posteriormente, 1 mL dessa suspensão foi pulverizada sobre *N. corniger*. O tratamento controle foi composto apenas por Tween 80% (0,01%). Os insetos foram acondicionados em placas de Petri com papel filtro umedecido com água destilada esterilizada e um pedaço de papel madeira para servir como alimento. As placas foram mantidas em ambiente climatizado a 25 ± 3 °C no escuro por cinco dias (Figura 3). Os insetos mortos diariamente foram retirados das placas de Petri e passaram por um processo de desinfestação em álcool 70%, hipoclorito de sódio 4% e três enxágues em água destilada esterilizada; na sequência foram transferidos para câmaras úmidas e mantidos em BOD (26 ± 1 °C) para a confirmação do agente causal (Figura 4).

Figura 3. Placa com papel filtro umedecido com água destilada esterilizada e recortes de papel madeira para simular o ambiente natural dos cupins.



Fonte: A autora (2021).

Figura 4. Placa com papel filtro umedecido com água destilada esterilizada, com subdivisões indicando as repetições I, II e III. Fungos cobrindo o corpo dos cupins com micélio e esporos de cor rosada a vinácea do gênero *Fusarium*.



Fonte: A autora (2021).

A identidade dos isolados utilizados no teste de patogenicidade foi confirmada por meio da montagem de lâminas e observação de microestruturas fúngicas. Foi

calculada a mortalidade acumulada corrigida por meio da fórmula de Schneider-Orelli's (PÜNTENER, 1981), retirando os indivíduos que morreram de causas naturais (controle) do cálculo das proporções de morte daqueles que foram submetidos a concentrações específicas do fungo (mortalidade total).

3.3.3 *Análise de dados*

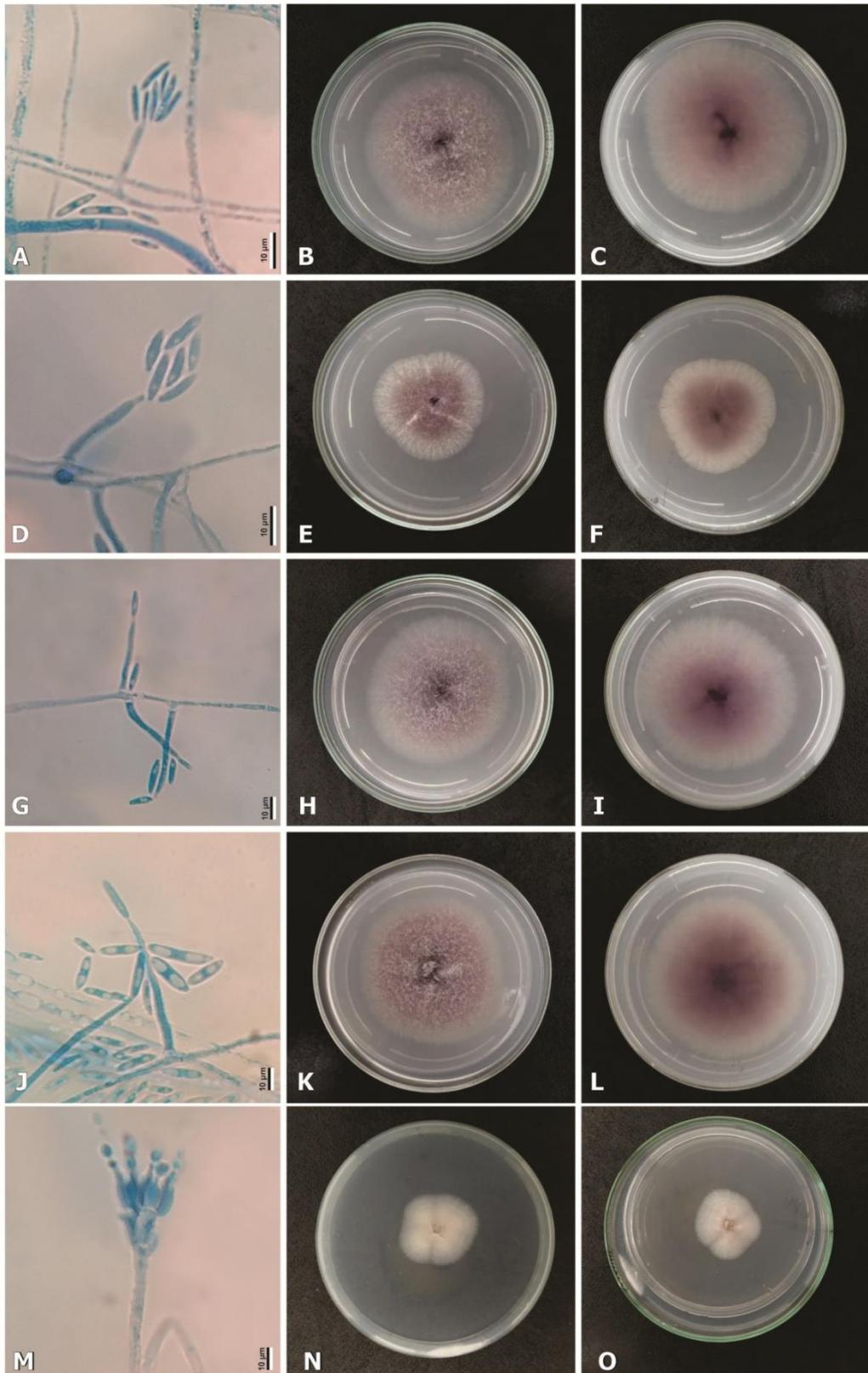
Os valores de mortalidade acumulada confirmada de *N. corniger* causada por cada fungo ao longo do tempo de avaliação foram submetidos à análise de regressão nos modelos linear, de acordo com o conjunto de dados analisados, utilizando o software *Statistix10.0* (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA). Os valores de mortalidade acumulada confirmada, ao quinto dia após pulverização dos fungos, foram submetidos a análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5% de probabilidade), utilizando o software *Sisvar 5.6* (FERREIRA, 2011).

4 RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

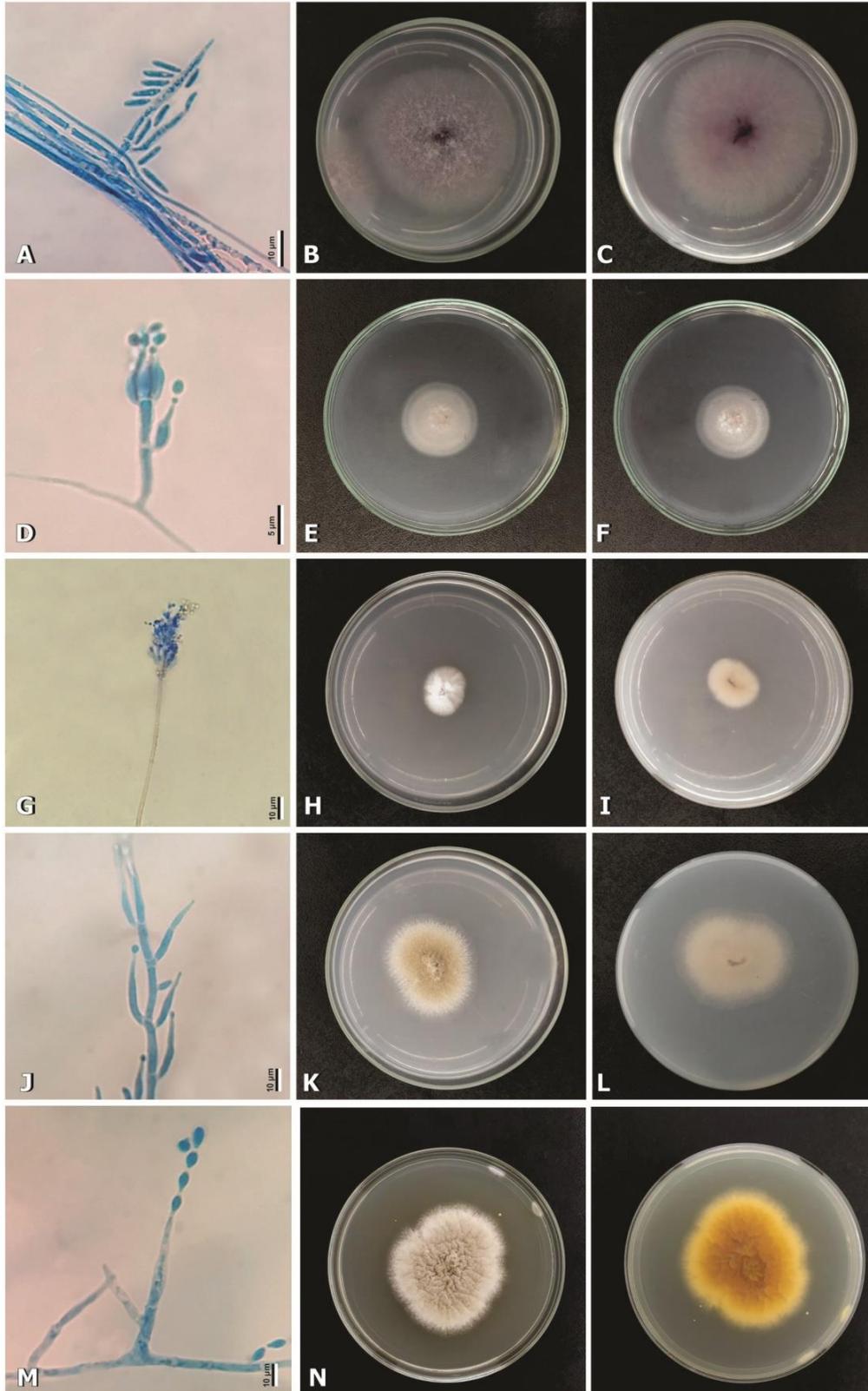
Os onze isolados pertencem a três gêneros distintos (*Paecilomyces*, *Purpureocillium* e *Fusarium*) e que são relacionados com linhagens insetícolas (Figura 5 e 6). Os isolados URM 8531 e URM 8533 são *Paecilomyces formosus* (Figura 7) e URM 8516, URM 8530 e URM 8532 são *Purpureocillium sodanum* (Figura 8). As análises filogenéticas resolveram seis isolados no complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*, dos quais um representa uma nova espécie filogenética no complexo. Três isolados (URM 8510, URM 8512 e URM 8513) foram resolvidos como *Fusarium sacchari*, um como *Fusarium verticillioides* (URM 8511) e um como *Fusarium musae* (URM 8515). As análises multilocus combinando os dados de sequências das regiões TEF1, RPB1 e RPB2 confirmaram o isolado URM 8514 como uma linhagem genealogicamente exclusiva representando uma nova espécie que será descrita em um posterior artigo (Figura 9).

Figura 5: Características morfológicas de isolados do gênero *Fusarium* e *Purpureocillium*. (A), (B), (C) URM 8510 *Fusarium sacchari*. (D), (E), (F) URM 8511 *Fusarium verticillioides*. (G), (H), (I) URM 8512 *Fusarium sacchari*. (J), (K), (L) URM 8513 *Fusarium sacchari*. (M), (N), (O) URM 8532 *Purpureocillium sodanum*. Culturas em BDA com sete dias de crescimento a 25 °C.



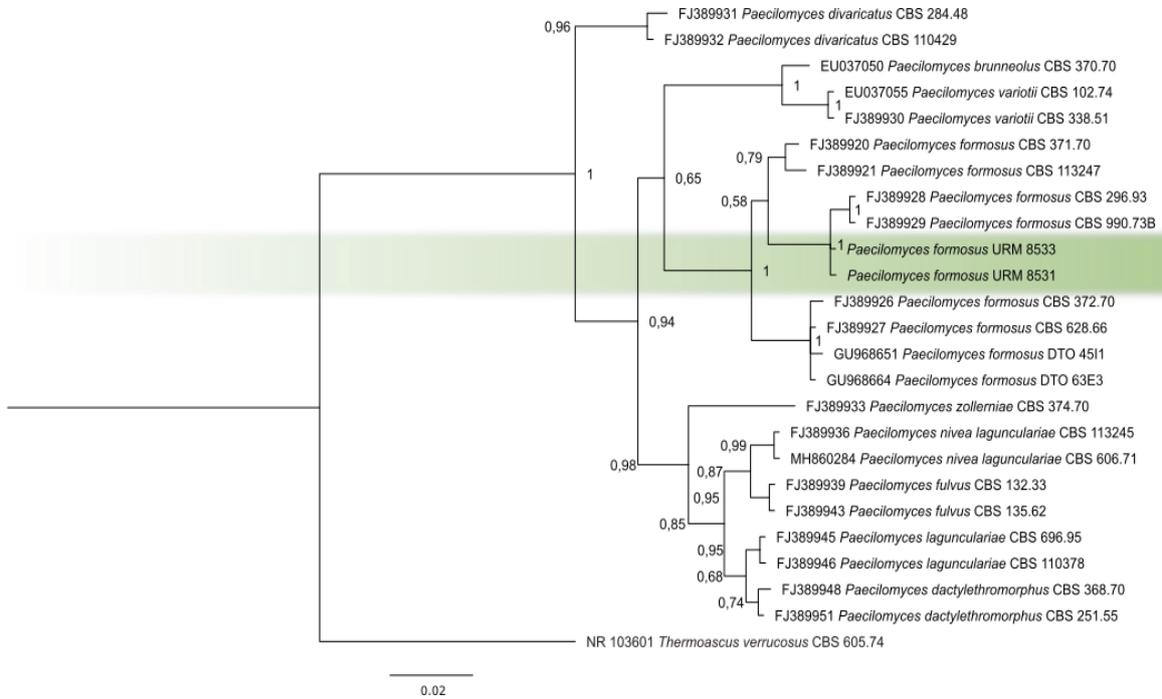
Fonte: A autora (2022).

Figura 6: Características morfológicas de isolados do gênero *Fusarium*, *Purpureocillium* e *Paecilomyces*. (A), (B), (C) URM 8515 *Fusarium musae*. (D), (E), (F) URM 8530 *Purpureocillium sodanum*. (G), (H), (I) URM 8516 *P. sodanum*. (J), (K), (L) URM 8531 *Paecilomyces formosus*. (M), (N), (O) URM 8533 *P. formosus*. Culturas em BDA com sete dias de crescimento a 25 °C.



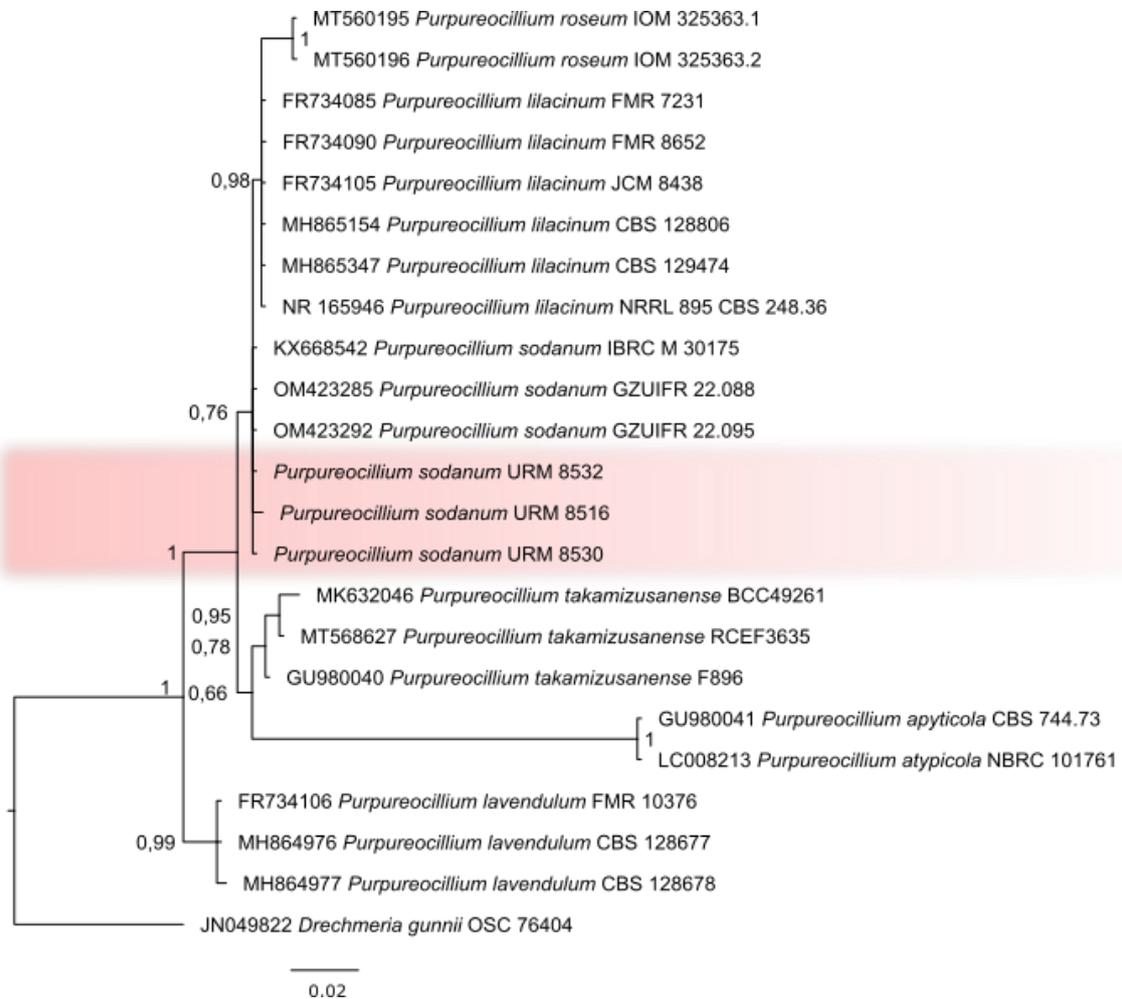
Fonte: A autora (2022).

Figura 7. Árvore de inferência bayesiana (BI) baseada em seqüências ITS de membros do gênero *Paecilomyces*. Os valores de probabilidade a posteriori da Inferência Bayesiana ($>0,7$) são indicados nos entrenós. A barra representa as substituições esperadas por sítio. *Thermoascus verrucosus* (CBS 605.74) foi usado como grupo externo.



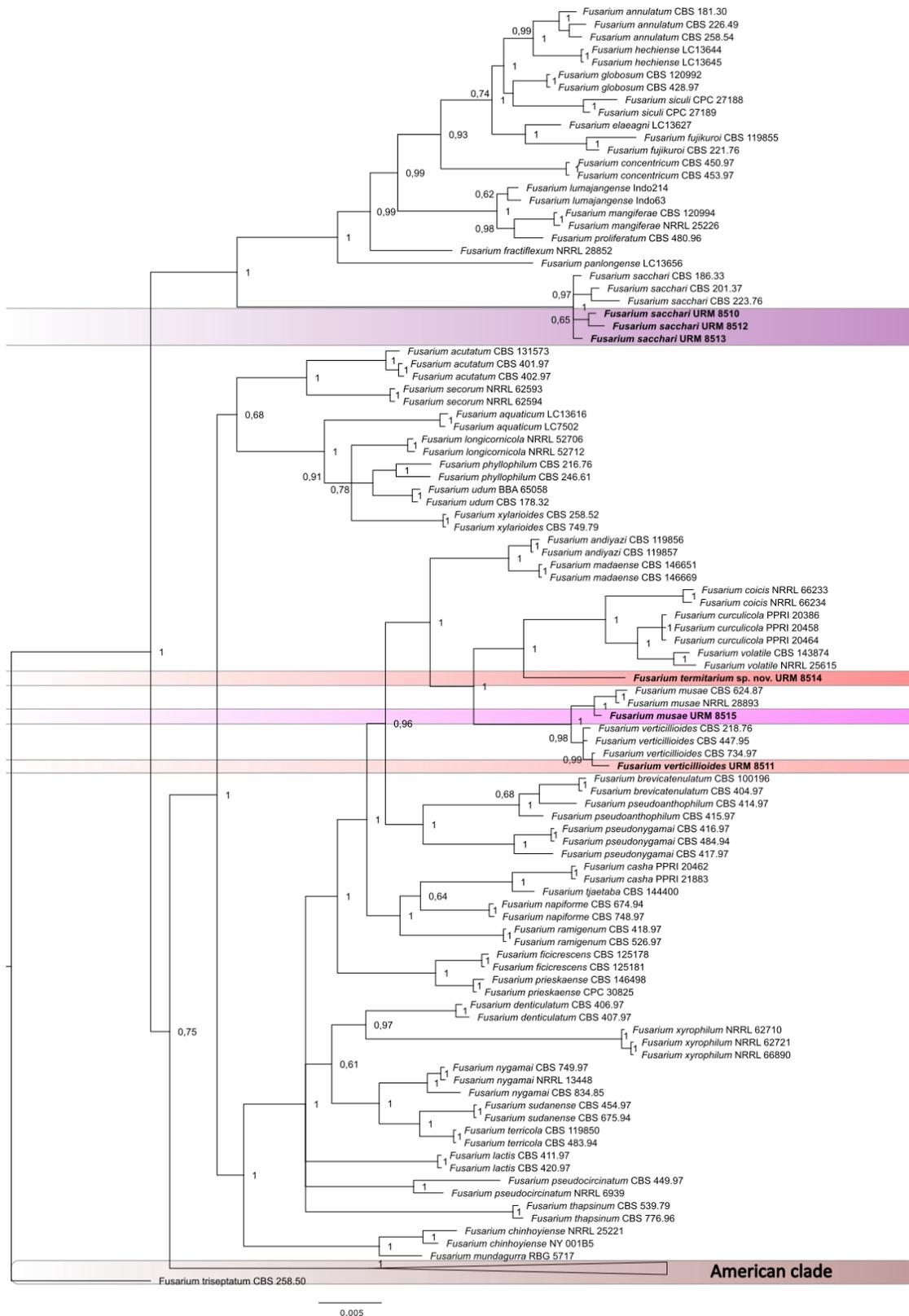
Fonte: A autora (2022).

Figura 8. Árvore de inferência bayesiana (BI) baseada em sequências ITS de membros do gênero *Purpureocillium*. Os valores de probabilidade a posteriori da Inferência Bayesiana ($>0,7$) são indicados nos entrenós. A barra representa as substituições esperadas por sítios. *Drechmeria gunnii* (OSC 76404) foi usado como grupo externo.



Fonte: A autora (2022).

Figura 9: Árvore de inferência bayesiana (BI) baseada em TEF1, RPB1 e RPB2 combinados. Os valores de probabilidade a posteriori da Inferência Bayesiana (>0,7) são indicados nos entrenós. A barra representa as substituições esperadas por sitio. T indica cepas do tipo ex. *Fusarium triseptatum* (CBS 258.50) foi usado como grupo externo.



Fonte: A autora (2022).

4.2. PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *FUSARIUM FUJIKUROI* (FFSC) CONTRA *NASUTITERMES CORNIGER*

A germinação dos conídios dos isolados do FFSC testados contra *N. corniger* variou entre 96 e 98,5% (Tabela 2).

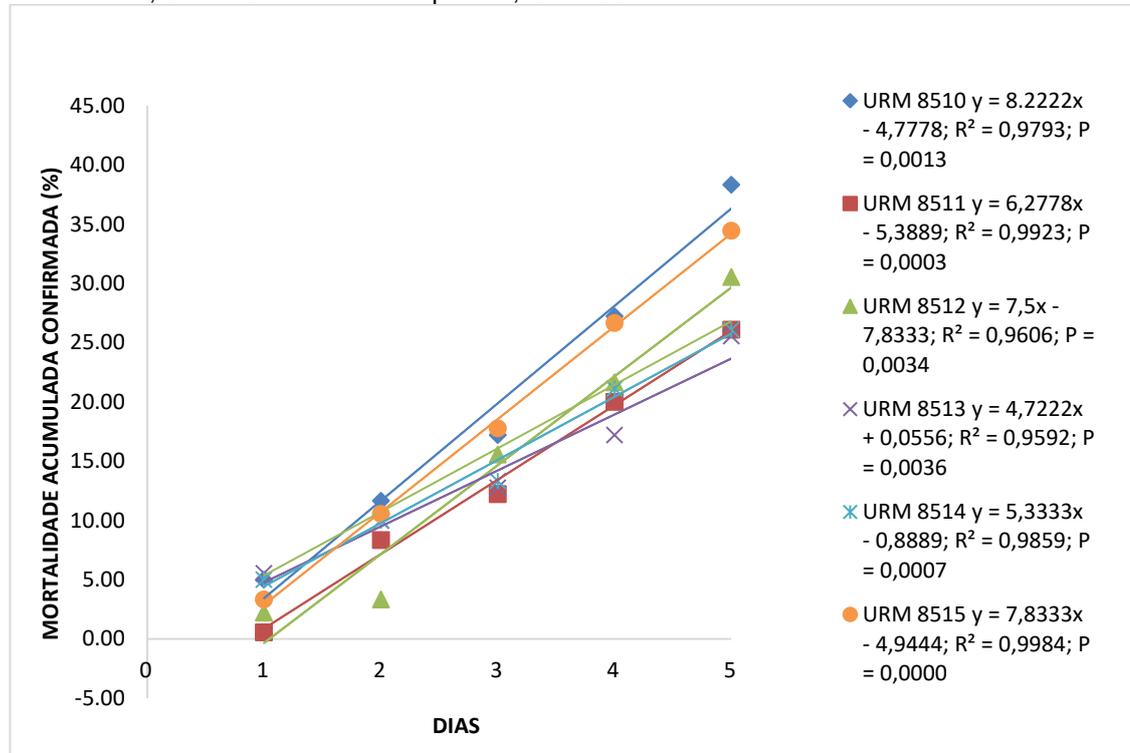
Tabela 2. Viabilidade dos conídios de isolados do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*, *Paecilomyces formosus* e *Purpureocillium sodanum* selecionados para o teste de patogenicidade contra o cupim *Nasutitermes corniger*.

Porcentagem da taxa de germinação dos conídios		%
URM 8510	<i>Fusarium sacchari</i>	98,50
URM 8511	<i>Fusarium verticillioides</i>	98
URM 8512	<i>Fusarium sacchari</i>	95,50
URM 8513	<i>Fusarium sacchari</i>	99
URM 8514	<i>Fusarium sp.nov.</i>	96,50
URM 8515	<i>Fusarium musae</i>	96
URM 8516	<i>Purpureocillium sodanum</i>	94,50
URM 8530	<i>Purpureocillium sodanum</i>	94
URM 8531	<i>Paecilomyces formosus</i>	97
URM 8532	<i>Purpureocillium sodanum</i>	93
URM 8533	<i>Paecilomyces formosus</i>	99,50

Fonte: A autora (2022).

O modelo de regressão linear foi o mais adequado para os dados obtidos, com as taxas de mortalidade de *N. corniger* causadas pelos isolados do FFSC ocorrendo de forma crescente. Na análise de regressão, a mortalidade dos cupins causada pelos isolados **URM 8510** ($R^2= 0,9793$; $p=0,0013$), **URM 8511** ($R^2=0,9923$; $p=0,0003$), **URM 8512** ($R^2=0,9606$; $p=0,0034$), **URM 8513** ($R^2=0,9592$; $p=0,0036$), **URM 8514** ($R^2=0,9859$; $p=0,0007$) e **URM 8515** ($R^2=0,9984$; $p=0,0000$) apresentou resultados significativos de acordo com o valor de $p<0,05$ (Figura 10).

Figura 10: Mortalidade acumulada confirmada de *Nasutitermes corniger* ao longo de cinco dias após aplicação de 1×10^7 conídios/mL de isolados do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. URM 8510 *Fusarium sacchari*, URM 8511 *Fusarium verticilloides*, URM 8512 *Fusarium sacchari*, URM 8513 *Fusarium sacchari*, URM 8514 *Fusarium sp. nov.*, URM 8515 *Fusarium musae*.



Fonte: A autora (2022).

Ao quinto dia de avaliação, foi observada uma pequena variação entre as taxas de mortalidade causadas pelos isolados do FFSC contra *N. corniger*. URM 8510 e URM8513 de *F. sacchari* causaram mortalidade confirmada acumulada de 38,33% e 25,53% respectivamente, porém, não foram observadas diferenças entre os isolados testados (Tabela 3). Estes diferiram do controle, pois nesta situação os insetos não apresentaram o desenvolvimento de fungos (0,00% de mortalidade acumulada confirmada) (Tabela 3).

Tabela 3. Mortalidade acumulada confirmada (percentual médio \pm desvio padrão) de *Nasutitermes corniger* após cinco dias de aplicação de 1×10^7 conídios/mL de isolados do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*.

Tratamentos		Mortalidade acumulada confirmada (%) \pm Desvio padrão
Controle		0,00 \pm 0,00 c
URM 8510	<i>Fusarium sacchari</i>	38,33 \pm 16,91 a
URM 8511	<i>Fusarium verticillioides</i>	26,11 \pm 13,57ab
URM 8512	<i>Fusarium sacchari</i>	31,67 \pm 0,00 a
URM 8513	<i>Fusarium sacchari</i>	25,56 \pm 0,96ab
URM 8514	<i>Fusarium sp. nov.</i>	26,11 \pm 10,72ab
URM 8515	<i>Fusarium musae</i>	36,67 \pm 10,00 a
*CV (%)		37,65

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

*CV (%): Coeficiente de variação

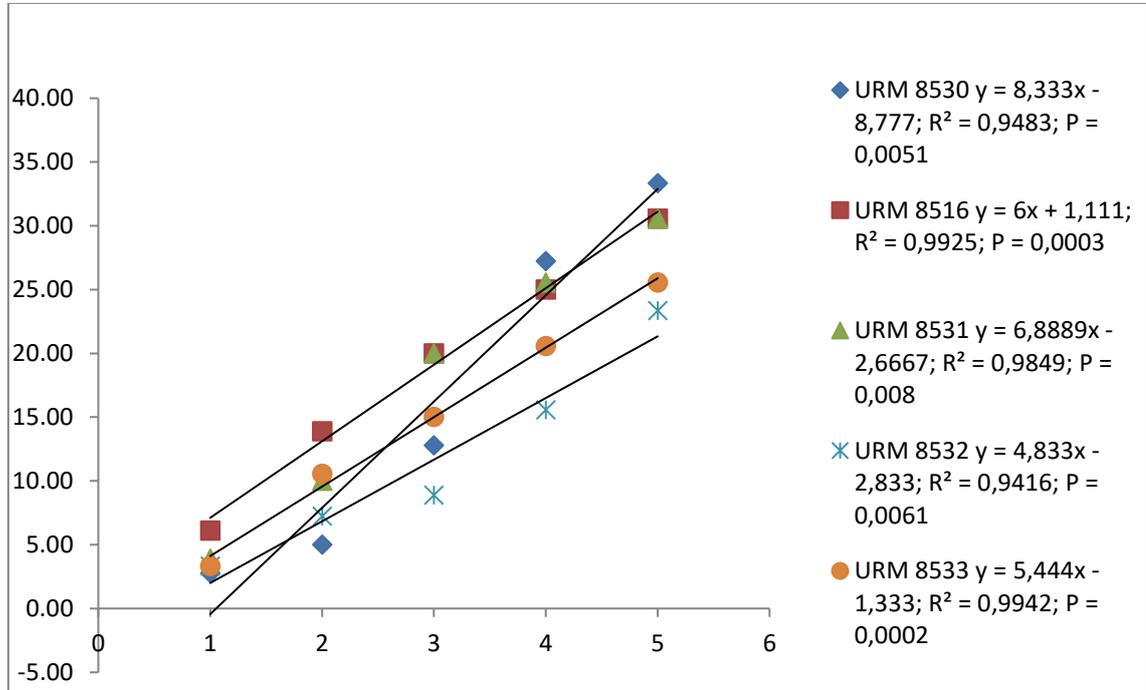
Fonte: A autora (2022)

4.3. PATOGENICIDADE DE *PURPUREOCILLIUM SODANUM* E *PAECILOMYCES FORMOSUS* CONTRA *NASUTITERMES CORNIGER*

A taxa de germinação dos conídios dos isolados de *P. sodanum* e de *P. formosus* testados contra *N. corniger* variou entre 93% e 99,50% (Tabela 2).

Na análise de regressão, os valores de mortalidade dos cupins causados pelos isolados **URM 8516** ($R^2=0,9925$; $p=0,0003$), **URM 8530** ($R^2= 0,9483$; $p=0,0051$), **URM 8532** ($R^2=0,9416$; $p=0,0061$) de *P. sodanum* e **URM 8531** ($R^2=0,9849$; $p=0,008$) e **URM 8533** ($R^2=0,9942$; $p=0,0002$) de *P. formosus* foram significativos de acordo com o valor de $p < 0,05$. Os isolados mataram o inseto de forma crescente ao longo dos dias avaliados, porém causando mortalidade com valores menores que o esperado (Figura 11).

Figura 11: Mortalidade acumulada confirmada de *Nasutitermes corniger* ao longo de cinco dias após aplicação de 1×10^7 conídios/mL de isolados de *Purpureocillium* e *Paecilomyces*. URM8530 *Purpureocillium sodanum*, URM 8516 *Purpureocillium sodanum*, URM 8531 *Paecilomyces formosus*, URM 8532 *Purpureocillium sodanum*, URM 8533 *Paecilomyces formosus*.



Fonte: A autora (2022).

Ao quinto dia de avaliação, foi observada pequena variação entre as taxas de mortalidade causadas pelos isolados de *P. sodanum* e *P. formosus* contra *N. corniger*. *Purpureocillium sodanum* (URM 8530) causou mortalidade acumulada confirmada de 33,33% de *N. corniger* ao quinto dia de avaliação, enquanto URM 8532 causou 23,33% (Tabela 4). Os dados não diferem entre si estatisticamente, com a taxa de mortalidade sendo considerada igual para todos os isolados, porém estes diferiram do controle. Nesta situação os insetos não apresentaram o desenvolvimento de fungos (0,00% de mortalidade acumulada confirmada).

Tabela 4. Mortalidade acumulada confirmada (percentual médio \pm desvio padrão) de *Nasutitermes corniger* após cinco dias de aplicação de 1×10^7 conídios/mL de isolados de *Paecilomyces formosus* e *Purpureocillium sodanum*.

Tratamentos		Mortalidade acumulada confirmada (%) \pm Desvio padrão
Controle		0,00 \pm 0,00 b
URM 8516	<i>Purpureocillium sodanum</i>	30,56 \pm 5,13 a
URM 8530	<i>Purpureocillium sodanum</i>	33,33 \pm 6,24 a
URM 8531	<i>Paecilomyces formosus</i>	30,56 \pm 4,04 a
URM 8532	<i>Purpureocillium sodanum</i>	23,33 \pm 1,73 a
URM 8533	<i>Paecilomyces formosus</i>	25,56 \pm 1,53 a
*CV (%)		25,38

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

*CV (%): Coeficiente de variação

Fonte: A autora (2022).

5. DISCUSSÃO

Isolados do FFSC, de *Paecilomyces* e de *Purpureocillium* foram obtidos de soldados e operários de *N. corniger*. As espécies utilizadas neste estudo não estavam causando epizootias no campo, mas devido ao histórico de entomopatogenicidade, elas foram testadas contra *N. corniger*.

Os complexos de espécies de *Fusarium* são relatados na literatura como os mais ricos em linhagens entomófilas (O'DONNELL; HUMBER; GEISER; AL., 2012) e os estudos relacionados a sua patogenicidade contra insetos tem aumentado nos últimos anos como observado por (SANTOS; DINIZ; TIAGO; OLIVEIRA, 2020). Estes autores verificaram que *Fusarium* inclui muitos agentes entomopatogênicos com características promissoras para o controle de insetos incluindo o complexo de espécies *F. fujikuroi* (FFSC) que foi utilizado nesse estudo.

A patogenicidade de alguns isolados do FFSC obtidos da mosca negra dos citrus, *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae), foi testada contra a mesma espécie de inseto. Os resultados foram bastante promissores com valores de mortalidade em torno de 85% causada por *F. verticillioides* (BARBOSA; SANTOS; DINIZ; ALVES et al., 2021). *Fusarium fujikuroi* foi testado contra *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) e causaram mortalidade de 40, 50 e 70% respectivamente (SHARMA; GONÇALVES; OLIVEIRA; TORRES et al., 2018).

Não há estudos de isolados do FFSC testados contra *N. corniger*, porém há para o complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC). (DINIZ; CERQUEIRA; RIBEIRO; DA COSTA et al., 2020) testaram 27 isolados do FIESC (*F. sulawesiense*, *F. pernambucanum* e *F. caatingaense*) contra *N. corniger* e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), obtendo taxa de mortalidade superior a 90% contra o cupim.

Apesar dos resultados promissores apontando isolados de *Fusarium* no controle de insetos, no nosso estudo *F. musae*, *F. sachari*, *F. verticillioides* e *Fusarium* sp. nov. causaram taxas de mortalidade contra *N. corniger* menores que os apresentados acima por outros autores. O mesmo foi observado para os isolados de *P. sodanum* e *P. formosus*.

Purpureocillium lilacinum (*Paecilomyces lilacinus*) HY-4 foi testada contra *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), conhecido como o ácaro-rajado, e

obteve 73,3% de mortalidade após seis dias de inoculação, obtendo assim um resultado positivo para o biocontrole (SHIN; LEE; KO; JI *et al.*, 2011).

Isolados de *Fusarium* e um de *Purpureocillium lilacinum* também foram testados contra a mosca-negra-dos-citrus, *A. woglumi*, e causaram 100% de mortalidade no sétimo dia após a inoculação (MEDEIROS; LEMOS; RODRIGUES; BATISTA FILHO *et al.*, 2018). *P. lilacinum* causou alta mortalidade para *Galleria mellonella* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae), conhecida como grande traça da cera, resultando em aproximadamente 100% de mortalidade aos sete dias pós-imersão com 1×10^8 conídios/mL (DEMIRCI; ALTUNTAS, 2019).

O Piolho-do-algodão, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae), apresentou mortalidade de 60% para os indivíduos tratados com *P. lilacinum*. Esta espécie causou epizootias em *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera: Reduviidae) e após isolamento foram realizados testes que resultaram em 100% de mortalidade após 30 dias (MARTI; LASTRA; PELIZZA; GARCIA, 2006).

Um estudo realizado com cupim, *Odontotermes obesus* Rambur (Blattodea: Termitidae), verificou que isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram virulentos a este inseto, apresentando mortalidades significativamente mais elevadas do que *M. flavoviride*, *P. lilacinus* e *Cordyceps fumosorosea* (*P. fumosoroseus*), que eram apenas ligeiramente patogênicos para essa espécie de cupim. *Akanthomyces lecanii* (*Verticillium lecanii*), *Cordyceps farinosa* (*Paecilomyces farinosus*) e *Nomuraea rileyi* não foram patogênicos, pois não causavam mortalidade nem qualquer tipo de anormalidade ao longo dos dias de avaliação (KHAN; JAYARAJ; GOPALAN, 1993). (KHAN; JAYARAJ; GOPALAN, 1992) corroboraram a patogenicidade de *C. fumosorosea* (*P. fumosoroseus*) e incluíram *P. lilacinus* como patógeno do cupim *Odontotermes wallonensis* Wasmann (Blattodea: Termitidae). Os mesmos autores verificaram também que a espécie *C. farinosa* (*P. farinosus*) não foi patogênica a este cupim.

No nosso estudo, verificamos uma pequena variação nas taxas de mortalidade causadas pelos fungos testados contra *N. corniger* e este fato pode estar associado a origem dos fungos que foram obtidos da microbiota nativa do cupim, ou seja, estavam presentes no organismo do mesmo e aparentemente sem causar prejuízos ao inseto no seu ambiente natural.

Associações entre fungos e insetos são comuns e podem ser altamente específicas e obrigatórias ou casuais. Mais de 40 espécies fúngicas estão associadas à broca do café (*Hypothenemus hampei*, Coleoptera: Curculionidae (PEREZ; INFANTE; VEGA; HOLGUIN *et al.*, 2003) e aproximadamente o mesmo número com o cupim subterrâneo *Reticulitermes flavipes*. A espécie mais conhecida de cupins cultivadores de fungos é *Macrotermes bellicosus* da família Termitidae. Esta espécie e todos os cupins fungiformes vivem numa simbiose obrigatória com *Termitomyces* (Basidiomycota) (VEGA; BLACKWELL, 2005b).

O fungo ajuda a degradar o material derivado das plantas, como madeira, erva seca, ninhada foliar sobre a qual vivem os cupins (JOHNSON; LAMB; WOOD, 2009). Várias funções possíveis foram propostas: (1) decomposição da lignina para melhorar a palatabilidade dos alimentos e acesso à celulose (OHKUMA, 2003); (2) aquisição de celulasas fúngicas e xilanases para trabalhar sinergisticamente e complementarmente com as enzimas endógenas dos cupins (ROULAND-LEFEVRE, 2000) (3) enriquecimento dos alimentos com nitrogênio devido ao metabolismo intensivo dos hidratos de carbono (HYODO; TAYASU; INOUE; AZUMA *et al.*, 2003); e (4) produção de calor e água metabólica. Alguns estudos sugerem que o papel do fungo pode diferir em diferentes cupins (HYODO; TAYASU; INOUE; AZUMA *et al.*, 2003; ROULAND-LEFEVRE, 2000). Os mesmos autores relataram que o papel do fungo em espécies do gênero *Macrotermes* foi principalmente para degradar a lignina, enquanto o fungo em três outros gêneros serviu principalmente como alimento.

Em experiências manipuladas em condições de campo, (MESQUITA; LACEY; LECLANT, 1997) demonstraram o potencial de *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae) e *Cordyceps fumosorosea* (*Paecilomyces fumosoroseus*) utilizados em combinação para controlar o pulgão de trigo russo, *Diuraphis noxia* Kurdjumov (Hemiptera: Aphididae),.

6 CONCLUSÕES

- A hipótese de que fungos da microbiota nativa do cupim *N. corniger* seria eficiente no seu controle não foi aceita, pois os fungos apesar de matarem o inseto, apresentaram baixa taxa de mortalidade para controle biológico. As espécies de *Fusarium*, *Paecilomyces* e de *Purpureocillium* da microbiota nativa de *N. corniger* são pouco eficazes no controle biológico deste inseto, uma vez que as condições de campo tendem a diminuir ainda mais a sua capacidade de controle
- A microbiota nativa dos cupins é uma fonte de novas descobertas fúngicas.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, A. C.; MATIAS, G. R. R. S.; OLIVEIRA, M. A. P.; COUTO, A. A. V. d. O. *et al.* Urban Termites of Recife, Northeast Brazil (Isoptera). **Sociobiology**, 59, n. 1, 2014.

ALVES, S. B.; LOPES, R.; VIEIRA, S. A.; TAMAI, M. A. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. **Controle microbiano de pragas na América Latina: Avanços e desafios - FEALQ**, 14, p. 69-104, 2008.

ALVES, S. B.; MOINO, J.; ALMEIDA, J. E. M. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos. *In*: SB, A. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998. p. 217–238.

ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Produção de fungos entomopatogênicos. *In*: ALVES, S. B. L., R.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 845-870.

BACON, C. W.; PORTER, J. K.; NORRED, W. P.; LESLIE, J. F. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. **Appl Environ Microbiol**, 62, n. 11, p. 4039-4043, 1996.

BALLAL, C. R.; VERGHESE, A. Role of parasitoids and predators in the management of insect pests. *In*: AK, C. (Ed.). **New horizons in insect science: towards sustainable pest management**. New Delhi: Springer, 2015. p. 307–326.

BANDEIRA, A. G.; MIRANDA, C. S.; VASCONCELLOS, A. Danos causados por cupins em João Pessoa, Paraíba - Brasil. *In*: FONTES, L. R., Berti Filho, E. (Ed.). **Cupins: o desafio do conhecimento**. Piracicaba: FEALQ, 1988. cap. Cupins, p. 75-85.

BARBOSA, L. F. S.; SANTOS, A. C. d. S.; DINIZ, A. G.; ALVES, A. L. *et al.* Entomopathogenicity of fungi in combination with *Ricinus communis* extract for the control of *Aleurocanthus woglumi*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 169, n. 9, p. 838-847, 2021.

BECCALONI, G.; EGGLETON, P. Order Blattodea. **Zootaxa**, 3703, n. 1, 2013.

BIGNELL, D. E.; EGGLETON, P. Termites in Ecosystems. *In*: **Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology**. London: Kluwer Academic Publishers, 2000. cap. Chapter 17, p. 363-387.

BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C.; LATGE, J. P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. **Appl Environ Microbiol**, 54, n. 7, p. 1795-1805, 1988.

- BOULOGNE, I.; CONSTANTINO, R.; AMUSANT, N.; FALKOWSKI, M. *et al.* Ecology of termites from the genus *Nasutitermes* (Termitidae: Nasutitermitinae) and potential for science-based development of sustainable pest management programs. **Journal of Pest Science**, 90, n. 1, p. 19-37, 2016.
- BRITO, C. H.; LOPES, E. B.; ALBUQUERQUE, I. C.; BATISTA, J. Avaliação de produtos alternativos e pesticidas no controle da cochonilha-do-carmim na Paraíba. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, 8, n. 2, p. 1-5, 2008.
- BRUGEROLLE, G.; RADEK, R. Symbiotic Protozoa of Termites. *In*: H. KÖNIG, A. V. (Ed.). **Intestinal Microorganisms of Termites and Other Invertebrates**: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. v. 6, cap. Chapter 10, p. 243-269. (Soil Biology).
- BURG, L. C.; MAYER, P. H. **Manual de alternativas ecológicas para prevenção e controle de pragas e doenças**. Paraná: Assessora, 1999.
- BURGESS, L. W.; TRIMBOLI, D. Characterization and distribution of *Fusarium nygamai*, sp. nov. **Mycologia** 78, p. 223-229, 1986.
- BURHAN, A. H.; ANNON, D. M. R. Pathogenesis of *Paecilomyces lilacinus* against the immature stages of *Musca domestica* L. **Pharm. Sci. & Res**, 12, n. 1, p. 175-181, 2020.
- BUSTILLO, A. E.; BERNAL, M. G.; BENAVIDES, P.; CHAVES, B. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera : Scolytidae) population semerging from fallen coffee berries. **FloridaEntomol**, 82, n. 4, p. 491-498, 1999.
- BUTT, T. M.; GOETTEL, M. S. Bioassays of entomogenous fungi. *In*: NAVON, I. e ASCHER, K. R. S. (Ed.). **Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes**. Wallingford. UK: CAB International, 2000. p. 141-196.
- CARNEIRO-LEÃO, M. P.; TIAGO, P. V.; MEDEIROS, L. V.; DA COSTA, A. F. *et al.* *Dactylopius opuntiae*: control by the *Fusarium incarnatum–equiseti* species complex and confirmation of mortality by DNA fingerprinting. **Journal of Pest Science**, 90, n. 3, p. 925-933, 2017.
- CARRIÓN, G.; BONET, A. Mycobiota Associated with the Coffee Berry Borer (Coleoptera: Scolytidae) and Its Galleries in Fruit. **Annals of the Entomological Society of America**, 97, n. 3, p. 492-499, 2004.
- CERDA-OLMEDO, E.; FERNANDEZ-MARTIN, R.; AVALOS, J. Genetics and gibberellin production in *Gibberella fujikuroi*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 65, n. 3, p. 217-225, 1994.
- CHAGAS, F. D.; POLONIO, J. C.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; PAMPHILE, J. A. *et al.* Controle biológico em sistema orgânico de produção por agricultores da cidade de Maringá-Pr. **Ciência e Natura**, 38, n. 2, 2016.

CLAYDON, N.; GROVE, J. F. *Fusarium* as an insect pathogen. **British Mycology Soc**, 7, p. 117-128, 1982.

COLEMAN, J. J.; MUHAMMED, M.; KASPERKOVITZ, P. V.; VYAS, J. M. *et al.* *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. **Fungal Biol**, 115, n. 12, p. 1279-1289, 2011.

CONSTANTINO, R. Chave ilustrada para identificação dos gêneros de cupins (Insecta: Isoptera) que ocorrem no Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, 40, n. 25, p. 387-448, 1999.

CONSTANTINO, R. The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. **Journal of Applied Entomology**, 126, n. 7-8, p. 355-365, 2002.

CORREIA, M.; AGUIAR-MENEZES, E. d. L.; DE AQUINO, A. J. E. A.-D. Associações entre térmitas e microrganismos. 2008.

COSTA-LEONARDO, A. M. **Cupins-Praga: Morfologia, Biologia E Controle**. Universidade Estadual Paulista, 2002. 9788590309819.

COSTA, D. A.; ESPÍRITO SANTO FILHO, K. d.; BRANDÃO, D. Padrão de distribuição de cupins na região urbana de Goiânia. **Iheringia. Série Zoologia**, 99, n. 4, p. 364-367, 2009.

DE HOOG, G. S.; CHATURVEDI, V.; DENNING, D. W.; DYER, P. S. *et al.* Name changes in medically important fungi and their implications for clinical practice. **J Clin Microbiol**, 53, n. 4, p. 1056-1062, 2015.

DE LA CRUZ MNS; SANTOS-JUNIOR HM; REZENDE CM; ALVES RJV *et al.* TERPENOS EM CUPINS DO GÊNERO *Nasutitermes* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). **Quim Nova**, 37, n. 1, p. 95-103, 2014.

DEBACH, P.; ROSEN, D. **Biological Control by Natural Enemies**. 2 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.

DEMIRCI, S. N. S.; ALTUNTAS, H. Entomopathogenic potential of *Purpureocillium lilacinum* against the model insect *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Environmental and Experimental Biology**, 17, n. 2, 2019.

DINIZ, A. G.; CERQUEIRA, L. V.-B. M. P. d.; RIBEIRO, T. K. d. O.; DA COSTA, A. F. *et al.* Pathogenicity of isolates of *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex to *Nasutitermes corniger* (Blattodea: Termitidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Pest Management**, 68, n. 2, p. 103-112, 2020.

DUBOVSKIY, I. M.; WHITTEN, M. M.; YAROSLAVTSEVA, O. N.; GREIG, C. *et al.* Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi? **PLoS One**, 8, n. 4, p. e60248, 2013.

DUNLAP, C. A.; JACKSON, M. A.; WRIGHT, M. S. A foam formulation of *Paecilomyces fumosoroseus*, an entomopathogenic biocontrol agent. **Biocontrol Science and Technology**, 17, n. 5, p. 513-523, 2007.

EMBRAPA. **Controle biológico de pragas da agricultura**. 2020. 978-65-86056-01-3.

ESPADALE, E.; BUCKLEY, L.; BORIO, S.; MCEWAN, N. *et al.* Successful multimodal treatment of *Paecilomyces lilacinus* infection in a dog. **Veterinary Record Case Reports**, 6, n. 2, 2018.

EVANS, T. A.; IQBAL, N. Termite (order Blattodea, infraorder Isoptera) baiting 20 years after commercial release. **Pest Manag Sci**, 71, n. 7, p. 897-906, Jul 2015.

FAO. Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. **Estudio FAO: Producción y Sanidad Animal (FAO)**, 2003.

FARIA, M. R. d.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, 43, n. 3, p. 237-256, 2007.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, E. V. d. O.; MARTINS, V.; INDA JUNIOR, A. V.; GIASSON, E. *et al.* Ação dos térmitas no solo. **Ciência Rural**, 41, n. 5, p. 804-811, 2011.

FINKLER, C. L. L. Controle de insetos: uma breve revisão. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, 8-9, p. 169-189, 2012.

FREITAS, C. M. d.; PORTO, M. F. S.; MOREIRA, J. C.; PIVETTA, F. *et al.* Segurança química, saúde e ambiente: perspectivas para a governança no contexto brasileiro. **Cadernos de Saúde Pública**, 18, n. 1, p. 249-256, 2002.

FREYMAN, B. P.; BUITENWERF, R.; DESOUZA, O.; OLFF, H. The importance of termites (Isoptera) for the recycling of herbivore dung in tropical ecosystems: a review. **European Journal of Entomology**, 105, n. 2, p. 165-173, 2008.

FURLONG, M. J.; PELL, J. K. Interactions between entomopathogenic fungi and arthropod natural enemies. *In*: VEGA, F. E. a. B., M. S. A. (Ed.). **Insect-fungal associations: ecology and evolution**. Oxford: Oxford University Press (OUP), 2005. p. 51-73.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L. *et al.* **Entomologia agricola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GAMA, F. C.; TEIXEIRA, C. A.; GARCIA, A.; COSTA, J. N. *et al.* Diversity of filamentous fungi associated with *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) and its galleries in berries of *Coffea canephora* (Pierre). **Neotrop Entomol**, 35, n. 5, p. 573-578, 2006.

GARDIANO, C. G.; FERRAZ, S.; LOPES, E. A.; FERREIRA, P. A. *et al.* Evaluation of plant aqueous extracts, added into the soil, on *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. **Semina: Ciências Agrárias**, 30, n. 3, p. 551-556, 2009.

GONÇALVES DINIZ, A.; BARBOSA, L. F. S.; SANTOS, A. C. d. S.; OLIVEIRA, N. T. d. *et al.* Bio-insecticide effect of isolates of *Fusarium caatingaense* (Sordariomycetes: Hypocreales) combined to botanical extracts against *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae). **Biocontrol Science and Technology**, 30, n. 4, p. 384-395, 2020.

HAN, J. H.; JIN, B. R.; KIM, J. J.; LEE, S. Y. Virulence of Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* for the Microbial Control of *Spodoptera exigua*. **Mycobiology**, 42, n. 4, p. 385-390, Dec 2014.

HAWKSWORTH, D. L.; LUCKING, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. **Microbiol Spectr**, 5, n. 4, 2017.

HUMBER, R.; HANSEN, K. Collection of entomopathogenic fungal cultures: catalog of Isolates. **Plant Protection Research Unit**, 2005.

HYODO, F.; TAYASU, I.; INOUE, T.; AZUMA, J. I. *et al.* Differential role of symbiotic fungi in lignin degradation and food provision for fungus-growing termites (Macrotermitinae: Isoptera). **Functional Ecology**, 17, n. 2, p. 186-193, 2003.

JOHNSON, R. A.; LAMB, R. W.; WOOD, T. G. Termite Damage and Crop Loss Studies in Nigeria a Survey of Damage to Groundnuts. **Tropical Pest Management**, 27, n. 3, p. 325-342, 2009.

JUNIOR, A. M. **Fatores que afetam a eficiência de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no controle de *Heterotermes tenuis* (Isoptera, Rhinotermitidae)**. 1998. 152 f. - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba.

KHAN, H. K.; JAYARAJ, S.; GOPALAN, M. Testing of entomopathogenic fungi against agro-forestry termite *Odontotermes wallonensis* (Wasmann). **Indian Journal of Forestry**, 15, n. 4, p. 342-345, 1992.

KHAN, H. K.; JAYARAJ, S.; GOPALAN, M. Muscardine fungi for the biological control of agroforestry termite *Odontotermes obesus* (Rambur). **International Journal of Tropical Insect Science**, 14, n. 04, p. 529-535, 1993.

KREJZOVÁ, R. Ultrastructure of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown et Smith isolated from *Zoothermopsis* sp. **Ceska Mycologie**, 30, n. 2, p. 110-114, 1976.

KRISHNA, K.; WEESNER, F. M. **Biology of termites**. New York: Academic Press 1969.

KWASNA, H.; CHELKOWSKI, J.; ZAJKOWSKI, P. Grzyby (Mycota), tom XXII. Sierpik (*Fusarium*). **Polska Akademia Nauk**, p. 137, 1991.

LACEY, L. A.; FRUTOS, R.; KAYA, H. K.; VAIL, P. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? **Biological Control**, 21, n. 3, p. 230-248, 2001.

LAZZARINI, G. M. J. **Efeito da umidade sobre a germinação in vitro de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e atividade contra *Triatoma infestans***. 2005. 46 f. - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. 2006. 97808138191989780470278376.

LOGRIECO, A.; MORETTI, A.; CASTELLA, G.; KOSTECKI, M. *et al.* Beauvericin production by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, 64, p. 3084–3088, 1998.

LOPES, R. d. S.; LIMA, G. d.; CORREIA, M. T. d. S.; DA COSTA, A. F. *et al.* The potential of *Isaria* spp. as a bioinsecticide for the biological control of *Nasutitermes corniger*. **Biocontrol Science and Technology**, 27, n. 9, p. 1038-1048, 2017.

LÓPEZ LLORCA, L. V.; JANSSON, H.-B. Biodiversidad del suelo : control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematófagos. **Cuadernos de biodiversidad**, n. 6, p. 12-15, 2001.

LOUREIRO EDE, S.; OINO, A., Jr. [Pathogenicity of hyphomycet fungi to aphids *Aphis gossypii* Glover and *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae)]. **Neotrop Entomol**, 35, n. 5, p. 660-665, 2006.

LOUREIRO, E. d. S.; MONTEIRO, A. C. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera : Formicidae). **Revista Árvore**, 29, n. 4, p. 553-561, 2005.

LUANGSA-ARD, J.; HOUBRAKEN, J.; VAN DOORN, T.; HONG, S. B. *et al.* *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. **FEMS Microbiol Lett**, 321, n. 2, p. 141-149, Aug 2011.

LUANGSA-ARD, J. J.; HYWEL-JONES, N. L.; MANOCH, L.; SAMSON, R. A. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. **Mycol Res**, 109, n. Pt 5, p. 581-589, 2005.

MARASAS, W. F. O.; BURGESS, L. W.; ANELICH, R. Y.; LAMPRECHT, S. C. *et al.* Survey of *Fusarium* species associated with plant debris in South African soils. **South African Journal of Botany**, 54, n. 1, p. 63-71, 1988.

MARASAS, W. F. O.; NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; VAN WYK, P. S. *Fusarium polyphialidicum*, a new species from South Africa. **Mycologia**, 78, n. 4, p. 678-682, 1986.

MARICONI, F. A. M. F. L. R. A., R.L. Os cupins. *In*: MARICONI, F. A. M. e FONTES L.R.; ARAÚJO, R. L. (Ed.). **Insetos e outros invasores de residências**. Piracicaba: FEALQ, 1999. v. 6, p. 35-90.

MARTI, G. A.; LASTRA, C. C.; PELIZZA, S. A.; GARCIA, J. J. Isolation of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (Ascomycota: Hypocreales) from the Chagas disease vector, *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera: Reduviidae) in an endemic area in Argentina. **Mycopathologia**, 162, n. 5, p. 369-372, Nov 2006.

MEDEIROS, F. R.; LEMOS, R. N. S. d.; RODRIGUES, A. A. C.; BATISTA FILHO, A. *et al.* Occurrence of *Purpureocillium lilacinum* in citrus black fly nymphs. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 40, n. 2, p. 1-3, 2018.

MESQUITA, A. L. M.; LACEY, L. A.; LECLANT, F. Individual and combined effects of the fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* and parasitoid, *Aphelinus asychis* Walker (Hym., Aphelinidae) on confined populations of Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Hom., Aphididae) under field conditions. **Journal of Applied Entomology**, 121, n. 1-5, p. 155-163, 1997.

MEYER, J. M.; HOY, M. A.; BOUCIAS, D. G. Morphological and molecular characterization of a *Hirsutella* species infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in Florida. **J Invertebr Pathol**, 95, n. 2, p. 101-109, 2007.

MEYER, J. M.; HOY, M. A.; BOUCIAS, D. G. Isolation and characterization of an *Isaria fumosorosea* isolate infecting the Asian citrus psyllid in Florida. **Journal of Invertebrate Pathology**, 99, p. 96-102, 2008.

MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. **Biological Control**, 43, n. 2, p. 145-155, 2007.

MYLES, T. G. Review of secondary reproduction in termites (Insecta: Isoptera) with comments on its role in termite ecology and social evolution. **Sociobiology** 33, n. 1, 1999.

NEVES, E. M.; RODRIGUES, L.; DAYOUB, M.; DRAGONE, D. S. Citricultura brasileira: Efeitos econômicos-financeiros **Revista Brasileira de Fruticultura**, 23, n. 2, p. 432-436, 2001.

NEVES, P. M. O. J.; ALVES, S. B. External events related to the infection process of *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Neotropical Entomology**, 33, n. 1, p. 51-56, 2004.

NEVES, P. M. O. J.; HIROSE, E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology**, 34, n. 1, p. 77-82, 2005.

NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* Species and Combinations within the *Gibberella fujikuroi* Species Complex. **Mycologia**, 90, n. 3, 1998.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Mol Phylogenet Evol**, 7, n. 1, p. 103-116, 1997.

O'DONNELL, K.; HUMBER, R. A.; GEISER, D. M.; KANG, S. *et al.* Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and *Fusarium* MLST. **Mycologia**, 104, n. 2, p. 427-445, 2012.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95, n. 5, p. 2044-2049, 1998.

O'DONNELL, K.; MCCORMICK, S. P.; BUSMAN, M.; PROCTOR, R. H. *et al.* Marasas *et al.* 1984 "Toxigenic *Fusarium* Species: Identity and Mycotoxicology" revisited. **Mycologia**, 110, n. 6, p. 1058-1080, 2018.

O'DONNELL, K.; HUMBER, R. A.; GEISER, D. M.; AL., e. Phylogenetic diversity of 476 insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular 477 identification via FUSARIUM-ID and *Fusarium* MLST. **Mycologia**, 104, p. 427-445, 2012.

OHKUMA, M. Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose. **Appl Microbiol Biotechnol**, 61, n. 1, p. 1-9, 2003.

ONOFRE, S. B.; MINIUK, C. M.; DE BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. **Am J Vet Res**, 62, n. 9, p. 1478-1480, 2001.

PADULLA, L. F. L.; ALVES, S. B. Suscetibilidade de Ninfas de *Diaphorina citri* a Fungos Entomopatogênicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, 76, n. 2, p. 297-302, 2009.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. *In*: BENTO, J. M. S. (Ed.). **Os Insetos e Entomologia**. São Paulo: Embrapa Soja, 2002. p. 609.

PEREIRA, R. M.; ALVES, S. B.; REIS, P. R. Segurança no emprego de entomopatógenos. *In*: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 6, p. 171-194.

PEREZ, J.; INFANTE, F.; VEGA, F. E.; HOLGUIN, F. *et al.* Mycobiota associated with the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) in Mexico. **Mycol Res**, 107, n. Pt 7, p. 879-887, Jul 2003.

PIRES, L. M.; MARQUES, E. J.; OLIVEIRA, J. V.; ALVES, S. B. Selection of isolates of entomopathogenic fungi for controlling *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) and their compatibility with insecticides used in tomato crop. **Neotrop Entomol**, 39, n. 6, p. 977-984, 2010.

POTENZA, M. R.; CAMPOS, T. B.; ZORZENON, F. J.; CANCELLO, E. M. Métodos de controle. *In*: **Cupins: pragas em áreas urbanas**: Instituto Biológico, 1998.

POTRICH M; ALVES LFA; HASS J; SILVA ERL *et al.* Seletividade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* a *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, 38, p. 822–826, 2009.

PRESTES, A. C. **Padrão de Revoadas de cupins (Isoptera) em duas áreas de cerrado no Brasil Central**. 2012. 1-48 f. - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL, UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, Brasília-DF.

PÜNTENER, W. **Manual for field trials in plant protection** 2ed. Agricultural Division, 1981.

REHNER, S. Phylogenetics of the Insect Pathogenic Genus *Beauveria*. *In*: FERNANDO E. VEGA, M. B. (Ed.). **Insect-Fungal Associations, Ecology and Evolution**. Oxford: OXFORD UNIVERSITY PRESS, 2005. p. 3-27.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F.; VISMER, H. F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Appl Environ Microbiol**, 68, n. 5, p. 2101-2105, 2002.

RHEINHEIMER, A. R. **Controle biológico e alternativo da cochonilha (*Phenacoccus manihoti* MATILE-FERRERO) na cultura da mandioca (*Manihot esculenta* CRANTZ)**. 2010. 60 f. - Programa de Pós Graduação em Agronomia Universidade Estadual do Oeste do Paraná

ROBERTS, D. W. Toxins of entomopathogenic fungi. *In*: BURGESS, H. D. (Ed.). **Microbial Control of Pests and Plant Diseases**. New York: Academic Press, 1981 p. 441-464.

ROULAND-LEFEVRE, C. Symbiosis with Fungi. *In*: ABE, T.; BIGNELL, D. E., *et al* (Ed.). **Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 289-306

ROULAND-LEFÈVRE, C. Termites as Pests of Agriculture. *In: Biology of Termites: a Modern Synthesis*, 2010. cap. Chapter 18, p. 499-517.

SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; GAMS, W.; CASTLEBURY, L. A. *et al.* *Trichoderma* Species Associated with the Green Mold Epidemic of Commercially Grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, 94, n. 1, 2002.

SANTORO, P. H.; NEVES, P. M. O. J.; ALEXANDRE, T. M.; ALVES, L. F. A. Interferência da metodologia nos resultados de bioensaios de seleção de fungos entomopatogênicos para controle de insetos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42, p. 483-489, 2007.

SANTOS, A. C. d. S.; DINIZ, A. G.; TIAGO, P. V.; OLIVEIRA, N. T. d. Entomopathogenic *Fusarium* species: a review of their potential for the biological control of insects, implications and prospects. **Fungal Biology Reviews**, 34, n. 1, p. 41-57, 2020.

SCHULTZ, T. R.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R.; REHNER, S. A. Reciprocal Illumination: A comparison of Agriculture in Humans and in Fungus-growing Ants. *In: FERNANDO E. VEGA, M. B. (Ed.). Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*. Oxford: OXFORD UNIVERSITY PRESS, 2005.

SHARMA, L.; GONÇALVES, F.; OLIVEIRA, I.; TORRES, L. *et al.* Insect-associated fungi from naturally mycosed vine mealybug *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae). **Biocontrol Science and Technology**, 28, n. 2, p. 122-141, 2018.

SHIN, T.-Y.; LEE, W.-W.; KO, S.-H.; JI, Z. *et al.* Preliminary Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* HY-4 to Control *Tetranychus urticae*. **International Journal of Industrial Entomology**, 22, n. 1, p. 25-28, 2011.

STEPIEN, L.; KOCZYK, G.; WASKIEWICZ, A. Diversity of *Fusarium* species and mycotoxins contaminating pineapple. **J Appl Genet**, 54, n. 3, p. 367-380, 2013.

SUBANDIYAH, S.; NIKOH, N.; SATO, H.; WAGIMAN, F. *et al.* Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera, Psylloidea) in Indonesia. **Mycoscience**, 41, n. 5, p. 509-513, 2000.

SUMMERELL, B. A.; LESLIE, J. F. Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough? **Fungal Diversity**, 50, n. 1, p. 135-144, 2011.

TEETOR-BARSCH, G. H.; ROBERTS, D. W. Entomogenous *Fusarium* species. **Mycopathologia**, 84, p. 3-16, 1983.

TIAGO, P. V.; FURLANETO, M. C. O Papel de Proteases Degradadoras de Cutícula Produzidas por Fungos Entomopatogênicos. **Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais**, 2, n. 1, p. 40-51, 2003.

VALICENTE, F. H. Controle biológico de pragas com entomopatógenos. **Informe agropecuário**, , 30, n. 251, p. 48-55, 2009.

VASCONCELLOS, A. **Ecologia e biodiversidade de cupins (Insecta, Isoptera) em remanescentes de Mata Atlântica do nordeste brasileiro**. 2003. - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

VEGA, F. E.; BLACKWELL, M. **Insect–Fungal Associations: Ecology and Evolution**. OXFORD New York: OXFORD UNIVERSITY PRESS, 2005a. 0-19-516652-3.

VEGA, F. E.; BLACKWELL, M. **Insect–Fungal Associations: Ecology and Evolution**. OXFORD UNIVERSITY PRESS: 2005b. 352 p. 0-19-516652-3.

VELEZ, B. A. d. A.; DINIZ, A. G.; BARBOSA, L. F. S.; SANTOS, A. C. d. S. *et al.* Potential of *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex isolates with *Chenopodium ambrosioides* and *Enterolobium contortisiliquum* extracts to control *Dactylopius opuntiae*. **International Journal of Tropical Insect Science**, 39, n. 2, p. 131-138, 2019.

VERMA, M.; SHARMA, S.; PRASAD, R. Biological alternatives for termite control: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 63, n. 8, p. 959-972, 2009.

VĚTROVSKÝ, T.; SOUKUP, P.; STIBLIK, P.; VOTÝPKOVÁ, K. *et al.* Termites host specific fungal communities that differ from those in their ambient environments. **Fungal Ecology**, 48, p. 1-12, 2020.

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

WOLLENWEBER, H. W.; SHERBAKOFF, C. D.; REINKING, O. A.; JOHANN, H. *et al.* Fundamentals for taxonomic studies of *Fusarium*. **Journal of Agricultural Research**, 30, p. 833–843, 1925.

YENDOL, W. G.; PASCHKE, J. D. Pathology of an *Entomophthora* infection in the eastern subterranean termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar). **Journal of Invertebrate Pathology**, 7, n. 4, p. 414-422, 1965.

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol Science and Technology**, 18, n. 9, p. 865-901, 2008.